



دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کمی

ویروس HIV-1

با روش

RT-qPCR

**STEM
CELL
TECHNOLOGY**
شرکت فناوری بن یاخته

Doc. #: IFU-HIV-01 Doc. Version: 04 Revision Date: 03-05-2023

۳	شرح کیت
۳	اصول
۳	اطلاعات پاتوزن
۴	محتویات کیت
۵	نگهداری و انتقال کیت
۵	نکات احتیاط عمومی
۶	هشدارها و محدودیت ها
۶	کنترل ها
۶	نمونه گیری و نگهداری
۱۱	ارزیابی آنالیتیکال
۱۱	اختصاصیت آنالیتیکال
۱۴	ارزیابی کلینیکال
۱۵	پشتیبان فنی
۱۵	نشانه ها
۱۵	اطلاعات تماس

● 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 Orange 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) رتروویروسی است که منجر به سندرم اکتسابی کمبود ایمنی (AIDS) می‌شود. دو نوع ویروس HIV مسئول انتقال این بیماریست، 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 شیرمادر است. ویروس HIV در ابتدا سلول‌های سیستم ایمنی مانند لنفوسیت‌های T را آلوده می‌کند، و این آلودگی منجر به کاهش سطوح این سلول‌ها می‌گردد. هنگامی که این سلول‌ها، به خصوص سلول‌های لنفوسیت T دارای

نشانهگر CD4 به پایین‌تر از سطح بحرانی کاهش، ایمنی از بین می‌رود و بدن به تدریج مستعد عفونت‌های فرصت طلب می‌شود.

علائم ایدز در مرحله پیشرفته عفونت HIV رخ می‌دهد. وقتی که سیستم ایمنی بدن به خطر بیفتد نمی‌تواند با عفونت‌های فرصت طلب مقابله کند. در این مرحله، فرد آلوده به طور فزاینده علائمی را بروز می‌دهد که بر اثر چنین عفونت‌هایی ایجاد می‌شود. شایع‌ترین این عفونت‌ها شامل اسهال مزمن کریپتوسپوریدیا، عفونت چشم ناشی از سیتومگالوویروس، ذات‌الریه پنومونی، توکسوپلاسماز، و سل و همچنین عفونت‌های ناشی از مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس هستند. علاوه بر این، ظهور انواع مختلف سرطان از جمله سرطان تهاجمی گردن رحم، سارکوما 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 چالش‌های مهم بهداشت عمومی در جهان است. با این حال، پیشرفت‌های در زمینه درمان ایدز از جمله مقابله مستقیم با ویروس و جلوگیری یا درمان عفونت‌های 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	300 µl/tube × 1
Std2 : 2×10^4	300 µl/tube × 1
Std3 : 2×10^3	300 µl/tube × 1
Std4 : 2×10^2	300 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 هیچ گاه 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 Orange و یا Cycling A.FAM و Cycling A.JOE
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 / 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 PCR 0.2 ml 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 طیزمان به طور کامل توصیه میشود.

۴. تمام مراحل مربوط به تهیه Master Mix 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.

هشدارها و محدودیت ها

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^۲ (PPE) 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 :
Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Specimen Associated
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 تاریکی 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 پلاسما جدا شده را به تیپ پلی پروپیلن استریل منتقل کنید. حساسیت تست در صورت منجمد کردن نمونه خون

^۱ Good Laboratory Practice

^۲ Personal Protective Equipment

کاهش خواهد یافت به همین دلیل تا جای ممکن از این امر باید پرهیز گردد. هر چند پلاسما 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.

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

۴. اگر چه 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 پایینتر نگهداری نمایید.

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

۷. نمونه های که ۴ روز یا بیشتر در دمای ۴-۲ درجه سانتیگراد نگهداری نشده 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 ازاء 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 پلاسما مربوط به آن به پلاسما 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 طور مستقیم به بافر لیز اضافه کرد و یا آن را به مخلوط بافر لیز و پلاسما اضافه نمود. این نکته قابل ذکر است که اضافه کردن کنترل داخلی به بافر لیز یا مخلوط بافر لیز و پلاسما 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 ۱۵ میکرولیتر MasterMix-HIV

اضافه شده و سپس از این مخلوط مقدار ۱۵ میکرولیتر با ۱۰ میکرولیتر از نمونه تخلیص شده مخلوط می گردد.

آماده سازی

آماده سازی با دوروش صورت میگیرد :

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 هر تست طبق جدول زیر آماده 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 میگرد.

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 اسیدنوکلئیک، ۱۰ میکرولیتر از نمونه استاندارد و ۱۰ میکرولیتر از نمونه های بیمار را به تیوب های مربوطه اضافه نمایید. سپس تیوب ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه ها را نام گذاری 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 نارنجی (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 Orange	50 °C	45 sec	
Extension	72 °C	30 sec	

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 $IU/\mu l$ میباشد. برای تبدیل این استانداردها به IU/ml از رابطه زیر استفاده کنید.

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

آنالیز اطلاعات

حد آستانه (Threshold) را بر روی Baseline و در $Th = 0.2$ 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 Orange اهمیت ندارد زیرا در صورت بالا بودن غلظت اولیه ژنوم ویروس سیگنال در کانال Orange 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 Orange 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 Orange وجود هر گونه مهار کننده واکنش PCR را منتفی میکند.
- ۳- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال A.FAM و کانال Orange قابل مشاهده نیست. در این حالت هیچ گونه نتیجه گیری در مورد تست نمی توان 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 می‌گیرد. با استفاده از آنالیز مقایسه‌ای توالی‌ها، پرایمرها و پروب‌ها از منظر هومولوژی‌های احتمالی با تمامی توالی‌های ثبت شده در بانک‌های ژنی بررسی شدند. قابلیت تشخیصی (Detectability) تمامی ژنوتیپ‌های مرتبط از طریق همترازسازی توالی‌ها و همینطور توسط واکنش PCR بر روی دستگاه‌های Rotor-Gene بر روی ژنوتیپ‌های زیر مورد تایید قرار گرفت.

	Virus Genotype	HIV (FAM)	ROX(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 پلاسمای HIV-1 منفی تایید شد. این نمونه‌ها هیچ سیگنالی از طریق پرایمرها و پروب‌های مستر میکس کیت ایجاد نکردند.

واکنش‌دهی متقابل (cross-reactivity) کیت SENMURV HIV-1 qRT-PCR با استفاده از گروه‌های کنترل مورد بررسی قرار گرفت. هیچ یک از پاتوژن‌های تست شده واکنش‌دهی (reactivity) نشان ندادند. هیچ گونه واکنش‌دهی متقابل در عفونت‌های 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 $1 \text{ IU}/\mu\text{l}$ تا $50 \text{ IU}/\mu\text{l}$ 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 $5 \text{ IU}/\mu\text{l}$ Rotor-Gene 6000 برآورد شد ($p = 0.05$). این بدین معناست که پارتیکل ویروسی با رقت $5 \text{ IU}/\mu\text{l}$ به احتمال 95% قابل تشخیص هستند.

تبادل و هم‌ارزی بین دو دستگاه Rotor-Gene 3000 و Rotor-Gene 6000 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 6000 در بازه اطمینان دستگاه Rotor-Gene 3000 قرار می‌گیرد. بنابراین، کیت تولید شده می‌تواند برای تشخیص RNA ویروس HIV-1 در دستگاه Rotor-Gene 6000 با حساسیت برابر مورد استفاده قرار بگیرد.

حساسیت آنالیتیکال با در نظر گرفتن استخراج (QIAamp® DSP Virus Kit) کیت HIV-1qRT-PCR از طریق استفاده از سری رقت دومین استاندارد بین المللی RNA ویروس (WHO HIV-1) 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) 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=۰/۰۵). 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 $10^8 \mu\text{l} \times 5$ 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 1×10^8 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 ۱۵۰ IU/ml تا حداقل 1×10^8 IU/ml 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 75 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 $98/1\%$ و $96/3\%$ برای تمامی نمونه‌ها بدست آمد.

پشتیبان فنی

برای پشتیبانی فنی لطفا با تلفن های شرکت تماس حاصل فرمایید .

نشانه ها

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

اطلاعات تماس

شرکت فناوری بن یاخته - گروه سین مورو

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

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

پشتیبان فنی : 09301821601

کد پستی : 1997775555

تلفن های تماس : 02122082120

Web Site : www.Senmurv.co

Email : info@senmurv.ir