



دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کمی

ویروس HIV-1

با روش

RT-qPCR



Doc. #: IFU-HIV-01 Doc. Version: 05 Revision Date: 07-25-2023

شرح کیت.....	۳
اصول.....	۳
اطلاعات پاتوزن.....	۳
محتویات کیت.....	۴
نگهداری و انتقال کیت.....	۵
نکات احتیاط عمومی.....	۵
هشدارها و محدودیت ها.....	۶
کنترل ها.....	۶
نمونه گیری و نگهداری.....	۶
شکل ۳. تنظیمات دستگاه.....	۱۱
تنظیم دستگاه Rotor-Gene جهت آنالیز نتایج.....	۱۱
ارزیابی آنالیتیکال.....	۱۳
اختصاصیت آنالیتیکال.....	۱۳
ارزیابی کلینیکال.....	۱۶
پشتیبان فنی.....	۱۷
نشانه ها.....	۱۷
اطلاعات تماس.....	۱۷

● BONHIV-24

شرح کیت

کیت HIV-1 qRT-PCR یک سیستم آماده مصرف برای تشخیص RNA ویروس HIV-1 از طریق واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) روی دستگاه‌های Rotor-Gene Q است. مستر A و B حاوی واکنش‌گرها و آنزیم‌هایی برای تکثیر اختصاصی قطعه ای به طول ۹۸ جفت باز از ژنوم HIV-1 بوده و برای تشخیص مستقیم امپلیکون مورد نظر از طریق کانال فلورسنت Cycling Green در دستگاه‌های Rotor-Gene ۳۰۰۰ و Rotor-Gene ۶۰۰۰ طراحی گردیده است.

بعلاوه، کیت HIV-1 qRT-PCR حاوی سیستم ثانویه تکثیر هترولوگ برای تشخیص احتمال وجود مهارکننده واکنش PCR است. این امر از طریق شناسایی کنترل داخلی (Internal Control) در کانال فلورسنت Cycling Yellow در دستگاه‌های Rotor-Gene ۳۰۰۰ و Rotor-Gene ۶۰۰۰ صورت می‌پذیرد. آستانه تشخیصی آنالیتیکال کیت HIV-1 qRT-PCR در حضور IC کاهش نمی‌یابد. استانداردهای کیت شامل HIV-1 QS ۱-۴ امکان تعیین کمی میزان RNA ویروسی را فراهم می‌آورد.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم پاتوژن است. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق رنگ‌های فلوروسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلوروسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص و کمی سازی محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به باز کردن مجدد لوله های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

اطلاعات پاتوژن

ویروس نقص ایمنی (HIV) رترو ویروسی است که منجر به سندرم اکتسابی کمبود ایمنی (AIDS) می‌شود. دو نوع ویروس HIV مسئول انتقال این بیماری می‌باشد، HIV-۱ و HIV-۲ که در شدت و شیوع با یکدیگر دارند. اکثر موارد گزارش شده ایدز در سراسر دنیا به ویروس HIV-۱ نسبت داده شده است. ویروس HIV از طریق خون آلوده، مایع واژن، شیر مادر، و سایر مایعات بدن منتقل می‌شود. در این مایعات، ویروس HIV به دو صورت آزاد و درون سلول‌های ایمنی آلوده وجود دارد. سه مسیر اصلی انتقال این ویروس، رابطه جنسی محافظت نشده، سوزن‌های آلوده، و انتقال از مادر آلوده به کودک در هنگام تولد و یا از طریق شیر مادر است. ویروس HIV در ابتدا سلول‌های سیستم ایمنی مانند لنفوسیت‌های T را آلوده می‌کند، و این آلودگی منجر به کاهش سطح این سلول‌ها می‌گردد. هنگامی که این سلول‌ها، به خصوص سلول‌های لنفوسیت T دارای

نشانگر CD4 به پایین تر از سطح بحرانی کاهش ، ایمنی از بین می رود و بدن به تدریج مستعد عفونت های فرصت طلب میشود.

علائم ایدز در مرحله پیشرفته عفونت HIV رخ می دهد. وقتی که سیستم ایمنی بدن به خطر بیفتد نمی تواند با عفونت های فرصت طلب مقابله کند. در این مرحله، فرد آلوده به طور فزاینده علائمی را بروز می دهد که بر اثر چنین عفونت هایی ایجاد می شود. شایع ترین این عفونتها شامل اسهال مزمن کریپتوسپوریدیا، عفونت چشم ناشی از سیتومگالوویروس، ذات الریه پنومونی، توکسوپلاسموز، و سل و همچنین عفونت های ناشی از مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس هستند. علاوه بر این، ظهور انواع مختلف سرطان از جمله سرطان تهاجمی گردن رحم ، سارکوم کاپوزی و همچنین لنفوم به کرات گزارش شده است. در حال حاضر هیچ درمانی برای ایدز وجود ندارد و اعتقاد بر این است که بیشتر مبتلایان به HIV در نهایت در اثر یک بیماری مرتبط با ایدز خواهند مرد. از این رو HIV به عنوان یکی از چالش های مهم بهداشت عمومی در جهان است. با این حال ، پیشرفت های در زمینه درمان ایدز از جمله مقابله مستقیم با ویروس و جلوگیری یا درمان عفونت های فرصت طلب به طور چشمگیری منجر به افزایش امید به زندگی و کیفیت بسیاری از بیماران مبتلا به HIV و ایدز شده است.

محتویات کیت

Title	24 Tests
	Volume per Vial
HIVMaster-A	330 µl/tube × 1
HIVMaster-B	30 µl/tube × 1
Std1 : 2×10^5	200 µl/tube × 1
Std2 : 2×10^4	200 µl/tube × 1
Std3 : 2×10^3	200 µl/tube × 1
Std4 : 2×10^2	200 µl/tube × 1
Internal control	300 µl/tube × 1

نگهداری و انتقال کیت

کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری گردد. همچنین به منظور انتقال و جابه جایی کیت از یونولیت با درب و یخ خشک استفاده نمایید. بیش از دو مرتبه منجمد و ذوب کردن کیت به هیچ وجه توصیه نمی گردد زیرا می تواند باعث کاهش در حساسیت کیت گردد. نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی گراد هیچگاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.

مواد و تجهیزات مورد نیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود:

۱. کیت استخراج RNA
۲. سمپلر قابل تنظیم و نوک سمپلر فیلتردار RNase & DNase free
۳. سانتریفوژ رومیزی
۴. بلوک خنک کننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
۶. گان و دستکش
۷. لوله های ۰/۲ میکرولیتر
۸. دستگاه Rotor-Gene با کانال های فلوروسنت مخصوص Cycling Green و Cycling Yellow و یا Cycling A.FAM و Cycling A.HEX
۹. نرم افزار Rotor-Gene Q نسخه ۱/۷/۹۴ نرم افزار Rotor-Gene ۶۰۰۰ نسخه ۱/۷/۶۵, ۱/۷/۸۷, ۱/۷/۹۴ و نرم افزار Rotor-Gene ۳۰۰۰ نسخه ۶/۰/۲۳ و یا بالاتر.
۱۰. استریپ و کپ ۰/۱ ml برای استفاده در روتور ۷۲ چاهکی یا لوله های ۰.۲ ml PCR برای روتورهای ۳۶ چاهکی

نکات احتیاط عمومی

۱. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای HIV نمونه های گرفته شده از مریض، کنترل ها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده سازی MasterMix صورت پذیرد.
۲. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.
۳. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد (به ویژه استانداردهای کیت) را به خوبی پیتاژ نمایید و به طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به طور کامل توصیه میشود.
۴. تمام مراحل مربوط به تهیه MasterMix باید بر روی یخ یا جعبه های سرد (Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به Master Mix بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.

۱. کلیه نمونه ها عفونی بوده بنابراین تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP^۱ توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ (PPE)^۲ انجام شود. آزمایش های بالینی بر نمونه های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-۲ انجام شود.
۲. استفاده از دستورالعمل :
۳. پیشنهاد می شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همین طور بعد از کار لامپ UV زده شود.
۴. پیشنهاد می شود محل استخراج RNA، آماده سازی مخلوط واکنش از فضای آماده کردن اضافه کردن نمونه و نمونه استاندارد جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید.
۵. پس از آماده سازی مخلوط واکنش، آن را در تریکی نگهداری نمایید.

کنترل ها

۱. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک حاصل از استخراج RNA استفاده شود.
۲. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب بجای نمونه استفاده شود.
۳. استاندارد (STD): از استاندارد کیت بجای نمونه در یک واکنش استفاده گردد.

نمونه گیری و نگهداری

۱. برای امر تشخیص و تعیین مقدار ویروس HIV می توان نمونه های متفاوتی از جمله پلاسما، سرم، مایع مغزی نخاعی و غیره را مورد استفاده قرار داد، اما معمول ترین نمونه مورد استفاده نمونه پلاسما می باشد.
۲. نمونه خون گرفته شده باید در اسرع وقت (کمتر از شش ساعت از زمان نمونه گیری) پلاسما گیری شود. برای این منظور نمونه خون را به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۶۰۰-۸۰۰ سانتریفوژ کنید و پلاسمای جدا شده را به تیپ پلی پروپیلن استریل منتقل کنید. حساسیت تست در صورت منجمد کردن نمونه خون کاهش خواهد یافت به همین دلیل تا جای ممکن از این امر باید پرهیز گردد. هر چند پلاسمای جدا شده را می توان بدون آسیب به ژنوم ویروس برای روزها در ۴ درجه سانتی گراد، هفته ها در ۲۰- درجه سانتی گراد و ماه ها و حتی سال ها در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری کرد.

^۱ Good Laboratory Practice

^۲ Personal Protective Equipment

۳. نتایج منفی کاذب می‌توانند به دلیل حضور افزایش غلظت مهار کننده های واکنش PCR، نمونه‌گیری نامناسب، استخراج RNA غیر استاندارد، انتقال نامناسب نمونه و یا از غلظت کم نمونه ناشی گردد.

۴. اگرچه هپارین یکی از پر کاربردترین مواد ضد انعقاد می باشد به هیچ عنوان نباید برای نمونه های خونی که برای آنالیز توسط این کیت مورد استفاده قرار می گیرد به کار رود.

۵. اگر احتمال تاخیر در استخراج نمونه ها وجود دارد، آنها را در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایین تر نگهداری نمایید.

۶. نوکلئیک اسیدهای استخراج شده باید در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایین تر نگهداری شوند.

۷. نمونه های که ۴ روز یا بیشتر در دمای ۴-۲ درجه سانتیگراد نگهداری شده یا در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایین تر فریز نشده است قابل استفاده برای آزمایش نمی باشد.

- ایمنی زیستی در آزمایشگاه های میکروبیولوژی و زیست-پزشکی چاپ پنجم

<http://www.cdc.gov/biosafety/publications>

توجه: اگر چه هپارین یکی از پر کاربرد ترین مواد ضد انعقاد می باشد به هیچ عنوان نباید برای نمونه های خونی که برای آنالیز توسط این کیت مورد استفاده قرار میگیرد به کار رود. برای پشتیبانی فنی لطفا با تلفن های شرکت تماس حاصل فرمایید.

کنترل داخلی

این کیت به همراه یک کنترل داخلی برای مصرف کننده نهایی تهیه شده است. این امر به کاربرنهایی اجازه میدهد تا هم فرآیند تخلیص را چک کند و هم احتمال وجود مواد مهارکننده PCR را بررسی نماید. به طور کل در این حالت کنترل داخلی موجود در کیت را به مقدار ۲/۰ میکرولیتر به اِزاء هر ۱ میکرولیتر از حجم حل کردن نهایی ژنوم ویروس اضافه می شود. برای مثال اگر ژنوم تخلیص شده را در ۵۰ میکرولیتر آب حل میکنیم باید در هنگام تخلیص پلاسمای مربوط به آن به پلاسمای ۱۰ میکرولیتر کنترل داخلی اضافه کنیم. به بیان دیگر حجم کنترل اضافه شده تنها تابعی از میزان الوشن (Elution) نهایی می باشد. این کنترل داخلی را می توان به مخلوط بافر لیز و پلاسمای اضافه نمود. این نکته قابل ذکر است که اضافه کردن کنترل داخلی به مخلوط بافر لیز و پلاسمای باید به صورت تازه صورت گیرد. همچنین کنترل داخلی به هیچ عنوان نباید به خود نمونه به صورت مستقیم و در غیاب بافر لیز اضافه شود. همچنین میتوان کنترل داخلی را تنها در طی مرحله PCR اضافه کرد که در این حال هیچ گونه کنترلی بر روی مرحله تخلیص وجود نخواهد داشت. در این حالت ۱ میکرولیتر کنترل داخلی به ۵ میکرولیتر MasterMix-HIV اضافه شده و سپس از این مخلوط مقدار ۱۵ میکرولیتر با ۱۰ میکرولیتر از نمونه تخلیص شده مخلوط می گردد.

۱. در صورتیکه کنترل داخلی را در مرحله استخراج و طی مراحل آماده سازی اضافه کرده اید، مقادیر لازم برای آماده سازی MasterMix برای هر واکنش را برای هرتست طبق جدول زیرآماده کنید.

Number of Reactions (rxns)	Volume
HIV-1 Master-A	13.75 μ l
HIV-1 Master-B	1.25 μ l
Final Volume	15 μ l

۲. اگر از IC به عنوان یک کنترل مهار RT-PCR استفاده شود ، اما نه به عنوان یک کنترل برای روش آماده سازی نمونه ، Master Mix را مطابق توضیح تهیه نمایید:
در این حالت ابتدا ۱ میکرولیتر از کنترل داخلی به مجموع مستر A و B اضافه می شود و سپس از این مخلوط ۱۵ میکرولیتر برای هر واکنش استفاده میگردد.

Number of Reactions (rxns)	Volume
HIV-1 Master-A	13.75 μ l
HIV-1 Master-B	1.25
Internal Control	1 μ l
Final Volume	15 μ l

نکته: لازم به ذکر است که در هر بار انجام تست یک لوله به عنوان (NTC) No Template Control باید گذاشته شود. بر اساس جدول فوق در NTC به جای نمونه استخراج شده آب استفاده میشود. تیوب NTC برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.

اضافه کردن الگو

پس از آماده سازی محلول ها و انتقال آن به تیوب های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، ۱۰ میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید. پس از انتقال به منطقه

کار با اسیدنوکلیک، ۱۰ میکرولیتر از نمونه استاندارد و ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های بیمار را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید. سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید.

Reaction Setup	Volume
Master Mix	15 μ l
Sample or Control	10 μ l
Total Volume	25 μ l

برنامه ریزی دمایی

به منظور انجام تست باید برنامه دمایی زیر برای دستگاه تعریف شود. سنجش طیف نشری (Acquisition) باید هم در کانال سبز (مربوط به سیگنال دریافتی از ژنوم HIV) و هم در کانال زرد (مربوط به سیگنال دریافتی از کنترل داخلی) انجام شود.

مقادیر دمایی هر قسمت در کادر زیر آورده شده است.

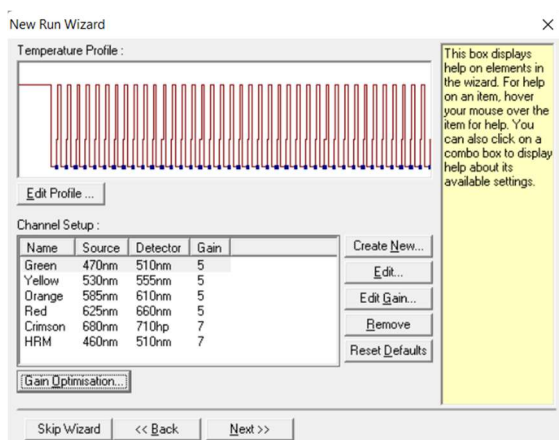
علاوه بر تعریف دمایی، دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیم گردد.

	Temperature	Hold	Cycle
Reverse Transcription	50 °C	20 min	1
Pre-Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	45
Annealing and Acquisition on Channel Green and Yellow	50 °C	45 sec	
Extension	72 °C	30 sec	

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها

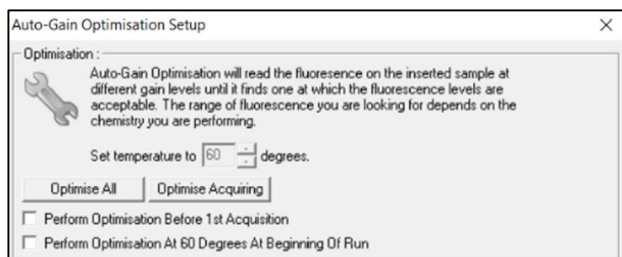
دستگاه Rotor-Gene

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه‌ی Gain Optimization را انتخاب کنید (شکل ۱).



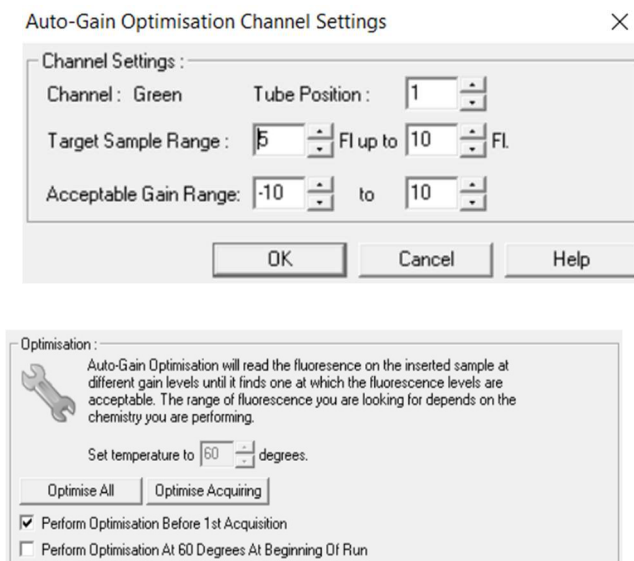
شکل ۱. تنظیمات دستگاه

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimise Acquiring برای هر دو کانال بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



شکل ۲. تنظیمات دستگاه

همچنین Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب اول انجام شود.
پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی Perform Optimization Before 1st Acquisition را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۳).



شکل ۳. تنظیمات دستگاه

تنظیم دستگاه Rotor-Gene جهت آنالیز نتایج

۱. آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در هر کانال رنگی، آستانه را در بازه‌ی ۰/۰۲ قرار دهید.

۲. از پنجره Quantitation Analysis گزینه‌ی Slope Correct را انتخاب نمایید.

توجه: دستگاه‌های دیگر دارای تنظیمات خودکار می باشند.

استانداردهای تامین شده در این کیت معادل یک نمونه تخلیص شده با تعداد کپی ویروس کاملاً مشخص است. از آنجا که از هر نمونه تخلیص شده مقدار ۱۰ میکرولیتر از ژنوم تخلیص شده با ۱۵ میکرولیتر از MasterMix مخلوط میشود باید همین روند به طور مشابه برای نمونه های استاندارد نیز اعمال گردد. برای ترسیم منحنی استاندارد هر چهار استاندارد موجود در کیت در هر بار انجام تست باید به همراه نمونه های مجهول مورد آنالیز قرار گیرد تا بتوان به واسطه منحنی استاندارد کشیده شده تعداد کپی ویروس در نمونه های مجهول تعیین گردد. برای انجام این امر باید استانداردها به عنوان استاندارد در برنامه تعریف شوند و مقدار معادل استاندارد بر اساس فرمول زیر محاسبه شده و در نرم افزار دستگاه وارد شود.

✓ استانداردهای تامین شده در کیت به صورت $\text{IU}/\mu\text{l}$ میباشد. برای تبدیل این استانداردها به IU/ml از رابطه زیر استفاده کنید.

$$\checkmark \quad \frac{(\mu\text{l}) \times \left(\frac{\text{IU}}{\mu\text{l}}\right) \times \text{نتیجه}}{(\text{ml}) \times \text{حجم نمونه تخلیص شده}} = (\text{IU}/\text{ml}) \times \text{نتیجه}$$

آنالیز اطلاعات

حد آستانه (Threshold) را بر روی Baseline و در 0.2 Th قرار دهید. سپس نتایج را به صورت زیر تفسیر کنید:

- ۱- سیگنال فلورسانس در کانال (A.FAM=green) کاملاً مشخص است. نتیجه تست برای ویروس مثبت است و نمونه تخلیص شده از پلاسما حاوی ویروس HIV بوده است. در این حالت، وجود سیگنال فلورسانس در کانال Yellow اهمیت ندارد زیرا در صورت بالا بودن غلظت اولیه ژنوم ویروس سیگنال در کانال Yellow میتواند بسیار ضعیف باشد یا اصلاً وجود نداشته باشد.
- ۲- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال (A.FAM=Green channel) مشاهده نمیشود. در همین حین سیگنال در کانال Yellow مربوط به کنترل داخلی قابل مشاهده است. این حالت نشان دهنده عدم وجود ویروس در نمونه پلاسما میباشد. همچنین مثبت بودن سیگنال حاصل از کانال Yellow وجود هر گونه مهار کننده واکنش PCR را منتفی میکند.
- ۳- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال A.FAM و کانال Yellow قابل مشاهده نیست. در این حالت هیچ گونه نتیجه گیری در مورد تست نمیتوان انجام داد. تست باید دوباره تکرار شود.

اختصاصیت کیت SENMURV HIV-1 qRT-PCR در وهله اول با انتخاب پرایمرها و پروب ها و همچنین انتخاب شرایط واکنش دقیق مورد تایید قرار می گیرد. با استفاده از آنالیز مقایسه ای توالی ها، پرایمرها و پروب ها از منظر هومولوژی های احتمالی با تمامی توالی های ثبت شده در بانک های ژنی بررسی شدند. قابلیت تشخیصی (Detectability) تمامی ژنوتیپ های مرتبط از طریق همتراز سازی توالی ها و همینطور توسط واکنش PCR بر روی دستگاه های Rotor-Gene بر روی ژنوتیپ های زیر مورد تایید قرار گرفت.

	Virus Genotype	HIV (FAM)	HEX(IC)
HI Virus-1	A	+	+
HI Virus-1	B	+	+
HI Virus-1	C	+	+
HI Virus-1	D	+	+
HI Virus-1	E	+	+
HI Virus-1	F	+	+
HI Virus-1	G	+	+
HI Virus-1	H	+	+

بعلاوه، اختصاصیت کیت از طریق ۱۰۰ نمونه مختلف پلاسمایی HIV-1 منفی تایید شد. این نمونه ها هیچ سیگنالی از طریق پرایمرها و پروب های مستر میکس کیت ایجاد نکردند.

واکنش دهی متقابل (cross-reactivity) کیت SENMURV HIV-1 qRT-PCR با استفاده از گروه های کنترل مورد بررسی قرار گرفت. هیچ یک از پاتوژن های تست شده واکنش دهی (reactivity) نشان ندادند. هیچ گونه واکنش دهی متقابل در عفونت های مختلط ظاهر نشد.

• Herpes simplex virus 2 (HSV-2)	• Cytomegalovirus (CMV)
• Hepatitis A virus (HAV)	• Epstein-Barr virus (EBV)
• Hepatitis B virus (HBV)	• Herpes simplex virus 1 (HSV-1)
• Hepatitis D virus (HDV)	• Parvovirus B19
• Hepatitis E virus (HEV)	• Dengue virus (DENV)
Hepatitis C virus (HCV)	• Human T-lymphotropic virus I (HTLV-I)
• Human T-lymphotropic virus II (HTLV-II)	• West Nile virus (WNV)
• Yellow fever virus (YFV)	

حساسیت آنالیتیکال (پایین ترین حد تشخیص)

محدوده تشخیص آنالیتیکال و همچنین محدوده تشخیص آنالیتیکال با در نظر گرفتن استخراج (محدودیت‌های تشخیصی) برای کیت HIV-1 qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. محدوده تشخیص آنالیتیکال با استفاده از نمونه‌های بالینی مثبت برای HIV-1 در کنار یک روش استخراج خاص تعیین می‌شود. در مقابل، محدوده تشخیص آنالیتیکال بدون استفاده از نمونه بالینی و مستقل از روش استخراج مورد نظر و با استفاده از استانداردهایی با غلظت‌های معلوم تعیین می‌گردد.

برای تعیین حساسیت آنالیتیکال کیت HIV-1 qRT-PCR، یک سری رقت ویروس HIV-1 از 10^5 IU/ μ l تا 10^1 IU/ μ l ایجاد گردید و با استفاده از کیت HIV-1 qRT-PCR و با دستگاه‌های Rotor-Gene مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش در سه روز و در هشت تکرار صورت پذیرفت و نتایج از طریق آنالیز تعیین شدند. محدوده تشخیص آنالیتیکال کیت به همراه دستگاه 10^5 IU/ μ l ، Rotor-Gene 6000 برآورد شد ($p = 0.05$). این بدین معناست که پارتیکل ویروسی با رقت 10^5 IU/ μ l به احتمال ۹۵٪ قابل تشخیص هستند.

تبادل و هم‌ارزی بین دو دستگاه Rotor-Gene ۳۰۰۰ و Rotor-Gene ۶۰۰۰ براساس مشخصات فنی تأیید شده با مقایسه عملکرد آنالیتیکال نشان داده شده است. آنالیزهای هر دو دستگاه به طور موازی صورت گرفت. محدوده تشخیص آنالیتیکال در دستگاه Rotor-Gene ۶۰۰۰ در بازه اطمینان دستگاه Rotor-Gene ۳۰۰۰ قرار می‌گیرد. بنابراین، کیت تولید شده می‌تواند برای تشخیص RNA ویروس HIV-1 در دستگاه Rotor-Gene ۶۰۰۰ با حساسیت برابر مورد استفاده قرار بگیرد.

حساسیت آنالیتیکال با در نظر گرفتن استخراج (QIAamp® DSP Virus Kit) کیت HIV-1 qRT-PCR از طریق استفاده از سری رقت دومین استاندارد بین المللی RNA ویروس (HIV-1 (WHO و از ۱۰-۳۱۶۰ IU/μl ویروس HIV-1 نمونه‌های بالینی پلاسمایی صورت پذیرفت. با استفاده از کیت QIAamp DSP Virus Kit با حجم استخراج ۰/۵ میلی لیتر و با حجم elution ۶۰ میکرولیتر) RNA این نمونه‌ها استخراج گردید. هر یک از ۷ رقت در ۳ روز مختلف و در ۸ تکرار با استفاده از کیت SENMURV HIV-1 qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آنالیز شدند. محدوده تشخیصی آنالیتیکال با در نظر گرفتن استخراج کیت توسط دستگاه Rotor-Gene 6000 75 IU/ml است ($p = 0/05$). این بدان معناست که ۹۵٪ احتمال دارد که ۷۵ IU/ml مشاهده شود.

دامنه خطی (linear range)

دامنه خطی (اندازه گیری آنالیتیکال) کیت از طریق آنالیز سری رقت تهیه شده از HIV-1 با دامنه IU/μl 5×10^8 تا ۵ IU/μl مشخص گردید. سری رقت بر اساس اولین استاندارد جهانی (HIV RNA WHO) ۱- کالیبره شد.

با استفاده از کیت و در دستگاه Rotor-Gene، هر رقت در تکرارهای مشخص $n=8$ ارزیابی شدند.

مشخص شد که دامنه خطی کیت از غلظت 5×10^8 IU/μl تا ۵ IU/μl را پوشش می‌دهد.

محدوده خطی با توجه به تخلیص کیت با تجزیه و تحلیل یک سری رقت از پنل کمیت RNA Acrometrix HIV-1 از $10^8 \times 1$ IU/ml تا ۱۰۰ IU/ml بررسی گردید. خالص سازی در دو نسخه با استفاده از کیت INVITEK (حجم استخراج: ۰/۲ میلی لیتر، حجم الوشن: ۱۵۰ میکرولیتر) انجام شد. هر یک از نمونه‌ها با استفاده از کیت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. محدوده خطی با توجه به تخلیص، غلظت IU/ml ۱۵۰ تا حداقل IU/ml $10^8 \times 1$ تعیین شده است.

داده‌ی دقت کیت تعیین واریانس کل آزمایش را ممکن می‌سازد. واریانس کلی شامل تنوع درون-آزمایشی (تنوع در نتایج متعدد نمونه‌ها با غلظت یکسان و در یک آزمایش)، تنوع بین-آزمایشی (تنوع در نتایج متعدد حاصل آزمایش‌های مشتق از دستگاه‌های متفاوت و یا دستگاه یکسان اما توسط اپراتورهای مختلف آزمایشگاه)، و تنوع بین-بیچ (inter-batch) تنوع در نتایج متعدد حاصل از استفاده از batchهای مختلف است. داده‌های بدست آمده برای تعیین انحراف استاندارد، واریانس و ضریب تغییرات PCRهای مختص پاتوژن و همینطور کنترل داخلی بکار گرفته شدند.

داده‌ی دقت کیت با استفاده از استانداردهای معلومالعیار مشخص گردید. این آزمایش در ۲۰ روز هر روز ۲ ران انجام شد و داده دقت بر اساس لگاریتم مقادیر به دست آمده تعیین شد. حد پایینی تشخیص برای کیت در حدود ۷۵ IU/ml می‌باشد.

ارزیابی کلینیکال

حساسیت و اختصاصیت کلینیکال

در قیاس با نتایج مستخرج از کیت Artus HIV-1 RT-PCR به عنوان روش مرجع، حساسیت تشخیصی و اختصاصیت تشخیصی کیت SENMURV HIV-1 qRT-PCR به ترتیب ۹۸/۱٪ و ۹۶/۳٪ برای تمامی نمونه‌ها بدست آمد.

	Research Use Only	برای مصارف پژوهشی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولید شده
	Temperature Limitation	محدودیت دمایی
	Consult Instruction For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficient for <n> tests	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

شرکت فناوری بن یاخته - گروه سین مورو

دفتر مرکزی : تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار 24 متری سعادت آباد

خیابان حیدرnia (دوم شرقی) پلاک 9، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی : 1997775555 پشتیبان فنی : 09301821601

تلفن های تماس : 02122082120

Web Site : www.Senmurv.co

Email : info@senmurv.ir