راهنما دفترچه

کیت شناسایی و سنجش کمی

HIV-1

با روش

RT-qPCR

STEM CELL TECHNOLOGY
شرکت فناوری بن یاخته

Doc. #: IFU-HIV-01 Doc. Version: 000 Revision Date: 11/28/2023

Contents

شرح کیت ٤
اصول ٤
اطلاعات پاتوژن ٤
محتویات کیت ٥
نگهداری و انتقال کیت ٦
نکات احتیاط عمومی ٦
هشدارها و محدودیت ها ٧
کنترل ها ٧
نمونه گیری و نگهداری ٧
آماده سازی ٩
اضافه کردن الگو ٩
برنامه ریزی دمایی ١٠
شکل ٣. تنظیمات دستگاه ١٢
نظیم دستگاه Rotor-Gene جهت آنالیز نتایج ١٢
ارزیابی آنالیتیکال ١٣
اختصاصیت آنالیتیکال ١٣
حساسیت آنالیتیکال (پایین ترین حد تشخیص) ١٥
دامنه خطی (linear range) ١٥

دقت ۱۶
ارزیابی کلینیکال ۱۶
حساسیت و اختصاصیت کلینیکال ۱۶
پشتیبان فنی ۱۷
نشانه ها ۱۷
اطلاعات تماس ۱۷

شماره رفرانس

- BONHIV-24

شرح کیت

کیت HIV-1 qRT-PCR یک سیستم آماده مصرف برای تشخیص RNA ویروس HIV-1 از طریق واکنش زنجیره ای پلیمراز (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 فلوروسنت Cycling Orange در دستگاه‌هایRotor-Gene ۳۰۰۰ وRotor-Gene ۶۰۰۰ صورت می‌پذیرد. آستانه تشخیصی آنالیتیکال کیت HIV-1 qRT-PCR در حضور IC کاهش نمی‌یابد. استانداردهای کیت شامل QS ۱-٤ امکان تعیین کمی میزان RNA ویروسی را فراهم می‌آورد.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز (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 می باشد ،HIV-1 و HIV-2 که در شدت و شیوع با یکدیگر دارند. اکثر مواردگزارش شده ایدز در سراسردنیا به ویروس HIV-1 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 مادرآلوده به کودک در هنگام تولد و یا از طریق شیرمادر است.

ویروس HIV در ابتدا سلول‌های سیستم ایمنی مانند لنفوسیت‌هایT 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 پایین‌تر از سطح بحرانی کاهش ، ایمنی از بین می‌رود و بدن به تدریج مستعد عفونت های فرصت طلب میشود.

علائم ایدز در مرحله پیشرفته عفونتHIV 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 بروزمی‌دهد که بر اثر چنین عفونت‌هایی ایجاد می‌شود. شایع ترین این عفونتهاشامل اسهال مزمن کریپتوسپوریدیا، عفونت چشم ناشی از سیتومگالوویروس، ذات الریه پنومونی، توکسوپلاسموز، و سل و همچنین عفونت های ناشی از مایکوباکتریومآویوم کمپلکس هستند. علاوه بر این، ظهور انواع مختلف سرطان از جمله سرطان تهاجمی گردن رحم ، سارکومکاپوزی و همچنین لنفوم به کرات گزارش شده است. درحال حاضر هیچ درمانی برای ایدز وجود ندارد و اعتقاد بر این است که بیشتر مبتلایان بهHIV در نهایت در اثر یک بیماری مرتبط با ایدز خواهند مرد. از این روHIV 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 : 4×10^5	200 µl/tube × 1
Std2 : 4×10^4	200 µl/tube × 1
Std3 : 4×10^3	200 µl/tube × 1
Std4 : 4×10^2	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 دمای۴ 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 نوك سمپلر فیلتردار RNase & DNase free
۳. سانتریفوژ رومیزي
٤. بلوك خنك كننده
٥. وایتکس ۱۰ درصد
٦. گان و دستکش
۷. لوله های ۰/۲ میکرولیتر
۸. دستگاه Rotor-Gene با کانال‌های فلوروسنت مخصوص Cycling Green و Cycling Orangeو یا Cycling A.FAM و Cycling A.HEX
۹. نرم افزار Rotor-Gene Q نسخه ۱/۷/۹٤ نرمافزار Rotor-Gene ٦۰۰۰ نسخه ۱/۷/٦٥ ,۱/۷/۸۷ ,۱/۷/۹٤ و نرم افزار Rotor-Gene ۳۰۰۰ نسخه ٦/۰/۲۳ و یا بالاتر.
۱۰. استریپ و کپ ۰/۱ ml برای استفاده در روتور ۷۲ چاهکی یا لوله‌های PCR 0.2 ml برای روتورهای ۳٦ چاهکی

نکات احتیاط عمومی

۱. نگهداری وتخلیص مواد مثبت برای HIV نمونه های گرفته شده از مریض، کنترل ها و محصولات حاصل از PCR باید درمحلی کاملا جداز محل نگهداری وآماده سازیMaster Mix صورت پذیرد.
۲. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.
۳. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد (به ویژه استانداردهای کیت) را به خوبی پیپتاژ نمایید و به طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکردکیت در طی زمان به طور کامل توصیه میشود.
٤. 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[1] توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ (PPE)[2] انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 انجام شود.

۲. استفاده از دستورالعمل :

۳. پیشنهاد می شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد ازکار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همین طور بعداز کارلامپ UV زده شود.

٤. 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 درتاریکی 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 ویروسHIV 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 درg۱۶۰۰-۸۰۰ 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 در٤ 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 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.

---

[1] Good Laboratoty Practice

[2] Personal Protective Equipment

٤. 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.
٥. اگر احتمال تاخیر در استخراج نمونه ها وجود دارد، آنها را در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایین تر نگهداری نمایید.
٦. نوکلئیک اسیدهای استخراج شده باید در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایین تر نگهداری شوند.
۷. نمونه های که ٤ روز یا بیشتر در دمای ٤-۲ 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 ۰/۲ 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 میکرولیترآب حل میکنیم باید درهنگام تخلیص پلاسمای مربوط به آن به پلاسما ۱۰میکرولیترکنترل 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 پلاسما اضافه نمود. این نکته قابل ذکراست که اضافه کردن کنترل داخلی به 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 بافرلیز اضافه شود. همچنین میتوان کنترل داخلی را تنها درطی مرحله PCR اضافه کرد که در این حال هیچ گونه کنترلی بر روی مرحله تخلیص وجود نخواهد داشت. در این حالت ۱ میکرولیترکنترل داخلی به ۱۵میکرولیتر 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 دو روش صورت میگیرد :

۱. در صورتیکه کنترل داخلی را درمرحله 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 µl
HIV-1 Master-B	1.25 µl
Final Volume	15 µl

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 µl
HIV-1 Master-B	1.25
Internal Control	1 µl
Final Volume	15 µl

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

اضافه کردن الگو

پس از آماده سازی محلول‌ها و انتقال آن به تیوب‌های 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 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 µl
Sample or Control	10 µl
Total Volume	25 µl

برنامه ریزی دمایی

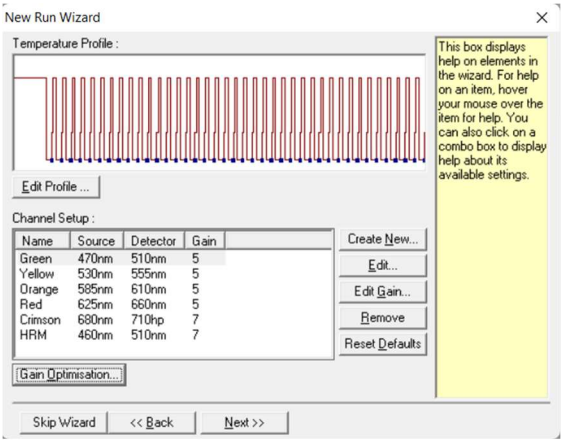
به منظور انجام تست باید برنامه دمایی زیر برای دستگاه تعریف شود. سنجش طیف نشری (Acquisition) باید هم در کانال سبز (مربوط به سیگنال دریافتی از ژنوم HIV) و هم در کانال زرد (مربوط به سیگنال دریافتی از کنترل داخلی) انجام شود.

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 ℃	20 min	1
Pre-Denaturation		95 ℃	3 min	1
Precycling	Denaturation	95 ℃	15 sec	5
	Annealing	58 ℃	45 sec	
	Extension	72 ℃	30 sec	
Denaturation		95 ℃	15 sec	40
Annealing and Acquisition on Channel **Green** and **Orange**		50 ℃	45 sec	
Extension		72 ℃	30 sec	

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها

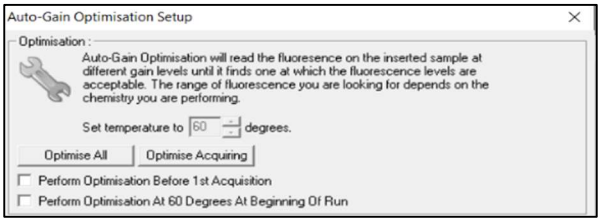
دستگاه Rotor-Gene



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

شکل ۱. تنظیمات دستگاه

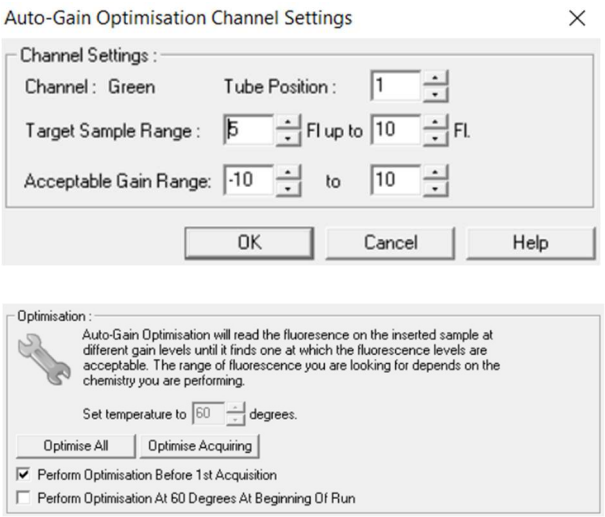
در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimise Acquiring برای هر دو کانال بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش‌فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



شکل ۲. تنظیمات دستگاه

همچنین Gain دستگاه باید برمبنای تیوب اول انجام شود.

پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌یPerform Optimization Before 1st Acquisition را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۳).



شکل ۳. تنظیمات دستگاه

نظیم 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 گزینه ی Slope Correct را انتخاب نمایید.

توجه: دستگاه های دیگر دارای تنظیمات خودکار می باشند.

آنالیز نتایج

تعیین تعداد ژنوم ویروسHIV تخلیص شده

استانداردهای تامین شده دراین کیت معادل یک نمونه تخلیص شده با تعداد کپی ویروس کاملا 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 تابتوان به واسطه منحنی استاندارد کشیده شده تعداد کپی ویروس در نمونه های مجهول تعیین گردد. برای انجام این امر باید استانداردها به عنوان استاندارد دربرنامه 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.

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

آنالیز اطلاعات

حد آستانه (Threshold) را بر روی Baseline و در Th= ۰٫۰۲ قرار دهید. سپس نتایج را به صورت زیر تفسیر کنید:

۱- سیگنال فلورسانس در کانال (A.FAM=green) کاملا 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 TEX اهمیت ندارد زیرا در صورت بالا بودن غلظت اولیه ژنوم ویروس سیگنال در کانال Orange میتواند بسیار ضعیف باشد یا اصلا وجود نداشته باشد.

۲- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال (A.FAM=Green channel) مشاهده نمیشود. در همین حین سیگنال در کانال TEX 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 TEX وجود هر گونه مهار کننده واکنشPCR را منتفی میکند.

۳- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانالA.FAM و کانال TEX قابل مشاهده نیست.

در این حالت هیچ گونه نتیجه گیری در مورد تست نمیتوان انجام داد. تست باید دوباره تکرار شود.

ارزیابی آنالیتیکال

اختصاصیت آنالیتیکال

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)	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-۱ 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 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 درنظرگرفتن استخراج (محدودیت‌های تشخیصی) برای کیت HIV-1 qRT-PCR مورد ارزیابی قرارگرفت. محدوده تشخیص آنالیتیکال با استفاده از نمونه‌های بالینی مثبت برای HIV-۱ 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-۱ از ۵۰ IU/µl تا IU/ ۰٫۰۵ µl ایجاد گردید و با استفاده از کیت HIV-1 qRT-PCR و با دستگاه‌های Rotor-Gene موردارزیابی قرارگرفت. 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 Rotor-Gene 6000، 5 IU/ µl برآورد شد($p = ۰٫۰۵$). این بدین معناست که پارتیکل ویروسی با رقت ۵ IU/µl به احتمال ۹۵٪ قابل تشخیص هستند.

تعادل و هم‌ارزی بین دو دستگاه Rotor-Gene ۳۰۰۰ و Rotor-Gene ۶۰۰۰ براساس مشخصات فنی تأییدشده با مقایسه عملکرد آنالیتیکال نشان دادهشده 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-۱ در دستگاه Rotor-Gene ۶۰۰۰ با حساسیت برابر مورد استفاده قرار بگیرد.

حساسیت آنالیتیکال با درنظرگرفتناستخراج (QIAamp® DSP Virus Kit) کیت HIV-1qRT-PCR از طریق استفاده از سری رقت دومین استاندارد بین‌المللی 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) 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 قرارگرفت و نتایج آنالیز شدند. محدوده تشخیصی آنالیتیکال با در نظرگرفتن استخراج کیت توسط دستگاه Rotor-Gene 6000 75 IU/ml است ($p = ۰٫۰۵$). این بدان معناست که ۹۵٪ احتمال دارد که ۷۵IU/ml مشاهده شود.

دامنه خطی (linear range)

دامنه خطی (اندازه گیری آنالیتیکال) کیت از طریق آنالیز سری رقت تهیه شده از HIV-۱با دامنه 10^8 ۵×IU/μl 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=۸ ارزیابی شدند.

مشخص شد که دامنه خطی کیت از غلظت5×10^{8} 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 از1×10^{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 نمونه ها با استفاده از کیت مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت. محدوده خطی با توجه به تخلیص، غلظت ۱۵۰ IU/ml تا حداقل1×10^{8} IU/ml تعیین شده است.

دقت

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 دریک آزمایش)، تنوع بین-آزمایشی (تنوع در نتایج متعدد حاصل آزمایش‌های مشتق از دستگاه‌های متفاوت و یا دستگاه یکسان اما توسط اوپراتورهای مختلف آزمایشگاه)، و تنوع بین-بچ (inter-batch) تنوع در نتایج متعدد حاصل از استفاده ازbatchهای مختلف است. داده‌های بدست آمده براي 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 در۲۰ 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 IU/ml ۷۵می باشد.

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.

پشتیبان فنی

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

نشانه ها

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

اطلاعات تماس

شرکت فناوری بن یاخته- گروه سین مورو

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

خیابان حیدرنیا (دوم شرقی) پلاک9 ، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی :1997775555 پشتیبان فنی: 09301821601

تلفن های تماس 02122082120

Email : info@senmurv.ir Web Site : www.Senmurv.com