

# DynaBio™



راهنمای کاربری

کیت شناسایی و سنجش کمی

ویروس اپشتین بار به روش Real-Time PCR

**DynaBio™** EBV Quantitative Real-Time PCR Detection Kit

ویرایش ۱/۴  
مرداد ماه ۱۴۰۱

۵۰ آزمون

شناسه: ک ر ۰۰۵۵

Cat # KR0055

تکاپو زیست



## فهرست:

|    |                                                    |
|----|----------------------------------------------------|
|    | اطلاعات کلی                                        |
| ۳  | محتویات                                            |
| ۳  | نگهداری                                            |
| ۴  | اطلاعات ایمنی                                      |
| ۴  | کنترل کیفیت                                        |
| ۴  | نشانه ها                                           |
| ۵  | معرفی کیت حاضر                                     |
| ۵  | محدودیت های بکارگیری محصول                         |
| ۶  | مختصری درباره Real-Time PCR                        |
| ۸  | ویروس اپشتین بار و بیماری زایی                     |
| ۸  | رابطه تعداد نسخ ویروس و واحد بین المللی            |
|    | ویژگی های عملکردی                                  |
| ۹  | حساسیت تحلیلی                                      |
| ۱۰ | ویژگی تحلیلی                                       |
| ۱۱ | بازه خطی                                           |
| ۱۱ | دقت                                                |
| ۱۴ | ارزیابی تشخیصی                                     |
| ۱۵ | سایر مواد و وسایل مورد نیاز (که در کیت ارائه نشده) |
| ۱۵ | توصیه های عمومی                                    |
| ۱۶ | جمع آوری، نگهداری و حمل و نقل نمونه ها             |
| ۱۶ | نگهداری نمونه                                      |
| ۱۶ | حمل و نقل نمونه                                    |
| ۱۷ | مواد تداخل کننده                                   |





|    |                                                    |
|----|----------------------------------------------------|
|    | روش کار                                            |
| ۲۰ | استخراج دنا (DNA)                                  |
|    | انجام آزمون Real-time PCR                          |
| ۲۱ | نکات عمومی                                         |
| ۲۲ | آماده سازی مخلوط اصلی واکنش                        |
| ۲۳ | برنامه واکنش PCR                                   |
| ۲۳ | نکته                                               |
| ۲۷ | تحلیل داده ها                                      |
| ۲۸ | معنای نتایج                                        |
| ۲۹ | روندنمای تفسیر نتایج و گزارش نهایی                 |
| ۳۰ | تعیین تیترو ویروس بر حسب IU در هر میلی لیتر پلاسما |
| ۳۱ | حل مشکل                                            |
| ۳۳ | مراجع / استانداردهای مورد استفاده                  |
| ۳۴ | پشتیبانی فنی                                       |
| ۳۴ | نشانی شرکت                                         |
| ۳۵ | یادداشت                                            |
| ۳۶ | یادداشت                                            |





## اطلاعات کلی

### محتویات

| ردیف | عناوین و محتویات                             | تعداد ویال در هر کیت ۵۰ تایی | حجم در هر ویال (میکرولیتر) |
|------|----------------------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| ۱    | مخلوط ۱<br>Mix1                              | ۱                            | ۶۲۵                        |
| ۲    | مخلوط ۲<br>Mix2                              | ۱                            | ۱۵۰                        |
| ۳    | استاندارد ۱<br>$10^5 \text{ IU}/\mu\text{l}$ | ۱                            | ۲۰۰                        |
| ۴    | استاندارد ۲<br>$10^4 \text{ IU}/\mu\text{l}$ | ۱                            | ۲۰۰                        |
| ۵    | استاندارد ۳<br>$10^3 \text{ IU}/\mu\text{l}$ | ۱                            | ۲۰۰                        |
| ۶    | استاندارد ۴<br>$10^2 \text{ IU}/\mu\text{l}$ | ۱                            | ۲۰۰                        |
| ۷    | استاندارد ۵<br>$10^1 \text{ IU}/\mu\text{l}$ | ۱                            | ۲۰۰                        |
| ۸    | کنترل داخلی<br>IPC                           | ۱                            | ۵۰۰                        |
| ۹    | کنترل منفی<br>NTC                            | ۱                            | ۱۲۵۰                       |

### نگهداری

کیت می بایست در دمای  $-20^{\circ}\text{C}$  نگهداری شود. برای اطلاع از شماره سری ساخت<sup>۱</sup> و تاریخ انقضای کیت به برچسب روی جعبه کیت رجوع شود. برای جلوگیری از کاهش حساسیت آزمون، از ذوب و انجماد<sup>۲</sup> مکرر مواد (بیش از ۵ بار) خودداری گردد.

<sup>۱</sup> Lot#

<sup>۲</sup> Freeze & thawing





## اطلاعات ایمنی

برای آگاهی از اطلاعات ایمنی کیت، لطفاً برگه داده های ایمنی<sup>۱</sup> مربوط را در وب سایت شرکت بیابید.

## کنترل کیفیت

هر سری ساخت "کیت شناسایی و سنجش کمی ویروس/پشتین بار" به منظور اطمینان از ثابت بودن و یکنواختی کیفیت محصول در مورد یک سری ویژگی های از پیش تعیین شده مورد آزمایش واقع می شود.

## نشانه ها

|             |                                                                                     |                     |                                                                                     |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| تاریخ انقضا |    | تعداد آزمون         |    |
| تاریخ تولید |    | شرایط دمایی نگهداری |    |
| شرکت سازنده |  | شناسه فرآورده       |  |
| نکته مهم    |  | سری ساخت            |  |
|             |                                                                                     | جورینه              |  |

<sup>۱</sup> MSDS: Material Safety Data Sheets





## معرفی کیت حاضر

این کیت برای شناسایی و سنجش کمی ویروس اپشتین بار با استفاده از فناوری Real-time PCR (روش TaqMan) طراحی و اعتبارسنجی<sup>۱</sup> شده است. شناسایی/سنجش کمی از طریق تکثیر یک ناحیه ۹۸ جفت بازی کاملاً حفظ شده<sup>۲</sup> از ژنوم ویروس و با استفاده از پروب اختصاصی مربوطه (دارای رنگ فلئورسانس FAM در انتهای ۵' به عنوان گزارش کننده و BHQ1 در انتهای ۳' به عنوان خاموش کننده) انجام می شود. کنترل داخلی تعبیه شده در این کیت (دارای رنگ فلئورسانس JOE در انتهای ۵' به عنوان گزارش کننده و BHQ1 در انتهای ۳' به عنوان خاموش کننده)، صحت فرآیند استخراج و عدم وجود بازدارنده های احتمالی PCR را کنترل می کند.

## محدودیت های بکارگیری محصول

- کلیه مواد می بایستی فقط و فقط برای کاربردهای in vitro استفاده شوند.
- کاربری این محصول تنها توسط کاربری که برای انجام آزمایش های in vitro مولکولی در آزمایشگاه تشخیصی آموزش های لازم را دیده است صورت پذیرد.
- برای گرفتن نتایج PCR بهینه، عملکرد دقیق مطابق راهنمای کاربری ضروری است.
- می بایستی به تاریخ انقضای نوشته شده روی جعبه توجه شود و کیت تاریخ گذشته استفاده نشود.

<sup>1</sup> Validation

<sup>2</sup> Conserved





## مختصری درباره Real-Time PCR

Real-time PCR در اصل همان واکنش PCR معمولی است با این تفاوت که با وارد کردن مواد فلوئورسان و استفاده از ابزاری برای پایش تغییرات فلوئورسانس این مواد، امکان بررسی واکنش در زمان انجام واکنش و نیز انجام محاسبات بعدی فراهم می آید.

از جمله برتری های Real-time PCR نسبت به PCR معمولی می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. حساسیت بالاتر

۲. امکان کمی سازی

۳. حذف مراحل بعد از PCR<sup>۱</sup> (الکتروفورز محصول PCR، رنگ آمیزی و مشاهده ژل روی

دستگاه نوردهی فرابنفش<sup>۲</sup>) و در نتیجه:

- استفاده نکردن از رنگ های سمی و سرطان زا مانند اتیدیوم بروماید
- به حداقل رساندن آلودگی ناشی از محصول PCR (عدم گشودن درب تیوب ها بعد از اتمام واکنش)
- کاهش خطاهای کاربری/ نیروی انسانی

۴. امکان خودکارسازی (اتوماسیون)

در حال حاضر میبانی شیمیایی متعددی برای Real-time PCR وجود دارد که در یک تقسیم بندی کلی شاید بتوان آنها را به دو دسته عمده طبقه بندی کرد:

### ۱. روش های غیر اختصاصی<sup>۳</sup>

در این نوع روش ها از رنگ های فلوئورسانس استفاده می شود که به صورت غیر اختصاصی (مستقل از توالی) به هر DNAی دو رشته ای متصل می شوند (همانند SYBR Green). از آنجا که پیام<sup>۴</sup>/ پاسخ دریافتی می تواند مربوط به هر DNAی دو رشته ای باشد، در این روش برای اطمینان از صحت پیام (سیگنال) مشاهده شده می توان از بررسی های تکمیلی (منحنی ذوب DNA و ... ) بهره جست.

---

<sup>1</sup> Post PCR

<sup>2</sup> UV Transilluminator

<sup>3</sup> Non Specific Methods

<sup>4</sup> Signal





## روش های اختصاصی<sup>۱</sup>

در این نوع روش ها از توالی های الیگونوکلوئوتیدی اختصاصی یا همان پروب ها (مکمل قسمتی از توالی هدف مورد جستجو با PCR) استفاده می شود که با رنگ های فلوئورسان نشاندار شده اند. انواع متعددی از پروب ها با طراحی ها و ویژگی های مختلف وجود دارند ولی ویژگی مشترک تمامی آنها ایجاد تغییرات در فلوئورسانس، در پی / هنگام تکثیر هدف مورد جستجو است. در میان مبانی شیمیایی متعددی که برای روش اختصاصی ابداع شده، روش TaqMan از رواج - و بالطبع اهمیت بیشتری - برخوردار گشته است.

از جمله کاربردهای Real-time PCR (با گرایش کلینیکی) می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. بررسی وجود یا عدم وجود ژن های خاص (تومور مارکرها، ...).
۲. شناسایی و سنجش کمی عوامل بیماری زا
۳. تعیین ژنوتایپ عوامل بیماری زا
۴. پایش درمان های دارویی
۵. بررسی بیان ژن ها
۶. تشخیص های پیش از تولد
۷. پایش MRD<sup>۲</sup>
۸. ... و

---

<sup>۱</sup> Specific Methods

<sup>۲</sup> Minimal Residual Disease







## ویروس اپشتین بار و بیماری زایی

ویروس اپشتین بار یک دنا ویروس از اعضای خانواده ویروس های هرپس<sup>۱</sup> است.

این ویروس شیوع جهانی داشته و اکثر افراد در طول دوره زندگی خود با این ویروس آلوده می شوند. انتقال معمولاً از طریق بزاق صورت می گیرد و راه های دیگر (خون، هوا و . . .) متداول نیستند. آلودگی با این ویروس در کودکی معمولاً فاقد علائم است ولی در نوجوانی یا بزرگسالی منجر به بیماری مونونوکلئوز عفونی<sup>۲</sup> می شود که با علائمی از جمله تب، گلودرد، خستگی و تورم غدد لنفاوی همراه است ولی هیچگاه کشنده نیست.

معمولاً عفونت بعد از ۱ تا ۲ هفته بهبود می یابد ولی ویروس برای بقیه عمر به صورت خفته در برخی سلول های گلو و خون، همراه فرد خواهد بود. ویروس می تواند به صورت دوره ای، مجدداً فعال شود (که در این حالت عموماً در بزاق فرد یافت می شود). این موارد، معمولاً فاقد نشانه های بیماری است.

در افراد دارای سیستم ایمنی سرکوب شده<sup>۳</sup>، ضعیف، ویروس اپشتین بار می تواند باعث بروز مشکلات جدی با نرخ بالای مرگ و میر شود.

### رابطه تعداد نسخ ویروس و واحد بین المللی (IU)<sup>۴</sup>

به خاطر عدم دقت روشهای کنونی تعیین تعداد نسخ ویروس و یا اسیدهای نوکلئیک مربوط، سازمان بهداشت جهانی<sup>۵</sup> اقدام به تهیه و توزیع استانداردهای تیتروسی<sup>۶</sup> مربوط به برخی از عناوین ویروسی همانند اپشتین بار نموده است.

غلظت استانداردهای به کار رفته در این کیت با استفاده از اولین استاندارد بین المللی سازمان بهداشت و سلامت جهانی<sup>۷</sup> عیار (کالیبره) شده اند و نتایج این کیت بر حسب واحد بین المللی در واحد حجم ( $IU/\mu l$  یا  $IU/ml$ ) گزارش می شود.

<sup>1</sup> Herpesviridae

<sup>2</sup> Infectious Mononucleosis

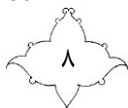
<sup>3</sup> Immunosuppressed

<sup>4</sup> IU: International Unit

<sup>5</sup> WHO: World Health Organization

<sup>6</sup> Viral Loads

<sup>7</sup> 1<sup>st</sup> WHO international Standard for Epstein-Barr Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques, code: 09/260





در خصوص رابطه بین تعداد نسخ و واحد بین المللی، اعداد گوناگونی ذکر شده است ولی در مورد این استاندارد WHO (با توجه به مستندات منتشر شده توسط WHO) هر IU معادل ۲ نسخه از ویروس اپشتین بار است.

## ویژگی های عملکردی

### حساسیت تحلیلی<sup>۱</sup>

حد تشخیص تحلیلی "کیت شناسایی و سنجش کمی ویروس/اپشتین بار" مستقل از حساسیت روش استخراج به کار رفته تعیین شده است. برای تعیین حساسیت تحلیلی "کیت شناسایی و سنجش کمی ویروس اپشتین بار"، یک سری رقت متوالی از غلظت اسمی ۱ تا  $0.01 \text{ IU}/\mu\text{l}$  از DNAی EBV آماده و با استفاده از این کیت ارزیابی شدند. استفاده از ۱۰ تکرار از هر نمونه و انجام آزمون منجر به تعیین حساسیت تا  $0.01 \text{ IU}/\mu\text{l}$  گردید (با pValue معادل ۰/۰۵). این بدان معنی است که به احتمال بیش از ۹۵٪، مقادیر  $0.01 \text{ IU}/\mu\text{l}$  قابل شناسایی خواهند بود.

---

<sup>۱</sup> Analytical Sensitivity





## ویژگی تحلیلی<sup>۱</sup>

ویژگی (اختصاصیت) تحلیلی "کیت شناسایی و سنجش کمی ویروس / پشنتین بار" ساخت شرکت تکاپوزیست در مرحله اول با انتخاب و طراحی مناسب پرایمرها، پروب ها و شرایط دقیق واکنش، تضمین شده است.

همچنین، آزمون از نظر واکنش متقاطع<sup>۲</sup> با منابع ذکر شده در جدول زیر مورد بررسی قرار گرفت که با هیچ یک از آنها واکنش متقاطعی دیده نشد.

| مشخصات                                                                                               | نتایج |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Human Herpes Simplex virus type 1                                                                    | منفی  |
| Human Herpes Simplex virus type 2                                                                    | منفی  |
| Varicella Zoster Virus                                                                               | منفی  |
| 2nd WHO International Standard for Hepatitis B DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay        | منفی  |
| Human Cytomegalovirus                                                                                | منفی  |
| 2nd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay     | منفی  |
| WHO 2nd International Standard For Hepatitis C Virus RNA for Genomic Amplification Technology Assays | منفی  |
| Human Papilloma Virus Type16                                                                         | منفی  |
| Human Papilloma Virus Type18                                                                         | منفی  |
| و<br>دنا ی (DNA) ژنومی انسان                                                                         | منفی  |

<sup>۱</sup> Analytical Specificity

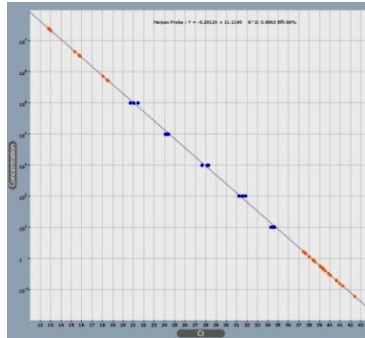
<sup>۲</sup> Cross Reactivity





## بازه خطی<sup>۱</sup>

بازه خطی (سنجش تحلیلی) "کیت شناسایی و سنجش کمی /پشتین بار" با تجزیه و تحلیل یکسری از رقت های استاندارد دنای EBV در بازه  $5 \times 10^7$  IU/ $\mu$ l تا  $10^{-1}$  IU/ $\mu$ l تعیین شد. نتیجه نشان می دهد که بازه خطی این کیت، از غلظت حداقل ۱ IU/ $\mu$ l تا  $5 \times 10^7$  IU/ $\mu$ l را تحت پوشش قرار می دهد.



## دقت<sup>۲</sup>

داده های دقت "کیت شناسایی و سنجش کمی ویروس /پشتین بار" امکان تعیین وردایی<sup>۳</sup> کلی آزمون را فراهم می آورد. وردایی کل محاسبه شده متشکل است از :

۱. وردش درون آزمونی<sup>۴</sup> (تغییرپذیری/ متغیر بودن نتایج چندین نمونه مشابه با غلظت های یکسان در یک آزمایش).
  ۲. وردش بین آزمونی<sup>۵</sup> (تغییرپذیری/ متغیر بودن نتایج آزمون هایی که توسط کاربران مختلف با دستگاه های مختلف از یک نوع و در یک آزمایشگاه، حاصل شده است).
- داده های دقت "کیت شناسایی و سنجش کمی ویروس /پشتین بار" با استفاده از دو نمونه از استانداردهای کمیت سنجی (استاندارد ۳: ۱۰۰۰ IU/ $\mu$ l و استاندارد ۵: ۱۰ IU/ $\mu$ l) جمع آوری شدند. آزمون در ۳ روز مختلف توسط کاربران متفاوت و با استفاده از ۱۰ تکرار روی هر نمونه و با استفاده از یک دستگاه ثابت انجام شد. داده های به دست آمده برای تعیین انحراف معیار<sup>۶</sup>،

<sup>۱</sup> Linear range

<sup>۲</sup> Precision

<sup>۳</sup> Variance

<sup>۴</sup> Intra assay variation

<sup>۵</sup> Inter assay variation

<sup>۶</sup> SD: Standard Deviation





واریانس و ضریب وردش<sup>۱</sup> واکنش PCR اختصاصی پاتوژن استفاده شدند. داده های دقت بر مبنای مقادیر چرخه آستانه<sup>۲</sup> ( $C_t$ ) محاسبه شدند. همچنین از روی این مقادیر، داده های نتایج کمی بر حسب  $IU/\mu l$  نیز محاسبه گردید.

| نام آزمون                                 | انحراف معیار<br>بر حسب Ct | وردایی (واریانس)<br>بر حسب Ct | CV<br>بر حسب Ct | انحراف معیار<br>بر حسب IU | وردایی (واریانس)<br>بر حسب IU | CV<br>بر حسب IU |
|-------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------|
| وردش درون آزمونی<br>Intra Assay variation | ۰/۰۹۶                     | ۰/۰۰۹                         | ۰/۳۴ %          | ۶۹/۲۹                     | ۴۸۰۱                          | ۶/۲۳ %          |
| وردش بین آزمونی<br>Inter Assay variation  | ۰/۱۴                      | ۰/۰۲۱                         | ۰/۵۱ %          | ۱۲۳/۰۸                    | ۱۵۳۲۸                         | ۱۰/۳۷ %         |
| وردایی کل<br>Total variance               | ۰/۱۷                      | ۰/۰۳                          | ۰/۶ %           | ۱۴۱/۸۷                    | ۲۰۱۲۹                         | ۱۱/۸۸ %         |

جدول ۱: داده های دقت برای استاندارد شماره ۳ (دستگاه Exicycler96)

| نام آزمون                                 | انحراف معیار<br>بر حسب Ct | وردایی (واریانس)<br>بر حسب Ct | CV<br>بر حسب Ct | انحراف معیار<br>بر حسب IU | وردایی (واریانس)<br>بر حسب IU | CV<br>بر حسب IU |
|-------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------|
| وردش درون آزمونی<br>Intra Assay variation | ۰/۱۳                      | ۰/۰۱۸                         | ۰/۳۹ %          | ۱/۰۵                      | ۱/۱                           | ۸/۸۳ %          |
| وردش بین آزمونی<br>Inter Assay variation  | ۰/۲۲                      | ۰/۰۴۹                         | ۰/۶۳ %          | ۱/۹۵                      | ۳/۸۳                          | ۱۸/۵۰ %         |
| وردایی کل<br>Total variance               | ۰/۲۶                      | ۰/۰۶۷                         | ۰/۷۳ %          | ۲/۲۲                      | ۴/۹۳                          | ۲۰/۹۸ %         |

جدول ۲: داده های دقت برای استاندارد شماره ۵ (دستگاه Exicycler96)

<sup>۱</sup> CV: Coefficient of Variation

<sup>۲</sup>  $C_t$ : Cycle of threshold



| نام آزمون                                    | انحراف معیار<br>بر حسب Ct | وردایی (واریانس)<br>بر حسب Ct | CV<br>بر حسب Ct | انحراف معیار<br>بر حسب IU | وردایی (واریانس)<br>بر حسب IU | CV<br>بر حسب IU |
|----------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------|
| وردش درون آزمونی<br>Intra Assay<br>variation | ۰/۰۹                      | ۰/۰۰۹                         | ۰/۳۵ %          | ۵۴/۰۷                     | ۲۹۲۴                          | ۶/۵۳ %          |
| وردش بین آزمونی<br>Inter Assay<br>variation  | ۰/۱۷                      | ۰/۰۲۹                         | ۰/۶۲ %          | ۹۲/۸                      | ۸۶۱۲                          | ۱۰/۹۵ %         |
| وردایی کل<br>Total variance                  | ۰/۱۹                      | ۰/۰۳۸                         | ۰/۶۸ %          | ۱۰۷/۴۰                    | ۱۱۵۳۶                         | ۱۲/۶۶ %         |

جدول ۳: داده های دقت برای استاندارد شماره ۳ (دستگاه Rotor Gene Q)

| نام آزمون                                    | انحراف معیار<br>بر حسب Ct | وردایی (واریانس)<br>بر حسب Ct | CV<br>بر حسب Ct | انحراف معیار<br>بر حسب IU | وردایی (واریانس)<br>بر حسب IU | CV<br>بر حسب IU |
|----------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------|
| وردش درون آزمونی<br>Intra Assay<br>variation | ۰/۳۷                      | ۰/۱۴                          | ۱/۰۹ %          | ۲/۶۵                      | ۷/۰۶                          | ۲۲/۵۳ %         |
| وردش بین آزمونی<br>Inter Assay<br>variation  | ۰/۳۸                      | ۰/۱۴۴                         | ۱/۱۷ %          | ۲/۴۲                      | ۵/۸۵                          | ۲۷/۵۷ %         |
| وردایی کل<br>Total variance                  | ۰/۵۳                      | ۰/۲۸۴                         | ۱/۵۴ %          | ۳/۵۹                      | ۱۲/۹۱                         | ۳۳/۸ %          |

جدول ۴: داده های دقت برای استاندارد شماره ۵ (دستگاه Rotor Gene Q)



## ارزیابی تشخیصی<sup>۱</sup>

برای برآورد ارزیابی تشخیصی کیت، حساسیت و ویژگی (اختصاصیت) بالینی کیت مورد بررسی قرار گرفت.

### حساسیت بالینی (کلینیکی):<sup>۲</sup>

برای این منظور ۵۰ نمونه EBV مثبت تأیید شده مورد آزمایش قرار گرفتند. کلیه نمونه ها با استفاده از "کیت شناسایی و سنجش کمی ویروس/پشتین بار" مثبت تشخیص داده شدند.

### ویژگی (اختصاصیت) بالینی:<sup>۳</sup>

برای این منظور ۵۰ پلاسما منفی تأیید شده مورد آزمایش قرار گرفتند. کلیه نمونه ها با استفاده از "کیت شناسایی و سنجش کمی ویروس/پشتین بار" منفی تشخیص داده شدند.

---

<sup>۱</sup> Diagnostic Evaluation

<sup>۲</sup> Clinical Sensitivity

<sup>۳</sup> Clinical Specificity



## سایر مواد و وسایل مورد نیاز (در کیت ارائه نشده است)

- دستکش‌های آزمایشگاهی سنتتیک (نیتریل/وینیل) یکبار مصرف **بدون پودر**.
- کیت استخراج دنا (DNA) (دستی یا مخصوص دستگاه استخراج خودکار)
- سمپلر (متغیر)
- سر سمپلرهای فیلتردار استریل عاری از نوکلئازها<sup>۱</sup>
- لرنانک (ورنکس)<sup>۲</sup>
- چرخانک (اسپین)<sup>۳</sup>
- میکروپیوژ با دور ۲۰۰۰۰ g
- نوار<sup>۴</sup> یا میکروتیوب‌های مخصوص Real-time PCR متناسب با دستگاه
- دستگاه Real-time PCR دارای کانال‌های شناسایی پیام (سیگنال)های FAM و JOE، و یا کانال‌هایی برای شناسایی سیگنال رنگ‌هایی با طول موج مشابه  
(ABI StepOne , ABI StepOnePlus™ , ABI 7500™ , Rotor-Gene 6000 , Rotor-Gene Q, Exicycler™ 96, Magnetic Induction Cyclor (Mic)
- هود PCR
- مازیک (مارکر)

## توصیه‌های عمومی

- از سرسمپلرهای استریل فیلتردار استفاده نمایید.
- همواره قبل و بعد از انجام آزمون سطح زیر هود/میز را با پنبهٔ آغشته به الکل ۷۰٪ کاملاً تمیز کرده، سپس به مدت ۵ دقیقه با پرتوی فرابنفش پرتو دهی کنید.
- برای آلودگی‌زدایی مواد زائد شامل سرسمپلرها، تیوب‌ها، استریپ‌های حاوی محصول PCR و ...، آن‌ها را پس از مصرف به مدت ۱ ساعت در آب ژاول (وایتکس) ۱۰٪ غوطه‌ور کنید.

<sup>۱</sup> DNase RNase Free

<sup>۲</sup> Vortex

<sup>۳</sup> Spin

<sup>۴</sup> Strip





- نمونه‌های مثبت (اعم از پلاسما، کنترل‌ها و محصول PCR) را به دور از مواد دیگر، استخراج و نگهداری نموده، در فضای جداگانه‌ای آن‌ها را به مخلوط واکنش اضافه نمایید.
- پیش از انجام واکنش دقت نمایید که همه اجزا در دمای اتاق کاملاً ذوب شده باشند.
- هنگامی که اجزای کیت ذوب شد، آن‌ها را ۱۰ ثانیه با لرزانک (ورتنکس) مخلوط کنید و سپس با استفاده از چرخانک (اسپین) از تجمع محتویات لوله‌ها در انتهای آن‌ها (پائین آمدن مواد از دیواره‌ها) مطمئن شوید.

## جمع آوری، نگهداری و حمل و نقل نمونه

اعتبارسنجی این کیت با استفاده از نمونه های پلاسمای ا.د.ت.<sup>۱</sup> دار (بین ۱/۵ تا ۲ میلی گرم نمک پتاسیم EDTA به ازای هر میلی لیتر از خون) انجام شده است. نمونه های دیگر اعتبارسنجی نشده اند.

### نگهداری نمونه

حداکثر تا ۶ ساعت پس از خون‌گیری، خون کامل می‌بایست با سانتریفیوژ کردن برای ۲۰ دقیقه با ۸۰۰ تا ۱۶۰۰g به پلاسما و اجزای سلولی تفکیک گردد. پلاسمای جدا شده باید به میکروتیوب های استریل منتقل گردد. اگر نمونه را منجمد سازید یا برای مدت طولانی نگاه دارید ممکن است حساسیت آزمون کاهش یابد.

### حمل و نقل نمونه ها

به عنوان یک اصل کلی همه نمونه ها می‌بایست بالقوه بیماری زا تلقی شوند. نمونه ها باید در محفظه ای مقاوم جابجا شوند تا از خطر انتشار آلودگی پیش گیری شود. نمونه ها می‌بایست مطابق دستورالعمل‌های محلی و ملی برای حمل مواد بیماری زا جابجا شوند. در صورتیکه خون گیری در محلی غیر از محل نگهداری نمونه/آزمایشگاه انجام شد، نمونه ها باید ظرف مدت ۶ ساعت به مقصد برسند. نمونه های خون می‌بایست در شرایط خنک ( $+2^{\circ}\text{C}$  تا  $+8^{\circ}\text{C}$ ) و نمونه های پلاسما به صورت منجمد ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) حمل شوند.

<sup>۱</sup> E.D.T.A



## مواد تداخل کننده

مقادیر بالای بیلی روبین ( $\geq 15 \text{ mg/dl}$ ) و لیپید ها ( $\geq 800 \text{ mg/dl}$ ) و نمونه های همولیز شده واکنش را تحت تاثیر قرار نمی دهند ولی هپارین ( $\geq 10 \text{ IU/ml}$ ) موجب مهار/ حذف/ کاهش کارایی واکنش زنجیره ای پلی مرز می شود. نمونه هایی که در میکروتیوب های حاوی هپارین به عنوان ماده ضد انعقاد جمع آوری شده اند، نباید مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، نمونه بیماران که هپارین دریافت کرده اند نیز نباید مورد استفاده قرار گیرند.



## معرفی اجزای کیت

در این کیت اجزای زیر وجود دارند:

### • مخلوط ۱ (Mix1)

این مخلوط حاوی مواد لازم برای انجام واکنش PCR شامل آنزیم، dNTP ها و بافر مربوط است.

### • مخلوط ۲ (Mix2)

این مخلوط حاوی پرایمرها و پروب های لازم برای شناسایی و تکثیر DNA و ویروس و کنترل داخلی اضافه شده به نمونه هاست.

### • استانداردهای سنجش کمی شماره ۱ تا ۵

این استانداردها (با میزان مشخص تیترو ویروس بر حسب IU) امکان ترسیم یک نمودار استاندارد را فراهم می آورد. معادله حاکم بر این نمودار استاندارد برای انجام کلیه محاسبات سنجش کمی و تعیین تیترو ویروس در نمونه استخراج شده مورد استفاده قرار می گیرد. همچنین این نمودار کارایی<sup>۱</sup> واکنش PCR انجام شده و نیز ضریب رگرسیون نقاط استاندارد ( $R^2$ ) را تعیین می کند. در یک واکنش PCR موفق باید شرایط زیر حاکم باشد:

$$ePCR > 90\% \text{ و } R^2 > 0.9$$

### • کنترل داخلی (PC)<sup>۲</sup>

کنترل داخلی یک قطعه DNA خارجی است که به هر نمونه ای که قرار است DNA آن استخراج شود افزوده می شود. در صورت کارایی مناسب کیت استخراج مورد استفاده، انجام صحیح فرآیند استخراج و عدم وجود بازدارنده های احتمالی PCR، این DNA خارجی در واکنش PCR تکثیر شده و با استفاده از پروب اختصاصی مربوطه شناسایی می شود. در این حالت تفاوت چرخه آستانه ( $C_t$ ) کنترل داخلی در نمونه پلاسمای منفی که تحت فرآیند استخراج قرار گرفته

می بایست  $3 \pm 37$  باشد. این میزان پراکندگی به جهت تفاوت در تجهیزات و فرآیند خالص سازی ایجاد می شود. انحراف بیش از این دلالت بر بروز مشکل در فرآیند خالص سازی دارد. در این

<sup>1</sup> Efficiency ( $e_{PCR}$ )

<sup>2</sup> Internal Positive Control





موارد فرآیند استخراج می‌بایست کنترل و در صورت لزوم کل آزمون از مرحله استخراج تا آزمون Real-time دوباره تکرار شود.

**مهم:** در صورت عدم مشاهده منحنی کنترل داخلی در نمونه منفی استخراج شده، یکی از علل مهم ممکن است کارایی نامناسب کیت/ روش استخراج استفاده شده باشد. در این حالت استخراج را با کیت دیگری (کیت های توصیه شده در این راهنمای کاربری) انجام دهید و مجدداً آزمون Real-time را تکرار کنید. در هر حالت امکان گزارش جواب منفی برای نمونه منفی که کنترل داخلی آن جواب نداده است وجود ندارد.

#### • کنترل منفی (N.T.C)<sup>۱</sup>

کنترل منفی، نمونه پلاسمایی است که از نظر وجود دنای EBV منفی است. این پلاسما همانند یک نمونه و با اضافه کردن کنترل داخلی به آن استخراج می شود. وجود سیگنال کنترل داخلی (JOE) در این نمونه منفی و عدم وجود سیگنال EBV (FAM) می‌تواند به عنوان مبنایی جهت تأیید موارد زیر مورد استفاده قرار گیرد:

۱. صحت فرآیند استخراج دنا
۲. مهیا بودن شرایط برای واکنش PCR (عدم وجود بازدارنده ها در دنای استخراج شده و ...)

چرخه آستانه (C<sub>t</sub>) کنترل داخلی در این نمونه می‌بایست  $37 \pm 3$  باشد.

---

<sup>1</sup> No Template Control



## روش کار

### استخراج دنا (DNA)

کیت های استخراج دنا توسط سازندگان بسیاری ارایه می گردد. میزان نمونه مورد نیاز برای فرآیند استخراج دنا بسته به روش کار، متفاوت است. لطفاً فرآیند استخراج دنا را مطابق دستورالعمل تولید کننده به انجام رسانید.

توصیه می شود از دستگاه های خودکار استخراج اسیدهای نوکلئیک استفاده کنید. این امر می تواند موجب افزایش حساسیت و کاهش/ حذف احتمال آلودگی از یک نمونه به نمونه دیگر<sup>۱</sup> شود. لازم به ذکر است که اعتبارسنجی این کیت با استفاده از روش استخراجی با کارایی بیش از ۷۰٪ صورت گرفته است. در زیر به کیت استخراج مناسب که می توانند کارایی بیش از ۷۰٪ داشته باشند، اشاره شده است:

| نام کیت                                                                                               | شناسه (Cat#) | سازنده    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------|
| کیت استخراج اسیدهای نوکلئیک ویروسی (DNA/RNA)<br><b>DynaBio Viral Nucleic Acid Extraction Mini Kit</b> | ک ج ۰۰۲۵     | تکاپوزیست |

برای کنترل و پایش فرآیند استخراج در هر نمونه، کنترل داخلی را به نسبت ۱۰٪ حجم بافر رهاسازی (Elution Buffer) به فرآیند استخراج اضافه نمایید. برای مثال اگر DNA را در ۵۰ میکرولیتر بافر جمع آوری می کنید، در ابتدا می بایست ۵ میکرولیتر کنترل داخلی اضافه شود.

 کنترل داخلی را مستقیماً به نمونه اضافه نکنید. توصیه می شود این کار بلافاصله پس از اضافه کردن بافر اتصال به نمونه انجام شود.

کنترل داخلی طراحی شده در این کیت از نوع رقابتی است بنابراین از چندگانه<sup>۲</sup> کردن واکنش و کاهش حساسیت آزمون جلوگیری به عمل آمده است. همچنین با توجه به غلظت پائین کنترل داخلی تعبیه شده در کیت، رقابتی بودن آن موجب کاهش تأثیرگذار بر حساسیت آزمون (در محدوده بازه خطی آن) نمی شود.

پیام کنترل داخلی فقط در نمونه های منفی یا نمونه هایی با تیتراژ پائین ویروس مشاهده می شود. در نمونه های با تیتراژ بالای ویروس، پیام (سیگنال) کنترل داخلی مشاهده نشده و یا به طور ضعیفی مشاهده می شود.

<sup>1</sup> Cross Contamination

<sup>2</sup> Multiplex



## انجام آزمون Real-time PCR

### نکات عمومی

۱. قبل از شروع به انجام آزمون روی یک برگه کاغذ طراحی آزمون و مقادیر مورد نیاز از مواد، لوازم و ... را بنویسید تا در هنگام کار دچار خطا نشوید.
۲. ابتدا برنامه ریزی دستگاه تان را انجام داده، دستگاه را آماده به کار کنید سپس اقدام به خروج مواد از فریزر و آماده سازی آنها برای انجام آزمون نمائید.
۳. از کالیبره بودن سمپلرهایتان اطمینان حاصل کنید.
۴. قبل از انجام آزمون از ذوب شدن کامل موادی که از فریزر بیرون آورده اید مطمئن شوید.
۵. همواره مخلوط واکنش را به میزان ۵٪ بیش از میزان مورد نیاز آماده کنید تا با مشکل کمبود مخلوط (به دلیل خطاهای کاربری، نمونه ریزی<sup>۱</sup>، چسبیدن مواد به دیواره ها و ... ) در حین انجام کار مواجه نشوید.
۶. برای مخلوط کردن مواد از پیپتاژ و لرزان کردن (ورتکس) و برای پائین آوردن مواد از دیواره ها از چرخان کردن (اسپین) استفاده کنید.
۷. برای ترسیم منحنی استاندارد دقت و جلوگیری از برآورد نادرست<sup>۲</sup> مقادیر، استفاده از هر ۵ نمونه استاندارد توصیه می شود. برای اطمینان بیشتر نسبت به نتایج آزمون می توان نمونه ها/ استانداردها را به صورت دوتایی<sup>۳</sup> مورد استفاده قرار داد.

---

<sup>1</sup> Sampling

<sup>2</sup> Under or Over estimation

<sup>3</sup> Duplicate



## آماده سازی مخلوط اصلی واکنش

مقادیر لازم برای ساختن مخلوط اصلی واکنش برای یک آزمون مطابق جدول زیر است:

| نام     | حجم به میکرولیتر |
|---------|------------------|
| مخلوط ۱ | ۱۲/۵             |
| مخلوط ۲ | ۲/۵              |

مخلوط اصلی واکنش (مخلوط ۱+مخلوط ۲) را برای تعداد کل نمونه ها به اضافه ۵٪ اضافی در یک تیوب ۲ میلی لیتری استریل (عاری از نوکلئازها) آماده کنید.

### حداقل تعداد کل نمونه ها در یک دور واکنش عبارت است از:

| نام                                 | تعداد |
|-------------------------------------|-------|
| استانداردهای سنجش کمتی              | ۵     |
| کنترل منفی استخراج شده              | ۱     |
| آب تزریقی (کنترل منفی PCR)          | ۱     |
| کنترل مثبت (در صورت استفاده)        | -     |
| نمونه های مجهول (بیمار) استخراج شده | X     |
| جمع کل                              | X+۷   |

در هر تیوب مخصوص Real-time PCR، ۱۵ میکرولیتر از مخلوط آماده شده و ۱۰ میکرولیتر از دمای نمونه مورد آزمایش/ استانداردها/ کنترل منفی ها اضافه کرده، ابتدا به آرامی پیپتاژ کرده، سپس در تیوب/ استریپ ها را بسته یا با برچسب مخصوص کاملاً پوشانده و محکم کنید. تیوب/ استریپ ها را چرخان کنید و در مکان مربوط در دستگاه قرار دهید. دقت کنید تا هر نمونه در جایگاه تعریف شده خود قرار بگیرد.

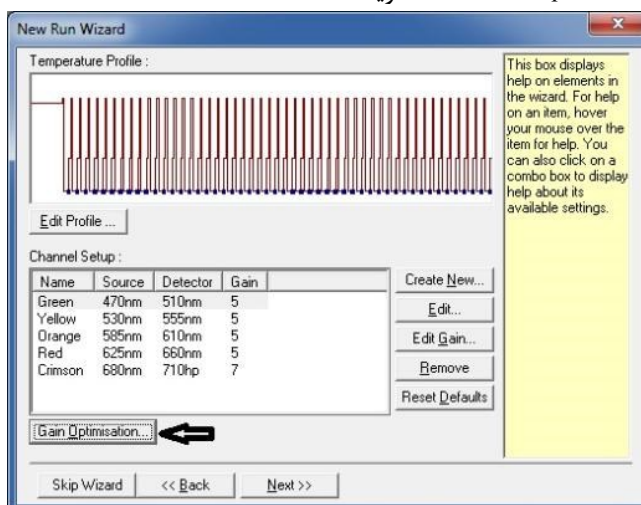


## برنامه واکنش PCR

| تکرار   | زمان     | دما (درجه سانتیگراد)                                                                                                             |
|---------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ۱ چرخه  | ۵ دقیقه  | ۹۵                                                                                                                               |
| ۵۰ چرخه | ۱۵ ثانیه | ۹۵                                                                                                                               |
|         | ۵۰ ثانیه | ۵۷                                                                                                                               |
|         | -        | خوانش (Scan) فلوئورسانس نمونه ها<br><ul style="list-style-type: none"> <li>FAM برای EBV</li> <li>JOE برای کنترل داخلی</li> </ul> |

نکته:

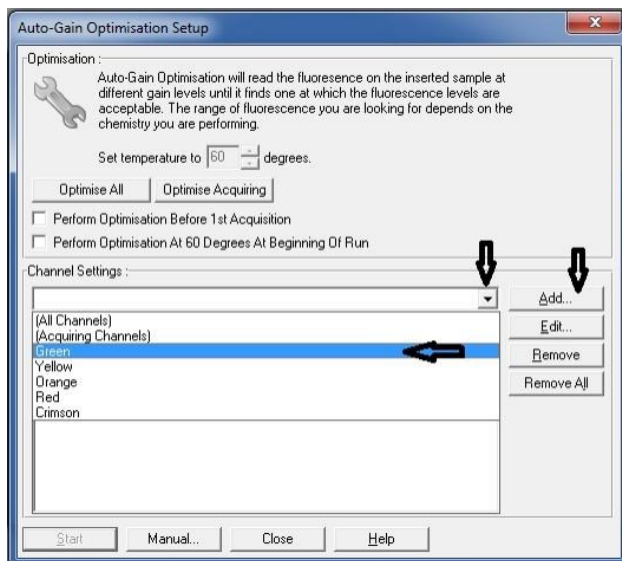
۱. در دستگاه های برند Rotorgene، پس از دادن برنامه دمایی و پیش از شروع به کار دستگاه: روی OK کلیک کنید تا شکل زیر ظاهر شود. سپس روی Gain Optimisation کلیک کنید تا وارد صفحه Auto-Gain Optimisation Set Up شوید.



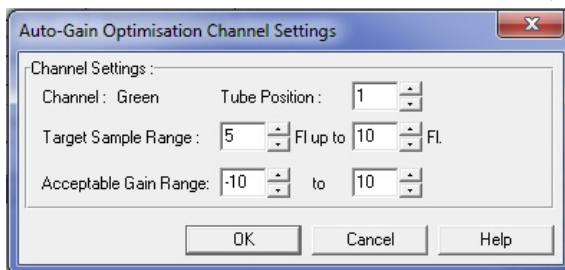




سپس در صفحه Auto-Gain Optimisation Set Up. از منوی بازشونده، Green را انتخاب کرده و سپس روی Add کلیک کنید.



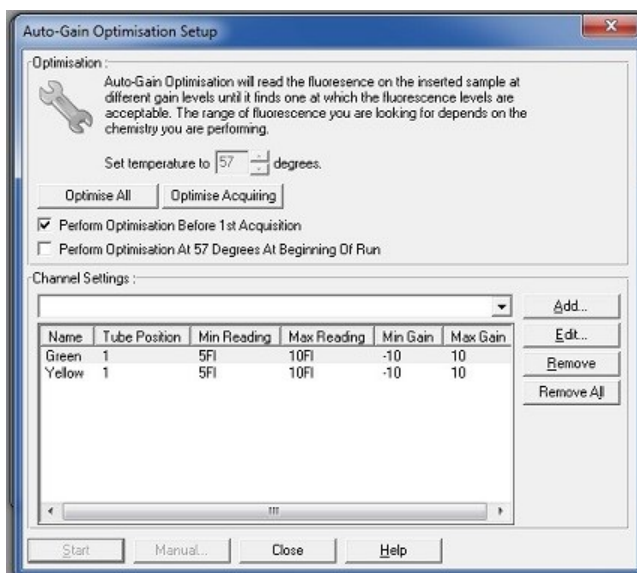
پس از ظاهر شدن پنجره زیر، در قسمت Target Sample Range حد پائین را روی ۵ و حد بالا را روی ۱۰ قرار دهید و سپس روی Ok کلیک کنید.



همین کار را برای رنگ Yellow نیز تکرار کنید.

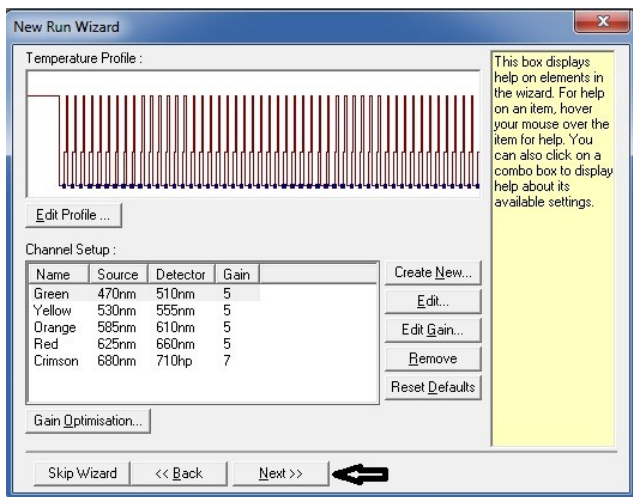


همانند شکل زیر، ابتدا دما را در قسمت set temperature روی ۵۷ درجه تنظیم نمایید. سپس گزینه Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition را تیک بزنید و روی Close کلیک کنید.





همانند شکل زیر روی Next کلیک کنید.



۲. در دستگاه های برند Rotorgene بعد از انجام واکنش و در زمان آنالیز نتایج :

کنترل کنید که گزینه Dynamic Tube انتخاب شده باشد، در غیر اینصورت روی آن کلیک کنید تا حروف آن آبی رنگ شوند. / روی گزینه Slope Correct کلیک کنید. / روی گزینه Auto Scale کلیک کنید. / روی گزینه Linear Scale کلیک کنید. در دستگاه های برند Rotorgene و Mic برای آنالیز نتایج، ۵ سیکل ابتدایی را حذف نمایید. (Ignore First 5 Cycles)



## تحلیل داد ها

در وهله اول شروط زیر باید برقرار باشد تا اطمینان حاصل شود نتایج قابل اتکا هستند:

- کارایی واکنش بین ۹۰ تا ۱۰۵٪ باشد.
- $R^2 > 0.9$  باشد.
- Ct کنترل داخلی (JOE) در کنترل منفی استخراج معادل  $37 \pm 3$  باشد.
- پیام FAM در کنترل منفی استخراج مشاهده نشود.
- پیام FAM و JOE در کنترل منفی PCR مشاهده نشود.

در صورت برقرار نبودن هریک از شروط بالا، آزمون نامعتبر است و بایستی برای یافتن و حل مشکل به ترتیب مراحل: PCR، استخراج و نمونه گیری، تکرار گردد.

\* **حد آستانه مثبت:** از سیگنال هایی که در چرخه های بالاتر از ۴۰ دیده می شوند ( $C_t \geq 40$ ) باید چشم پوشی کرد (اعم از نمونه، کنترل منفی و...).

در صورت برقرار بودن شروط بالا:

|                         |      |      |                        |
|-------------------------|------|------|------------------------|
| EBV<br>(FAM)            | +    | -    | -                      |
| کنترل داخلی<br>(JOE)    | *+/- | +    | -                      |
| نتیجه آزمون<br>(Result) | مثبت | منفی | نامعتبر<br>(تکرار شود) |

\* غلظت های بالای دنا ویروس می تواند منجر به کاهش یا حذف سیگنال کنترل داخلی گردد.



## معنای نتایج

موارد زیر به عنوان نتایج آزمون محتمل است. روندنمای تفسیر نتایج و گزارش نهایی در صفحه بعد آمده است.

۱. پیام (سیگنال) FAM در نمونه شناسایی ولی در کنترل های منفی شناسایی نمی شود.

**نتیجه آزمون مثبت است: نمونه حاوی دنای (DNA) ویروس اپشتین بار است.**

در این حالت، ممکن است پیام JOE دیده نشود. زیرا غلظت های بالای دنای EBV می تواند منجر به کاهش یا حذف سیگنال کنترل داخلی گردد.

۳. پیام (سیگنال) FAM هم در نمونه و هم در کنترل های منفی شناسایی می شود.

**احتمال نتیجه مثبت کاذب وجود دارد: آزمون می بایست مجدداً تکرار شود (رجوع**

شود به قسمت حل مشکل)<sup>۲</sup>

۴. پیام (سیگنال) FAM در نمونه شناسایی نمی شود ولی پیام JOE (مربوط به کنترل

داخلی) در نمونه شناسایی می شود ( $C_t = 37 \pm 3$ ). در این حالت پیام کنترل داخلی

احتمال وجود بازدارنده PCR را رد می کند و بنابراین:

در نمونه، دنای EBV قابل شناسایی نیست و یا میزان آن پائین تر از حساسیت

کلینیکی آزمون است. می توان با گزارش حساسیت آزمون به پزشک آن را منفی در

نظر گرفت.

۵. نه پیام (سیگنال) FAM و نه پیام JOE در نمونه شناسایی نمی شوند.

**هیچ برداشت تشخیصی نمی توان داشت.**

اطلاعات مربوط به منشأ خطا و راه حل های آن را در قسمت **حل مشکل** می توان یافت.

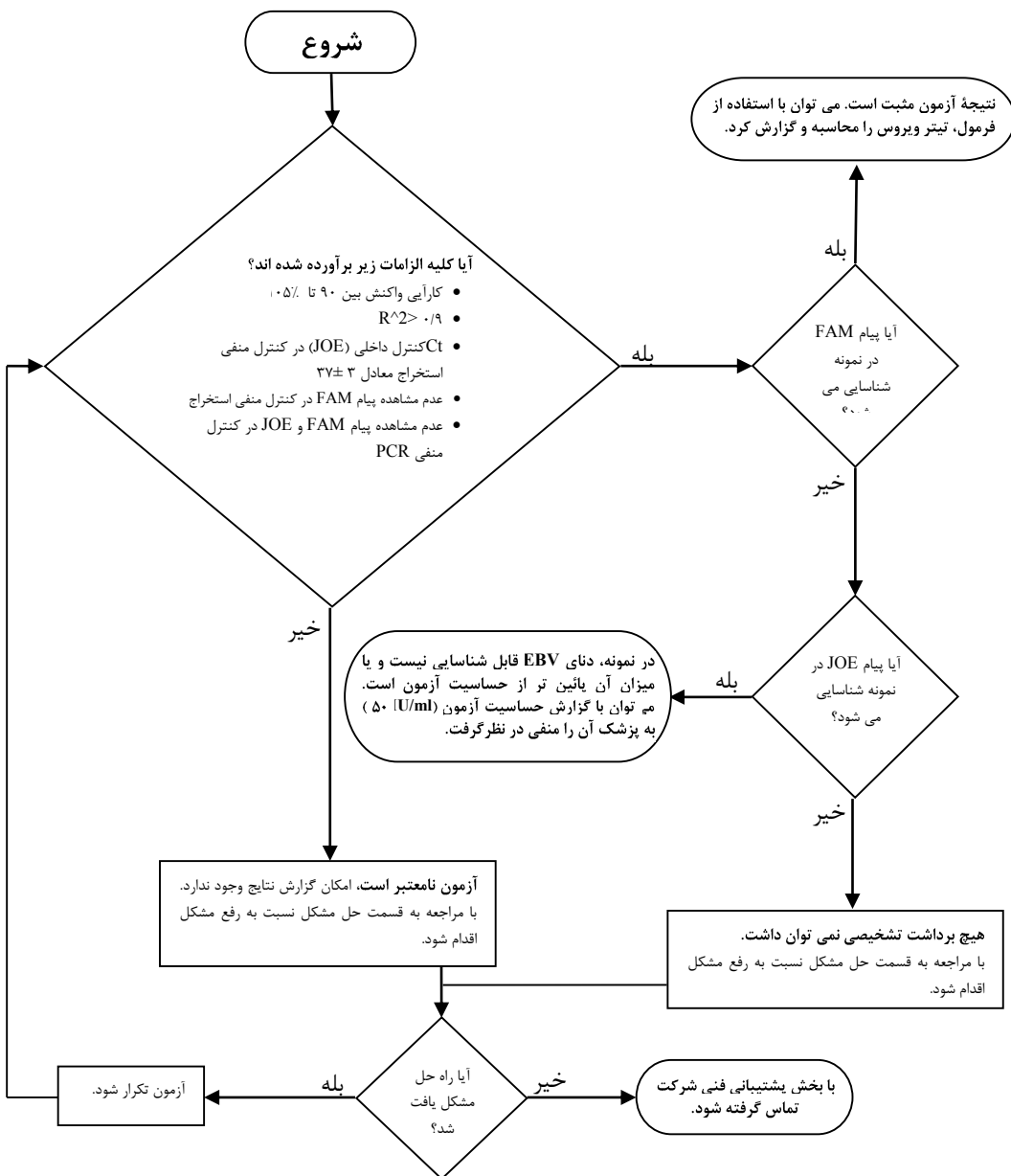
---

<sup>1</sup> Flowchart

<sup>2</sup> Trouble Shooting



## روندنمای تفسیر نتایج و گزارش نهایی





## تعیین تیترو ویروس برحسب IU در هر میلی لیتر پلاسما

استاندارد های کمیّت سنجی این کیت با استفاده از اولین استاندارد بین المللی سازمان بهداشت و سلامت جهانی (WHO) کالیبره شده و بر حسب IU/μl هستند. برای تعیین IU ویروس در هر میلی لیتر از پلاسمای بیمار از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Result (IU/ml)} = \frac{\text{Result (IU/}\mu\text{l)} \times \text{Elution Volume (}\mu\text{l)}}{\text{Sample Volume (ml)}}$$

برای مثال اگر :

- حجم نمونه سرم / پلاسمای مورد استخراج: ۲۰۰ میکرولیتر
  - حجم محصول نهایی استخراج شده: ۵۰ میکرولیتر
  - و تیترو به دست آمده برای نمونه: IU/μl ۱۰۰ باشد
- نتیجه نهایی به صورت زیر محاسبه خواهد شد.

$$\text{نتیجه (IU/ml)} = \frac{۱۰۰ \times ۵۰}{۰/۲}$$

در نتیجه تیترو قابل گزارش حدود IU/ml ۲۵,۰۰۰ در پلاسمای بیمار خواهد بود.

⚠ در نظر داشته باشید که تنها در صورت برقرار بودن شرایط زیر امکان تعیین و گزارش تیترو وجود دارد و در غیر اینصورت می بایست آزمون مجدداً تکرار شود.

$$R^2 > 0/9 \text{ و } ePCR > 90\%$$

نکته: در برگه گزارشی که برای پزشک آماده می کنید حتماً باید به محدوده بازه خطی، حساسیت تحلیلی آزمون و مشخصات کیت مورد استفاده اشاره شود.

لطفاً توجه داشته باشید که به عنوان یک اصل کلی، حجم اولیه نمونه مورد استخراج در معادله فوق لحاظ می گردد بنابراین هنگامی که حجم نمونه مورد استفاده در فرآیند استخراج دچار تغییر می شود (مثلاً تغلیظ نمونه با سانتریفیوژ کردن و یا افزایش حجم با استفاده از بافر فسفات نمکی<sup>۱</sup> برای رساندن آن به میزان مورد نیاز فرآیند استخراج) این تغییر می بایست در نظر گرفته شود. همچنین در صورت غلظت بالاتر نمونه نسبت به بازه خطی، باید ابتدا رقیق سازی صورت گرفته و در هنگام تعیین تیترو، ضریب رقت نیز محاسبه گردد.

<sup>۱</sup> PBS



## حل مشکل

| نشانه (Symptom)                                                                                                                                                                     | علت احتمالی                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | راه حل                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| عدم مشاهده پیام فلورسانس FAM در نمونه های استاندارد ۵ تا ۱                                                                                                                          | عدم انتخاب FAM در هنگام تعریف پروب PCR                                                                                                                                                                                                                                                                                               | به منظور تحلیل صحیح داده ها، می بایستی برای EBV PCR رنگ FAM و برای کنترل داخلی رنگ JOE انتخاب شود.                                                                                                                                                                                                               |
|                                                                                                                                                                                     | شرایط PCR با آنچه در کیت آمده است همخوانی ندارد.                                                                                                                                                                                                                                                                                     | ۱- پروفایل دمایی را با آنچه در روش کار آمده مقایسه کنید.<br>۲- در پروفایل دمایی برنامه PCR مرحله خوانش فلورسانس به طور صحیح انتخاب نشده است.                                                                                                                                                                     |
|                                                                                                                                                                                     | آماده سازی مخلوط واکنش PCR یا ریختن مواد در تیوب ها به صورت نادرست انجام شده است. ممکن است در هنگام آماده سازی مخلوط واکنش دچار خطا شده اید.<br>ممکن است نمونه ها را به طور صحیح در تیوب های مربوط نریخته باشید (جایجا ریخته باشید) یا پلیت/ نوارها/ میکروتیوب ها را دقیقاً در جایگاه های تعریف شده در دستگاه قرار نداده باشید و ... | مراحل کاری/ محاسبات خود را به صورت کامل کنترل کنید و در صورت لزوم آزمایش را تکرار کنید.                                                                                                                                                                                                                          |
| پیام ضعیف یا عدم مشاهده پیام JOE کنترل داخلی در نمونه و یا کنترل منفی که در فرآیند استخراج وارد شده است (Ct خارج از محدوده $3 \pm 3$ ) و به طور همزمان عدم مشاهده پیام FAM در نمونه | شرایط نگهداری یک یا تعداد بیشتری از اجزای کیت مطابق آنچه که در راهنمای کاربری کیت آمده است نبوده و یا این که تاریخ استفاده از کیت به اتمام رسیده است.                                                                                                                                                                                | لطفاً شرایط نگهداری و تاریخ انقضای مواد را کنترل کرده و در صورت لزوم از کیت جدیدی استفاده کنید.                                                                                                                                                                                                                  |
|                                                                                                                                                                                     | شرایط PCR با آنچه در کیت آمده است همخوانی ندارد                                                                                                                                                                                                                                                                                      | مشابه آنچه در قبل آمده است.                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|                                                                                                                                                                                     | واکنش PCR مهار/ ممانعت شده است.                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | ۱- اطمینان حاصل کنید که از روش استخراج مناسبی استفاده کرده اید و دقیقاً مشابه آنچه که در روش کار آمده است عمل کرده اید.<br>۲- اگر از روش هایی با بافرهای شستشوی حاوی اتانول استفاده می کنید، اطمینان حاصل کنید که در طول فرآیند استخراج کلیه مراحل سانتریفوژ کردن را جهت زدودن اتانول باقی مانده انجام داده اید. |
| شرایط نگهداری یک یا تعداد بیشتری از اجزای کیت مطابق آنچه که در کیت آمده نبوده و یا این که تاریخ استفاده از کیت به اتمام رسیده است.                                                  | دنا (DNA) در فرآیند استخراج از دست رفته است.                                                                                                                                                                                                                                                                                         | اطمینان حاصل کنید که از روش استخراج مناسبی با کارایی بیش از ۷۰٪ استفاده کرده اید و دقیقاً مشابه آنچه که در روش کار آمده است عمل کرده اید.                                                                                                                                                                        |
|                                                                                                                                                                                     | مشابه آنچه در قبل آمده است.                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | مشابه آنچه در قبل آمده است.                                                                                                                                                                                                                                                                                      |





| نشانه (symptom)                                         | علت احتمالی                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | راه حل                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| مشاهده پیام FAM در نمونه های کنترل منفی (استخراج و PCR) | در خلال آماده سازی مواد برای PCR، آلودگی رخ داده است.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | ۱- PCR را با استفاده از مواد تازه تکرار کنید.<br>۲- اگر امکان پذیر است، بلافاصله پس از اضافه کردن نمونه ها درب تیوب ها را ببندید.<br>۳- کنترل های مثبت را با دقت و آخر از همه نمونه ها آماده کنید.<br>۴- اطمینان حاصل کنید که محل کار و دستگاه در فواصل زمانی مشخص آلودگی زدایی شوند.                                                                                                                                                                             |
|                                                         | در خلال فرآیند استخراج آلودگی رخ داده است.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | ۱- یک نمونه پلاسمای منفی (غیر از آنچه داخل کیت است) را استخراج کنید تا آلوده بودن یا نبودن کیت استخراج را کنترل کنید.<br>۲- در صورت آلوده نبودن کیت، مجدداً استخراج نمونه ها را با دقت بیشتری انجام دهید (به عنوان کنترل منفی از پلاسمای منفی جدید استفاده کنید).<br>۳- در صورت آلوده بودن کیت، کیت جدیدی تهیه کرده و استخراج نمونه های مورد آزمایش را با کیت جدید انجام دهید.<br>۴- اطمینان حاصل کنید که محل کار و دستگاه در فواصل زمانی مشخص آلودگی زدایی شوند. |
| کارایی پائین (کمتر از ۹۰٪)                              | شرایط نگهداری یک یا تعداد بیشتری از اجزای کیت مطابق آنچه که در کیت آمده نبوده و یا این که تاریخ استفاده از کیت به اتمام رسیده است.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | مشابه آنچه در قبل آمده است.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                         | شرایط PCR با آنچه در کیت آمده است همخوانی ندارد.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | مشابه آنچه در قبل آمده است.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                         | دستگاه Real-time PCR کالیبره نیست<br><b>کالیبره نبودن بخش نوری دستگاه:</b> این امر از طریق تأثیر در شدت فلوئورسانس شناسایی شده (به ویژه در غلظت های پائین) و اثر آن بر استاندارد شماره ۵ می تواند باعث ایجاد کارایی پائین شده و هم اینکه در مورد نمونه های با غلظت کم ممکن است موجب بروز منفی کاذب شود.<br><b>کالیبره نبودن بخش دمایی (ترمال) دستگاه:</b> این امر موجب ایجاد دماهایی غیر از آنچه برای واکنش بهینه است شده و باعث کاهش کارایی و نیز در مورد نمونه های با تعداد تیتراژ پائین ممکن است موجب بروز منفی کاذب شود. | اطمینان حاصل کنید که دستگاه کالیبره است (معمولاً توصیه شرکت های سازنده کنترل و کالیبراسیون هر ۶ ماه یکبار یا حداکثر هر یک سال یکبار است)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| کارایی بالا (بیشتر از ۱۰۵٪)                             | عمده ترین دلیل کارایی بالا (غیر معمول) کالیبره نبودن سمپلرها است.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | از کالیبره بودن سمپلرها اطمینان حاصل کنید و در صورت نیاز برای کالیبراسیون اقدام کنید.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |



- CLSI Standard EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods, Second edition
- ISO/IEC Guide 37:2012(en) Instructions for use of products by consumers.
- ISO 15223:2016 Medical devices — Symbols to be used with medical device labels, labelling and information to be supplied.



## پش بانی فنی

- برای پشتیبانی فنی لطفاً با realtime@dyna-bio.com یا تلفن ۴۳۹۰۸۰۰۰ تماس بگیرید.
- اگر کیفیت هریک از خدمات/محصولات ما مطابق درخواست شما نبوده است لطفاً فرم "اعلام عدم رضایت/ازکارکرد محصول" را در سایت شرکت بیابید، آن را تکمیل کرده و برای ما ارسال نمایید. شما می‌توانید با گرفتن شماره پیگیری مربوط، تا دریافت نتیجه نهایی، روند بررسی را پیگیری نمایید.

## نشانی دفتر مرکزی

تهران، خیابان سهروردی شمالی، خیابان افشار جوان، پلاک ۱۸، طبقه اول.

## نشانی واحد تولید

پارک فناوری پردیس، نوآوری ۴، پلاک ۴۳، واحدهای ۱۰۵ و ۱۰۶.



**DynaBio™** is a registered trademark of Takapouzist Co.

**DynaBio™** علامت تجاری ثبت شده متعلق به شرکت تکاپوزیست است.





---

## یادداشت



## یادداشت



تکاپو زیست  
سراشی مطمئن در  
زیست مولسکولی

تلفن: ۴۳۹۰۸۰۰۰

---

پشتیبانی فنی: [realtime@dyna-bio.com](mailto:realtime@dyna-bio.com)

---