



راهنمای کاربری

کیت شناسایی، سنجش کمی و تعیین نوع

ویروس‌های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲ به روش Real-Time PCR

**DynaBio™** HSV 1&2 Detection, Quantification &  
Typing Real-Time PCR Kit

ویرایش ۱/۲  
اردیبهشت ماه ۱۴۰۱

۵۰ آزمون

شناسه: ک ر ۰۰۷۵

Cat # KR0075

تکاپوزیت



## 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 های هرپس سیمپلکس نوع ۱ و ۲ و بیماری زایی آنها
	ویژگی های عملکردی
۹	حساسیت تحلیلی
۱۰	ویژگی تحلیلی
۱۱	بازه خطی
۱۱	دقت
۱۴	سایر مواد و وسایل مورد نیاز (که در کیت ارائه نشده)
۱۴	توصیه های عمومی
۱۵	جمع آوری، نگهداری و حمل و نقل نمونه
۱۵	نگهداری نمونه
۱۵	حمل و نقل نمونه ها
۱۵	مواد تداخل کننده





۱۶

معرفی اجزای کیت

روش کار

۱۸

استخراج دنا (DNA)

انجام آزمون Real-time PCR

۱۹

نکات عمومی

۲۰

آماده سازی مخلوط اصلی واکنش

۲۱

برنامه واکنش PCR

تحلیل داده ها

۲۵

تفسیر و گزارش نتایج

۲۷

روندنمای تفسیر نتایج و گزارش نهایی برای HSV1

۲۸

روندنمای تفسیر نتایج و گزارش نهایی برای HSV2

۲۹

تعیین تیترو ویروس بر حسب IU در هر میلی لیتر نمونه

۳۰

حل مشکل

۳۲

مراجع / استانداردهای مورد استفاده

۳۲

پشتیبانی فنی

۳۲

نشانی





## اطلاعات کلی

### محتویات

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

### نگهداری

کیت می بایست در دمای  $-20^{\circ}\text{C}$  نگهداری شود. برای اطلاع از شماره سری ساخت<sup>۳</sup> و تاریخ انقضای کیت به برچسب روی جعبه کیت رجوع شود. برای جلوگیری از کاهش حساسیت آزمون، از ذوب و انجماد<sup>۴</sup> مکرر مواد (بیش از ۵ بار) خودداری گردد.

<sup>1</sup> Internal Positive Control

<sup>2</sup> No Template Control

<sup>3</sup> Lot#

<sup>4</sup> Freeze & thawing





۲














## اطلاعات ایمنی

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

## کنترل کیفیت

هر سری ساخت "کیت شناسایی، سنجش کمی و تعیین نوع ویروس های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲" 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، سنجش کمی و تعیین نوع ویروس های هرپس سیمپلکس نوع ۱ و ۲ 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 ۱۰۶ جفت بازی کاملاً حفظ شده<sup>۲</sup> از ژنوم ویروس ها انجام می شود. اینکار با استفاده از پروب اختصاصی مربوط (دارای رنگ فلئورسانس FAM در انتهای ۵' به عنوان گزارش کننده و BHQ1 در انتهای ۳' به عنوان خاموش کننده) برای HSV1 و پروب اختصاصی مربوط (دارای رنگ فلئورسانس JOE در انتهای ۵' به عنوان گزارش کننده و BHQ1 در انتهای ۳' به عنوان خاموش کننده) برای HSV2 انجام می شود. کنترل داخلی TexasRed شده در این کیت (شناسایی شده توسط پروب اختصاصی دارای رنگ فلئورسانس TexasRed در انتهای ۵' به عنوان گزارش کننده و BHQ2 در انتهای ۳' به عنوان خاموش کننده)، صحت فرآیند استخراج و عدم وجود بازدارنده های احتمالی PCR را کنترل می کند.

## محد یات 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 در تیوب ها بعد از اتمام واکنش)
  - کاهش خطاهای کاربری/ نیروی انسانی
۴. امکان خودکارسازی (اتوماسیون)

در حال حاضر مبانی 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 DNA دو رشته ای متصل می شوند (همانند SYBR Green). از آنجا که پیام<sup>۴</sup>/ پاسخ دریافتی می تواند مربوط به هر DNA 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. ...

---

<sup>۱</sup> Specific Methods

<sup>۲</sup> Minimal Residual Disease





## ویروس های هرپس سیمپلکس نوع ۱ و ۲ و بیماری زایی آنها

عفونت با ویروس های HSV1 و HSV2 بسیار شایع است. آلودگی با این ویروس ها در افراد دارای سیستم ایمنی طبیعی معمولاً مشکلات جدی ایجاد نمی کند. با این وجود فعال شدن مجدد ویروس در سیستم عصبی مرکزی ممکن است اتفاق بیفتد که می تواند منجر به نشانه های کلینیکی گسترده از مننژیت ساده<sup>۱</sup> تا انسفالیت شدید<sup>۲</sup> شود (که در صورت درمان نشدن مرگ و میر بالای ۷۰٪ را به همراه دارد).

عفونت اولیه در نوزادان یا فعال شدن مجدد ویروس در افراد دارای نقص در سیستم ایمنی می تواند با نرخ بالاتر ابتلا به مننژیت، انسفالیت و عفونت های چشمی خطرناک همراه باشد.

روش کلاسیک شناسایی عفونت های ناشی از هرپس سیمپلکس کشت ویروس بوده است، اما این روش هم وقت گیر است و هم حساسیت آن بویژه در نمونه های مایع مغزی نخاعی<sup>۳</sup> (CSF) پایین است.

اگر شناسایی ویروس در مراحل آغازین عفونت صورت گیرد، امکان انجام درمان های ضدویروسی به صورت موثر وجود دارد. بنابراین روش های سریع تر و حساس تر مبتنی بر PCR به طور گسترده ای برای تشخیص عفونت های HSV مورد استفاده قرار می گیرند. در حال حاضر Real-time PCR امکان شناسایی همزمان HSV1 و HSV2 و سنجش کمی تعداد نسخ ویروس با حساسیت بالا را فراهم آورده است.

---

<sup>1</sup> Mild Meningitis

<sup>2</sup> Severe Encephalitis

<sup>3</sup> Cerebrospinal fluid





## ویژگی های عملکردی

### حساسیت تحلیلی<sup>۱</sup>

حد تشخیص تحلیلی "کیت شناسایی، سنجش کمی و تعیین نوع ویروس های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲" مستقل از حساسیت روش استخراج به کار رفته تعیین شده است. برای تعیین حساسیت تحلیلی این کیت، برای HSV1 یک سری رقت متوالی از غلظت اسمی ۱ تا ۰/۷۵ Copy/μl از DNAی HSV1 آماده و برای HSV2 یک سری رقت متوالی از غلظت اسمی ۱ تا ۰/۱ Copy/μl از DNAی HSV2 آماده و با استفاده از این کیت ارزیابی شدند. استفاده از ۱۰ تکرار از هر نمونه و انجام آزمون منجر به تعیین حساسیت تا ۰/۷۵ Copy/μl برای HSV1 و ۱ Copy/μl برای HSV2 گردید (با pValue معادل ۰/۰۵). این بدان معنی است که به احتمال بیش از ۹۵٪، مقادیر ۰/۷۵ Copy/μl از DNAی HSV1 و ۱ Copy/μl از DNAی HSV2 قابل شناسایی خواهند بود.

---

<sup>۱</sup> Analytical Sensitivity





## ویژگی تحلیلی<sup>۱</sup>

ویژگی (اختصاصیت) تحلیلی "کیت شناسایی، سنجش کمی و تعیین نوع ویروس های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲" 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.

نتایج	مشخصات
منفی	Varicella Zoster Virus
منفی	Human Cytomegalovirus
منفی	2nd WHO International Standard for Hepatitis B DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay
منفی	Epstein-Barr Virus
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 دناي (DNA) ژنومي انسان

<sup>۱</sup> Analytical Specificity

<sup>۲</sup> Cross Reactivity





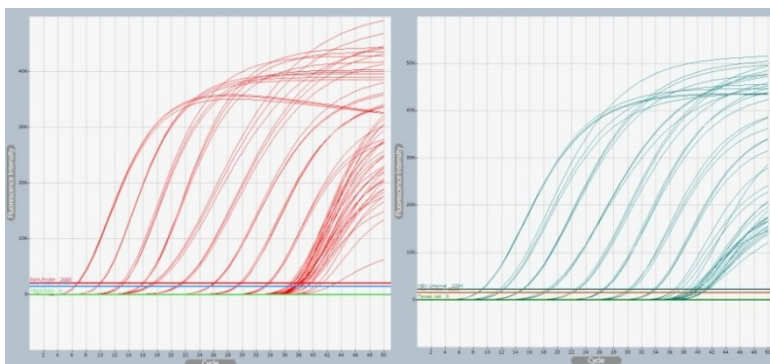
## بازۀ خطی<sup>۱</sup>

بازۀ خطی (سنجش تحلیلی) " کیت شناسایی، سنجش کمی و تعیین نوع ویروس های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲" با تجزیه و تحلیل یکسری از رقت های استاندارد دنای HSV1 در بازۀ  $2 \times 10^9$  Copies/ $\mu$ l تا  $0.75$  و HSV2 در بازۀ  $5 \times 10^8$  Copies/ $\mu$ l تا  $0.1$  تعیین شد.

نتیجه نشان می دهد که:

بازۀ خطی این کیت برای HSV1 (تصویر سمت چپ)، از غلظت حداقل  $2/5$  Copies/ $\mu$ l تا  $10^9$  Copies/ $\mu$ l را تحت پوشش قرار می دهد.

بازۀ خطی این کیت برای HSV2 (تصویر سمت راست)، از غلظت حداقل  $5$  Copies/ $\mu$ l تا  $5 \times 10^8$  Copies/ $\mu$ l را تحت پوشش قرار می دهد.



## دقت<sup>۲</sup>

داده های دقت کیت شناسایی، سنجش کمی و تعیین نوع ویروس های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲ 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).

<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





داده های دقت کیت شناسایی، سنجش کمی و تعیین نوع ویروس های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲ با استفاده از دو نمونه از استانداردهای کمی سنجی (استاندارد ۱: ۱۰,۰۰۰ Copies/μl و استاندارد ۳: ۱۰۰ Copies/μl) جمع آوری شدند. آزمون در ۶ 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>۱</sup>، واریانس و ضریب وردش<sup>۲</sup> واکنش PCR اختصاصی پاتوژن استفاده شدند. داده های دقت بر مبنای مقادیر چرخه آستانه<sup>۳</sup> (C<sub>t</sub>) محاسبه شدند. همچنین از روی این مقادیر، داده های نتایج کمی بر حسب Copy/μl نیز محاسبه گردید.

نام آزمون	انحراف معیار بر حسب Ct	وردایی (واریانس) بر حسب Ct	CV بر حسب Ct	انحراف معیار بر حسب Copy	وردایی (واریانس) بر حسب Copy	CV بر حسب Copy
وردش درون آزمونی Intra Assay variation	۰/۰۹	۰/۰۰۸	٪۰/۳۲	۸۲۹	۶۸۸۸۸۸	٪۵/۶۸
وردش بین آزمونی Inter Assay variation	۰/۳۷	۰/۱۴	٪۱/۳۸	۲۷۸۵	۷۷۵۷۶۶۳	٪۲۲/۵۷
وردایی کل Total variance	۰/۳۸	۰/۱۴۸	٪۱/۴۲	۲۹۰۶	۸۴۴۶۵۵۱	٪۲۳/۵

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

نام آزمون	انحراف معیار بر حسب Ct	وردایی (واریانس) بر حسب Ct	CV بر حسب Ct	انحراف معیار بر حسب Copy	وردایی (واریانس) بر حسب Copy	CV بر حسب Copy
وردش درون آزمونی Intra Assay variation	۰/۱۶	۰/۰۳	٪۰/۴۷	۱۰/۹	۱۱۸	٪۱۱
وردش بین آزمونی Inter Assay variation	۰/۳۸	۰/۱۴	٪۱/۱	۱۶/۸	۲۸۳	٪۱۷/۲
وردایی کل Total variance	۰/۴۱	۰/۱۷	٪۱/۲	۲۰	۴۰۱	٪۲۰/۵

جدول ۲: داده های دقت برای استاندارد شماره ۳ (دستگاه Exicycler96)

<sup>۱</sup> SD: Standard Deviation

<sup>۲</sup> CV: Coefficient of Variation

<sup>۳</sup> C<sub>t</sub>: Cycle of threshold



نام آزمون	انحراف معیار بر حسب Ct	وردایی (واریانس) بر حسب Ct	CV بر حسب Ct	انحراف معیار بر حسب Copy	وردایی (واریانس) بر حسب Copy	CV بر حسب Copy
وردش درون آزمونی Intra Assay variation	۰/۱۱	۰/۰۱۱	٪۰/۴۲	۶۸۳	۴۶۶۷۳۸	٪۶/۹
وردش بین آزمونی Inter Assay variation	۰/۶۱	۰/۳۷	٪۲/۴	۱۱۷۶	۱۳۸۳۳۷۷	٪۱۳/۱
وردایی کل Total variance	۰/۶۲	۰/۳۸	٪۲/۴	۱۳۶۰	۱۸۵۰۱۱۵	٪۱۵/۱

جدول ۳: داده های دقت برای استاندارد شماره ۱ (دستگاه Rotor Gene Q)

نام آزمون	انحراف معیار بر حسب Ct	وردایی (واریانس) بر حسب Ct	CV بر حسب Ct	انحراف معیار بر حسب Copy	وردایی (واریانس) بر حسب Copy	CV بر حسب Copy
وردش درون آزمونی Intra Assay variation	۰/۱۵	۰/۰۲۱	٪۰/۴۵	۱۲/۵	۱۵۶	٪۹/۶۲
وردش بین آزمونی Inter Assay variation	۰/۴۲	۰/۱۷	٪۱/۲۸	۲۱/۴	۴۵۸	٪۲۲
وردایی کل Total variance	۰/۴۴	۰/۱۹	٪۱/۳۴	۲۴/۸	۶۱۴	٪۲۵/۵

جدول ۴: داده های دقت برای استاندارد شماره ۳ (دستگاه Rotor Gene Q)



## 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>
- لرزانک (ورتنکس)<sup>۲</sup>
- چرخانک (اسپین)<sup>۳</sup>
- میکروپیوژ با دور ۲۰۰۰ 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 Cycler (Mic)
- هود PCR
- ماژیک (مارکر)

## توصیه‌های عمومی

- از سر سمپلرهای استریل فیلتر دار 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 پرتودهی 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>1</sup> DNase RNase Free

<sup>2</sup> Vortex

<sup>3</sup> Spin

<sup>4</sup>Strip







- نمونه های مثبت (اعم از پلاسما، کنترل ها و محصول واکنش زنجیره ای پلی مرز<sup>۱</sup>) را به دور از مواد دیگر، استخراج و نگهداری نموده، در فضای جداگانه ای آن ها 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 (ورتکس) مخلوط کنید و سپس با استفاده از چرخانک (اسپین) از تجمع محتویات لوله ها در انتهای آنها (پائین آمدن مواد از دیواره ها) مطمئن شوید.

## جمع آوری، نگهداری و حمل و نقل نمونه

### نگهداری نمونه

حداکثر تا ۶ ساعت پس از خون گیری، خون کامل می بایست 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.

مایع مغزی نخاعی و مایع چشمی، می بایستی در دمای  $2^{\circ}\text{C}$  تا  $8^{\circ}\text{C}$  نگهداری شوند و حداکثر ظرف مدت ۲۴ ساعت پس از جمع آوری نمونه مورد استفاده قرار گیرند.

### حمل و نقل نمونه ها

به عنوان یک اصل کلی همه نمونه ها می بایست بالقوه بیماری زا تلقی شوند. نمونه ها باید در محفظه ای مقاوم جابجا شوند تا از خطر انتشار آلودگی پیش گیری شود. نمونه ها می بایست مطابق دستورالعمل های محلی و ملی برای حمل مواد بیماری زا جابجا شوند. نمونه ها می بایست در شرایط خنک ( $2^{\circ}\text{C}$  تا  $8^{\circ}\text{C}$ ) و یا به صورت منجمد ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) حمل شوند.

### 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.

<sup>1</sup> Polymerase Chain Reaction (PCR)



## 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 ویروس ها و کنترل داخلی اضافه شده به نمونه هاست.

### • استانداردهای سنجش کمی شماره ۱ تا ۴

این استانداردها (با میزان مشخص نسخ ویروس های HSV1 و HSV2 بر حسب Copy) امکان ترسیم یک نمودار استاندارد برای هر یک از ویروس ها را فراهم می آورد. معادله حاکم بر این نمودارهای 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:

$$R^2 > 0.99 \text{ و } ePCR > 90\% \text{ و } 1.05$$

### • کنترل داخلی (PC)

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 استخراج ایجاد می شود. انحراف

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



بیش از این دلالت بر بروز مشکل در فرآیند استخراج دارد. در این 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 (۱.T.C)

کنترل منفی، نمونه پلاسمایی است که از نظر وجود دنای HSV1 و HSV2 منفی است. این پلاسما همانند یک نمونه و با اضافه کردن کنترل داخلی به آن استخراج می‌شود. وجود سیگنال کنترل داخلی (TexasRed) در این نمونه منفی و عدم وجود سیگنال HSV1 (FAM) و HSV2 (JOE) 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 ( $C_t$ ) کنترل داخلی در این نمونه می‌بایست  $37 \pm 3$  باشد.




## استخراج اسیدهای نوکلئیک ویروسی

کیت های استخراج اسیدهای نوکلئیک ویروسی توسط سازندگان بسیاری ارایه می گردد. میزان نمونه مورد نیاز برای فرآیند استخراج بسته به روش کار، متفاوت است. لطفاً فرآیند استخراج 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<sup>۱</sup> به نمونه دیگر<sup>۲</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 تواند کارایی بیش از ۷۰٪ داشته باشند، اشاره شده است:

نام کیت	شناسه (Cat#)	سازنده
کیت استخراج اسیدهای نوکلئیک ویروسی (DNA/RNA) <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 های با تیتراژ پائین ویروس مشاهده می شود. در نمونه هایی 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 سمپلرهای تان 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 کم آوردن 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 (ورتنس) 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 ۴ نمونه استاندارد توصیه می شود. برای اطمینان بیشتر نسبت به نتایج 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 کمی	۴
کنترل منفی استخراج شده	۱
آب تزریقی (کنترل منفی PCR)	۱
نمونه های مجهول (بیمار) استخراج شده	X
جمع کل	X+۶

در هر تیوب مخصوص Real-time PCR، ۱۵ میکرولیتر از مخلوط آماده شده و ۱۰ میکرولیتر از دمای نمونه مورد آزمایش/ استانداردها/ کنترل مثبت/ 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 مربوطه در دستگاه قرار دهید. دقت کنید تا هر نمونه در جایگاه تعریف شده خود قرار بگیرد.



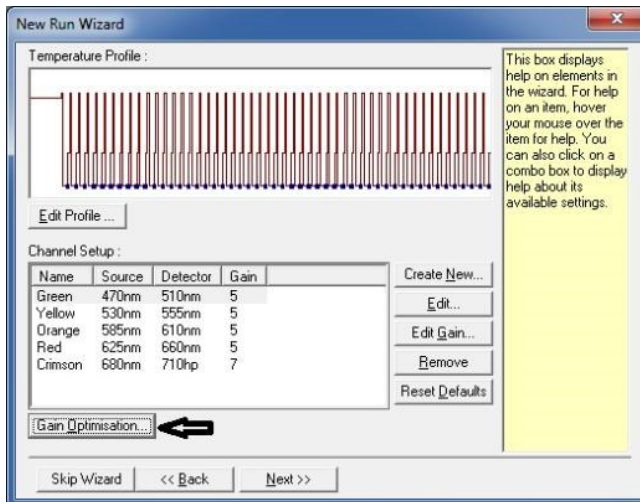
## برنامه واکنش PCR

تکرار	زمان	دما (درجه سانتیگراد)
۱ چرخه	۵ دقیقه	۹۵
۵۰ چرخه	۱۵ ثانیه	۹۵
	۵۰ ثانیه	۵۵
	-	خوانش (Scan) فلورسانس نمونه ها
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• FAM برای HSV1</li> <li>• JOE برای HSV2</li> <li>• TexasRed برای کنترل داخلی</li> </ul>

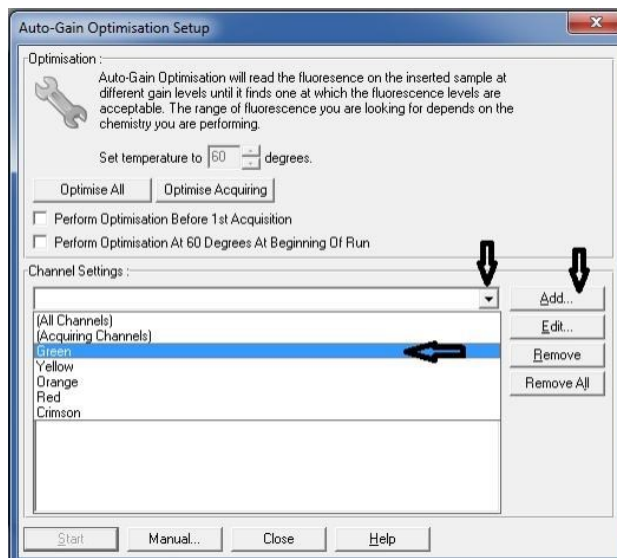
### نکته:

۱. لطفاً توجه داشته باشید در صورت استفاده از مدل‌هایی از دستگاه‌های Real-Time PCR (برخی انواع برند ABI و...) که از Reference Dye بهره می‌گیرند: حتماً تیک کانال ROX به عنوان مرجع خاموش باشد (به دلیل شناسایی سیگنال Texas Red در کانال ROX).

۲. در دستگاه‌های 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.

Auto-Gain Optimisation Channel Settings

Channel Settings :

Channel : Green      Tube Position : 1

Target Sample Range : 5 FI up to 10 FI.

Acceptable Gain Range: -10 to 10

OK      Cancel      Help

همین کار را برای رنگ‌های Yellow و Orange نیز تکرار کنید. همانند شکل زیر، ابتدا دما را در قسمت set temperature روی ۵۵ درجه تنظیم نمایید. سپس گزینه Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition را تیک بزنید و روی Close کلیک کنید.

Auto-Gain Optimisation Setup

Optimisation :

Auto-Gain Optimisation will read the fluorescence on the inserted sample at different gain levels until it finds one at which the fluorescence levels are acceptable. The range of fluorescence you are looking for depends on the chemistry you are performing.

Set temperature to 55 degrees.

Optimise All      Optimise Acquiring

☒ Perform Optimisation Before 1st Acquisition

☐ Perform Optimisation At 55 Degrees At Beginning Of Run

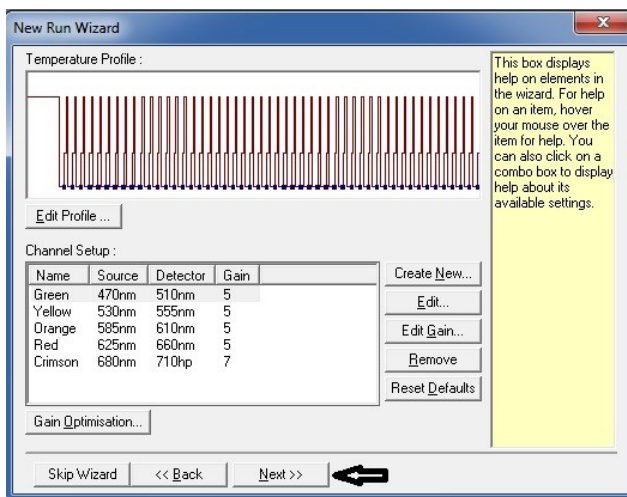
Channel Settings :

Name	Tube Position	Min Reading	Max Reading	Min Gain	Max Gain
Green	1	5FI	50FI	-10	10
Yellow	1	5FI	50FI	-10	10
Orange	1	5FI	50FI	-10	10

Start      Manual...      Close      Help



همانند شکل زیر روی Next کلیک کنید.



۳. 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 در هر دو کانال FAM و JOE بین ۹۰ تا ۱۰۵٪ باشد.
  - $R^2 > 0.9$  باشد.
  - Ct کنترل داخلی (TexasRed) در کنترل منفی استخراج معادل  $3 \pm 37$  باشد.
  - پیام FAM و JOE در کنترل منفی استخراج مشاهده نشود.
  - پیام FAM ، JOE و TexasRed 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:

HSV1 (FAM)	+	-	+	-	-
HSV2 (JOE)	-	+	+	-	-
کنترل داخلی (Texas)	*+/-	*+/-	*+/-	+	-
نتیجه آزمون (Result)	HSV1 مثبت	HSV2 مثبت	HSV1&2 مثبت	منفی	نامعتبر (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<sup>۱</sup> تفسیر نتایج و گزارش نهایی در صفحه های بعد آمده است.

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

**نتیجه آزمون مثبت است: نمونه حاوی دنای HSV2 است.**

در این حالت، ممکن است پیام TexasRed دیده نشود. زیرا غلظت های بالای دنای HSV2 می تواند منجر به کاهش یا حذف سیگنال کنترل داخلی گردد.

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

**نتیجه آزمون مثبت است: نمونه حاوی دنای HSV1 است.**

در این حالت، ممکن است پیام TexasRed دیده نشود. زیرا غلظت های بالای دنای HSV1 می تواند منجر به کاهش یا حذف سیگنال کنترل داخلی گردد.

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

**نتیجه آزمون مثبت است: نمونه هم حاوی دنای HSV1 و هم HSV2 است.**

در این حالت، ممکن است پیام TexasRed دیده نشود. زیرا غلظت های بالای دنای HSV1 و HSV2 می تواند منجر به کاهش یا حذف سیگنال کنترل داخلی گردد.

۴. پیام (سیگنال) FAM و یا JOE 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>

<sup>۱</sup> Flowchart

<sup>۲</sup> Trouble Shooting



۵. پیام (سیگنال) FAM و یا JOE در نمونه شناسایی نمی شود ولی پیام TexasRed (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 HSV1 یا HSV2 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.

۶. نه پیام (سیگنال) FAM، نه پیام JOE و نه پیام TexasRed در نمونه شناسایی نمی شوند.

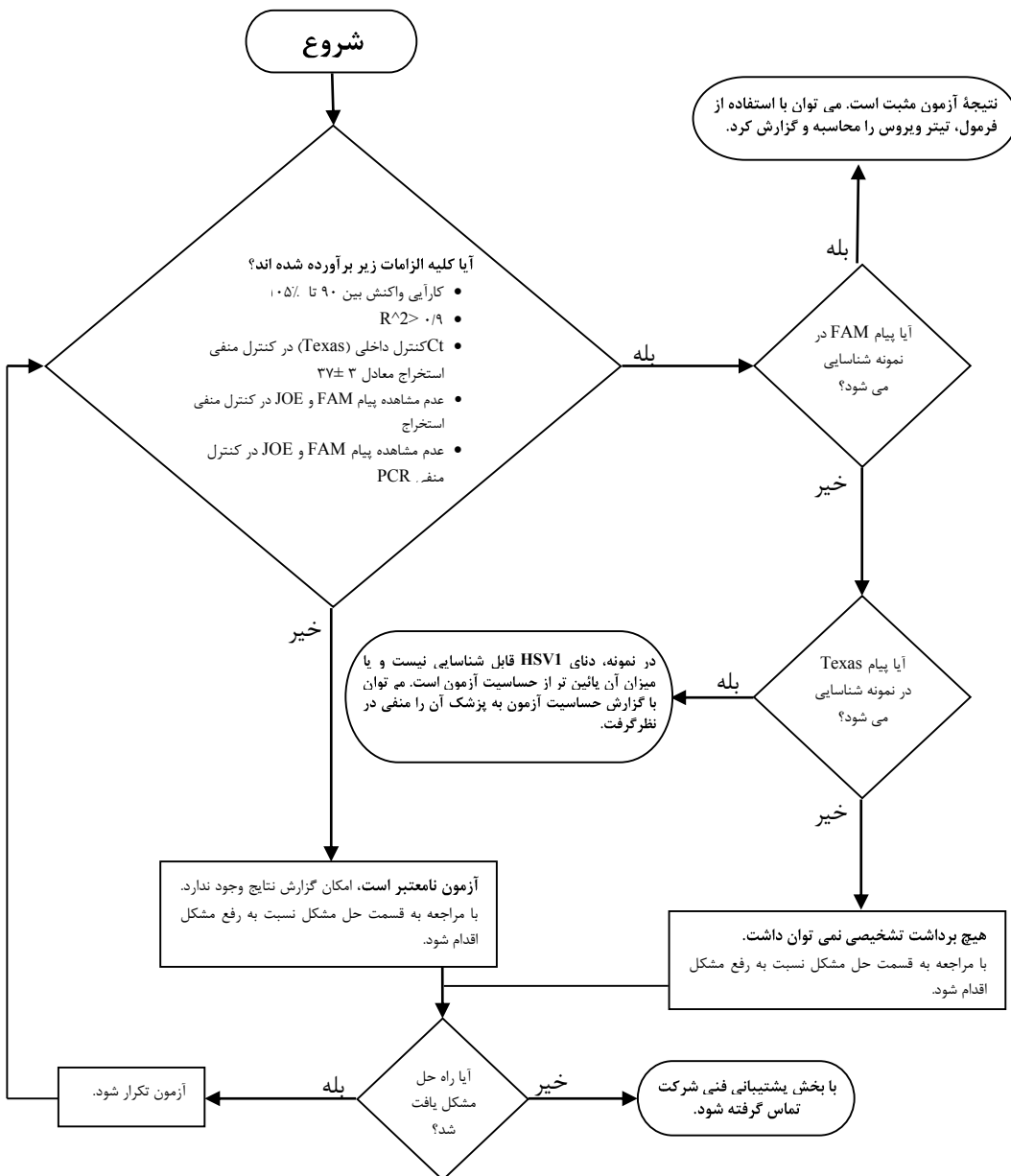
هیچ برداشت تشخیصی نمی توان داشت.

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

، 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...).

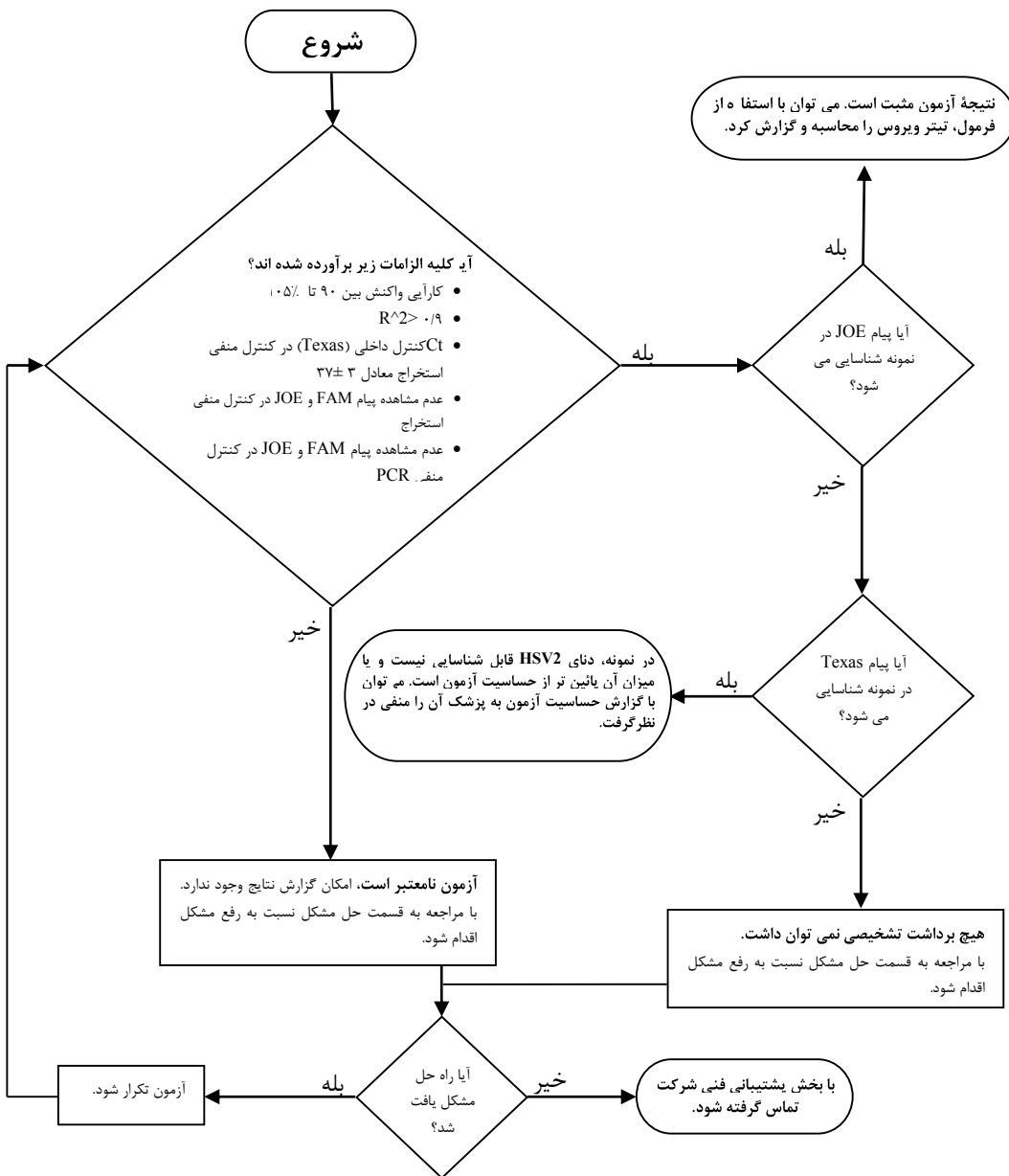


## روندنمای تفسیر نتایج و گزارش نهایی برای HSV1





## روندنمای تفسیر نتایج و گزارش نهایی برای HSV2





## تعیین تیر ویروس بر حسب Copy در هر میلی لیتر نمونه

استاندارد های کمیت سنجی این کیت بر حسب Copy/μl هستند. برای تعیین Copy ویروس در هر میلی لیتر از نمونه مورد آزمایش از معادله زیر استفاده کنید:

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

برای مثال اگر :

- حجم نمونه (سرم/ پلاسما/...) مورد استخراج: ۲۰۰ میکرولیتر
  - حجم محصول نهایی استخراج شده: ۵۰ میکرولیتر
  - و تیتراژ به دست آمده برای نمونه: ۱۰۰ Copies/μl باشد
- نتیجه نهایی به صورت زیر محاسبه خواهد شد.

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

در نتیجه تیتراژ قابل گزارش حدود ۲۵,۰۰۰ Copies/ml در نمونه مورد آزمایش خواهد بود.

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

$$R^2 > ۰/۹ \text{ و } \text{ePCR} > ۹۰\% \text{ و } ۱۰۵\%$$

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.

<sup>۱</sup> PBS







## حل مشکل

نشانه (symptom)	علت احتمالی	راه حل
عدم مشاهده پیام فلورسانس FAM و یا JOE در نمونه های استاندارد ۱ تا ۴	عدم انتخاب FAM و یا JOE در هنگام تعریف پروب PCR	به منظور تحلیل صحیح داده ها، می بایستی برای HSV1 PCR، رنگ FAM، برای HSV2 PCR، رنگ JOE و برای کنترل داخلی رنگ TexasRed انتخاب شود.
	شرایط PCR با آنچه در کیت آمده است همخوانی ندارد.	۱- پروفایل دمایی را با آنچه در روش کار آمده مقایسه کنید. 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. ممکن است نمونه ها را به طور صحیح در تیوب های مربوط نریخته باشید (جابجا ریخته باشید) یا پلیت/ نوارها/ میکروتیوب ها را دقیقاً در جایگاه های تعریف شده در دستگاه قرار ندادید و ...	مراحل کاری/ محاسبات خود را به صورت کامل کنترل کنید و در صورت لزوم آزمایش را تکرار کنید.
	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.
پیام ضعیف یا عدم مشاهده پیام TexasRed کنترل داخلی که در نمونه و یا کنترل منفی که در فرآیند استخراج وارد شده است (Ct خارج از محدوده $3 \pm 37$ ) و به طور همزمان عدم مشاهده پیام FAM و یا JOE در نمونه	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. 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.
	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.
	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.



نشانه (Symptom)	علت احتمالی	راه حل
مشاهده پیام FAM و یا JOE در نمونه های کنترل منفی استخراج و یا مشاهده پیام FAM، JOE و یا TexasRed در نمونه کنترل منفی PCR	در خلال آماده سازی مواد برای PCR، آلودگی رخ داده است.	۱- PCR را با استفاده از مواد تازه تکرار کنید. ۲- اگر امکان پذیر است، بلافاصله پس از اضافه کردن نمونه ها درب تیوب ها را ببندید. ۳- کنترل های مثبت را با دقت و آخر از همه نمونه ها آماده کنید. 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 منفی (غیر از آنچه داخل کیت است) را استخراج کنید تا آلوده بودن یا نبودن کیت استخراج را کنترل کنید. ۲- در صورت آلوده نبودن کیت، مجدداً استخراج نمونه ها را با دقت بیشتری انجام دهید (به عنوان کنترل منفی از نمونه منفی جدید استفاده کنید). ۳- در صورت آلوده بودن کیت، کیت جدیدی تهیه کرده و استخراج نمونه های مورد آزمایش را با کیت جدید انجام دهید. ۴- اطمینان حاصل کنید که محل کار و دستگاه در فواصل زمانی مشخص آلودگی زدایی شوند.	
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.	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.	شرایط PCR با آنچه در کیت آمده است همخوانی ندارد.	مشابه آنچه در قبل آمده است.
کارآیی پائین (کمتر از ۹۰٪)	دستگاه Real-time PCR کالیبره نیست <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 ۴ می تواند باعث ایجاد کارآیی پائین شده و هم اینکه در مورد نمونه های با غلظت کم ممکن است موجب بروز منفی کاذب شود. <b>کالیبره نبودن بخش دمایی (ترمال) دستگاه:</b> این امر موجب ایجاد دماهایی غیر از آنچه برای واکنش بهینه است شده و باعث کاهش کارآیی و نیز در مورد نمونه های با تعداد تیترا 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)
کارآیی بالا (بیشتر از ۱۰۵٪)	عمده ترین دلیل کارآیی بالا (غیر معمول) کالیبره نبودن سمپلرها است.	از کالیبره بودن سمپلرها اطمینان حاصل کنید و در صورت نیاز برای کالیبراسیون اقدام کنید.



## مراجع / استانداردهای مورد استفاده

- 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.

## پشتیبانی فنی

- برای پشتیبانی فنی لطفاً با [realtime@dyna-bio.com](mailto: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 از کارکرد 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



---

## یادداشت



تکابو زیست

مراهمی مطمئن در  
زیست مولی‌سکولی

تلفن: ۴۳۹۰۸۰۰۰

---

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

---