

شناسایی می شود. قطعه ای از ژن انسانی (RNase P) در تیوب واکنش به عنوان کنترل داخلی استفاده می شود. کنترل داخلی باید همیشه در نمونه به مقدار کافی موجود باشد. بنابراین، استفاده از یک کنترل داخلی داخلی نه تنها نظارت بر مراحل آزمایش (استخراج RNA و تقویت Real-time PCR) بلکه ارزیابی کفایت نمونه برداری و ذخیره سازی مواد بالینی را ممکن می سازد.

محتویات کیت:

جدول ۱: معرف های کیت

معرف	برچسب	۲۴ تستی	۴۸ تستی	۹۶ تستی
مخلوط واکنش HIV	HIVM	۳۳۶ ال/ Vial	۲ x ۳۳۶ ال/ Vial	۴ x ۳۳۶ ال/ Vial
مخلوط آنزیمی	RT Enzyme	۲۴ ال/ Vial	۲ x ۲۴ ال/ Vial	۴ x ۲۴ ال/ Vial
کنترل مثبت	Positive Control (PC)	۱۰۰ ال/ Vial	۲ x ۱۰۰ ال/ Vial	۴ x ۱۰۰ ال/ Vial

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست:

۱. انواع دستگاه های آزمایشگاهی شامل:
 ۱. یخچال و فریزر ۲۰- درجه آزمایشگاهی
 ۲. هود زیستی کلاس II یا PCR Work station
 ۳. سمپلرهای متغیر
 ۴. میکروسانتریفیوژ
 ۵. میکسر رومیزی
 ۶. دستگاه ارزیابی و کالیبر Real-time PCR با حداقل ۳ کانال FAM (سبز)، و نارنجی (ROX/Texas Red)

۲. موارد مصرفی شامل:

۱. کیت استخراج RNA ویروسی
۲. نوک سمپلر (استریل فیلتر دار ترجیح داده می شود)
۳. میکروتیوب عاری از RNase و DNase

۳. **مواد مصرفی:** دستکش یکبار مصرف فاقد پودر، روپوش های آزمایشگاهی، خودکار علامت گذاری آزمایشگاهی و رول دستمال کاغذی

دستگاه های سازگار با کیت:

این کیت بر روی تمامی دستگاه های Real time PCR دارای کانال سبز (FAM)، رنگ های Texas/ Red /ROX (نارنجی) قابل استفاده است.

عنوان محصول:

کیت تشخیص کیفی ویروس نقص سیستم ایمنی (HIV) به روش Real time PCR

معرفی محصول:

ویروس نقص ایمنی (HIV) که منجر به سندرم اکتسابی نقص ایمنی (AIDS) می گردد. دو نوع ویروس HIV مسئول انتقال این بیماری می باشد (HIV-I، HIV-II) که در شدت و شیوع با یکدیگر تفاوت دارند. اکثر موارد گزارش شده ایدز در سراسر دنیا به ویروس HIV-1 نسبت داده شده است. ویروس HIV از طریق خون آلوده، مایع واژن، شیر مادر، و سایر مایعات بدن منتقل می شود. 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 لنفوسیت های T را آلوده می کند، و این آلودگی منجر به کاهش سطح این سلولها می گردد. و قتیکه سیستم ایمنی بدن به خطر بیفتد دیگر نمیتواند با عفونتهای فرصت طلب مقابله کند. در این مرحله، فرد آلوده به طور فزاینده علایمی را بروز میدهد که بر اثر چنین عفونتهایی ایجاد میشود. از این رو HIV به عنوان یکی از چالشهای مهم بهداشت عمومی در جهان مطرح است که تشخیص به موقع موارد آن برای تخمین هزینه های بهداشتی و درمانی بسیار مهم می باشد.

اساس آزمایش:

کیت شناسایی کیفی ویروس نقص ایمنی (HIV) بر مبنای روش Real time PCR با استفاده از پروب TaqMan خاص برای شناسایی کیفی ویروس نقص ایمنی (HIV) طراحی شده است. این روش مبتنی بر تکثیر همزمان (Multiplex PCR) قطعات RNA ویروس HIV است. تجزیه و تحلیل Real-time PCR برای حضور این عوامل در ۱ تیوب انجام می شود که عامل در کانال فلورسنت سبز

نگهداری کیت:

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای 20°C - درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری شوند. حفظ دما در مدت زمان نگهداری محصول الزامی است.

۲. با افزایش دفعات ذوب کردن مجدد مواد، از حساسیت کیت کاسته می شود. برای کارایی هر چه بهتر کیت، از ذوب و یخ زدگی چندین باره محلول ها (بیش از ۳ مرتبه) خودداری شود.

۳. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج بر روی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای مذکور پایدار هستند.

۴. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابه جایی درب معرف ها بپرهیزید.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱. نوع نمونه: خون و پلاسما

۲. شرایط نمونه گیری: جمع آوری بر اساس شرایط و نوع نمونه طبق پروتکل های موجود انجام گیرد.

۳. نگهداری نمونه: نمونه دریافت شده می تواند بلافاصله برای آزمایش مورد استفاده قرار گیرد. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، می توان برای مدت ۴۸ ساعت در دمای 2°C تا 8°C درجه سانتیگراد نگهداری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در 20°C - سانتیگراد نگهداری شود.

۴. از ذوب و انجماد مکرر نمونه ها اجتناب کنید. نمونه های منجمد باید قبل از آزمایش به آرامی، اما به طور کامل مخلوط شوند تا کاملاً یکنواخت و همگن گردند.

احتیاطات و هشدارها:

۱. کیت فقط برای تشخیص آزمایشگاهی کاربرد دارد. از نتایج این کیت به تنهایی جهت تشخیص تأیید یا رد عفونت نباید استفاده نمود. ۲. پیش از استفاده از کیت، ویال ها رو از لحاظ نشستی یا آسیب بررسی کنید.

۳. کیت را هنگام نگهداری و حین حمل و نقل به حالت ایستاده قرار دهید و از تماس تمام معرف ها با نور مستقیم جلوگیری شود.

۴. در طی انجام مراحل استخراج یا آماده سازی مخلوط واکنش، دستکش های خود را بین هر مرحله مرتب تعویض کنید تا از ایجاد آلودگی های کاذب در روند آزمایش جلوگیری شود. مراحل کار باید طبق شرایط استاندارد آزمایشگاه در پیشگیری از ایجاد آلودگی و عفونت انجام گیرد و همچنین شرایط دفع زباله های عفونی این تست به مانند دیگر عوامل بیماری زا می باشد.

۵. تمامی وسایل که در آزمایشگاه PCR مورد استفاده قرار می گیرند باید قبل و بعد از انجام تست با هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ و الکل ۷۰٪ ضد عفونی شوند و از جابه جایی این وسایل بین بخش های مختلف پرهیز کنید. در واقع هر بخش باید وسایل، مواد و مخصوصاً سمپلر مختص به خود را داشته باشد. در زمان انجام تست از نوک سمپلر فیلتر دار استفاده شود.

۶. کیت حاوی کنترل مثبت می باشد برای جلوگیری از ایجاد آلودگی به دیگر اجزای کیت، بهتر است آنرا از دیگر اجزای کیت جدا و در یک جعبه دیگر قرار دهید و در مواقع استفاده احتیاط کنید.

آماده سازی معرف ها:

نکات مهم در انجام تست:

۱. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد. ۲. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.

۳. فرایند پیپتینگ از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. پیپتینگ ناکافی باعث تغییر غلظت مناسب مسترمیکس و پرایمر و پروب ها خواهد شد.

۴. در هر بار انجام آزمایش کنترل مثبت کیت باید استفاده شود تا کارائی واکنش مورد ارزیابی قرار گیرد.

۵. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، تیوب ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به تیوب از محیط خارج شوند.

۶. هر نوع نمونه یا ماده کنترلی که حاوی رنگ باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش بر روی آنها ممکن است منجر به نتایج کاذب شود.

نکات مهم در انجام تست:

۱. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.
 ۲. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.
 ۳. بهتر است کنترل ها و نمونه ها را به صورت دوتایی (Duplicate) آزمایش کنید و میانگین CT جهت محاسبه نتایج مورد استفاده قرار گیرد.
 ۴. فرآیند پیپتینگ از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. پیپتینگ ناکافی باعث تغییر غلظت مناسب مسترمیکس و پرایمر و پروب ها خواهد شد.
 ۵. در هر بار انجام آزمایش کنترل مثبت کیت باید استفاده شود تا کارائی واکنش مورد ارزیابی قرار گیرد.
 ۶. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، تیوب ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به تیوب از محیط خارج شوند.
 ۷. هر نوع نمونه یا ماده کنترلی که حاوی رنگ باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش بر روی آنها ممکن است منجر به نتایج کاذب شود.
- میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.
- ۳- ۱ میکرولیتر از RT-Enzyme را به تمامی میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.
- ۴- ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل را به میکروتیوب NTC اضافه کنید.
- ۵- ۵ میکرولیتر کنترل منفی به میکروتیوب هایی که برای آن نام گذاری شده است اضافه کنید.
- ۶- ۵ میکرولیتر از کنترل مثبت در یک فضای دور از محوطه آماده سازی سایر مخلوط های واکنش به تیوب واکنش کنترل مثبت اضافه کنید.
- ۷- ۵-۱۰ میکرولیتر از RNA نمونه بیماران را به میکروتیوب هایی که برای بیماران نام گذاری شده است اضافه کنید.

جدول ۲: مقادیر واکنش

مواد مورد نیاز برای هر تست	میزان مورد نیاز برای هر تست
مخلوط واکنش HIV	۱۴ میکرولیتر + ۱ میکرولیتر
الگو (کنترل منفی، RNA بیمار، کنترل مثبت)	۵-۱۰ میکرولیتر
حجم نهائی واکنش	۲۰-۲۵ میکرولیتر

انجام واکنش Real-time PCR:

تیوب واکنش را در دستگاه Real time PCR قرار دهید و برنامه دمایی زیر را اجرا کنید. مشخصات تیوب های واکنش و نوع خوانش فلورسنت در هر تیوب را در جدول زیر مشاهده می کنید.

جدول ۳: مشخصات تیوب های واکنش و نوع خوانش تارگت های کیت

HIV	تارگت ها
FAM	ویروس HIV
ROX	کنترل داخلی

پس از انجام تنظیمات و انتخاب کانال خوانش، فایل را ذخیره کرده و دستگاه را با برنامه دمائی و زمانی زیر راه اندازی کنید.

جدول ۴: مشخصات واکنش حرارتی

تعداد سیکل	زمان	دما (°C)	مراحل
۱	۳۰ min	۵۰	Reverse transcription
۱	۵ min	۹۵	Initial Denaturation
۴۰	۲۰ sec	۹۵	Annealing/ Extension
۴۰	۴۰ sec	۵۵*	(FAM/ROX)

* مرحله ای که خوانش انجام شود.

۱. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.
۲. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.
۳. بهتر است کنترل ها و نمونه ها را به صورت دوتایی (Duplicate) آزمایش کنید و میانگین CT جهت محاسبه نتایج مورد استفاده قرار گیرد.
۴. فرآیند پیپتینگ از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. پیپتینگ ناکافی باعث تغییر غلظت مناسب مسترمیکس و پرایمر و پروب ها خواهد شد.
۵. در هر بار انجام آزمایش کنترل مثبت کیت باید استفاده شود تا کارائی واکنش مورد ارزیابی قرار گیرد.
۶. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، تیوب ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به تیوب از محیط خارج شوند.
۷. هر نوع نمونه یا ماده کنترلی که حاوی رنگ باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش بر روی آنها ممکن است منجر به نتایج کاذب شود.

روش انجام آزمایش:

آماده سازی قبل از واکنش Real-time PCR:

با استفاده از کیت های تخلیص ژنوم ویروسی، نسبت به استخراج RNA از نمونه بالینی اقدام شود. لازم به ذکر است این محصول در بردارنده کیت استخراج RNA نیست ولی با بیشتر کیت های تخلیص اسید نوکلئیک ویروسی نظیر QIAamp Viral DNA Mini Kit یا High Pure Viral Nucleic Acid Roche همخوانی دارد.

آماده سازی مخلوط واکنش Real-time PCR

کیفی تک مرحله ای:

اسید نوکلئیک استخراج شده مستقیماً در واکنش qPCR مورد استفاده قرار می گیرد. ابتدا در محل مناسب و استریل، محتویات کیت را از داخل بسته بندی خارج کرده و اجازه دهید تا در دمای اتاق ذوب شوند. مراحل مطابق با مراحل زیر انجام می شود:

۱- جهت انجام آزمایش، مواد و واکنش گر را روی یخ قرار دهید.

۲- ۱۴ میکرولیتر از هر کدام از HIVM به تمامی

محاسبه نتایج:

پس از اتمام واکنش، نتایج ذخیره شده را مطابق با جدول زیر آنالیز کنید.

جدول ۵: تفسیر نتایج کیت

فازها	مورد انتظار و معنیت	نتیجه و تفسیر
کنترل منفی	عدم حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM یا CT بالتر از ۳۸ و وجود منحنی تکثیر در کانال ROX در CT کمتر از ۳۵.	معتبر
کنترل NTC	عدم حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و ROX یا CT بالتر از ۳۸	معتبر
کنترل مثبت	حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM نشان دهنده HIV و منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال ROX، نتیجه CT باید برای کانال FAM ۲۶-۲۷ باشد.	معتبر
HIV	حضور تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و منحنی تکثیر در کانال ROX در CT کمتر از ۳۵	مثبت
HIV	حضور تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و عدم منحنی تکثیر در کانال ROX در CT کمتر از ۳۵	مثبت
HIV	حضور تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و منحنی تکثیر در کانال ROX در CT بالتر از ۳۵	تکرار استخراج و در صورت تکرار همین نتیجه: مثبت
HIV	عدم تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و عدم منحنی تکثیر در کانال ROX	تکرار استخراج و در صورت تکرار همین نتیجه: تکرار نمونه گیری
HIV	عدم تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و منحنی تکثیر در کانال ROX در CT پائین تر از ۳۵	منفی

* توجه داشته باشید نمونه نهایی زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموئیدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.

کنترل کیفی:

در هر کیت علاوه بر مسترمیکس سه میکروتیوب شامل کنترل منفی و مثبت وجود دارد که مشخصات هر یک بر روی برچسب ویال درج شده است. علاوه بر کنترل های داخل کیت، کارشناس آزمایشگاه می تواند از نمونه های مثبت که در خود آزمایشگاه تهیه شده نیز استفاده نماید.

خصوصیات اجرایی کیت:

۱- حد پایینی اندازه گیری (Lower limit of measurement):
حد آشکار سازی (Limit-of-detection: LOD)،

مطابق با راهنمای EPIV-A^۲ مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) بدست آمد.

برای تعیین حد آشکار سازی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس HIV بررسی شده است و معادل ۱۰^۳ و نیم واحد در میلی لیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیترو ویروس در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیترو نمونه به کمتر از این میزان اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود.

۲- خطی بودن (Linearity):

خطی بودن این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس HIV بررسی شده است و شامل بازه دو میلیون و پانصد هزار واحد در میلی لیتر تا پنج واحد در میلی لیتر می باشد.

۳- رنج دینامیک (Dynamic Range):

رنج دینامیک و رنج خطی کیت موجود برابر با ۱۰^۱ تا ۱۰^۹ می باشد. و ضریب همبستگی واکنش (R^۲) در حدود ۰/۹۹۹ می باشد. همچنین بازده (Efficiency) واکنش در کانال های مختلف برابر با ۹۸٪ تا ۹۹٪ است.

۴- دقت (Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت شناسایی کیفی ویروس (HIV) به روش Real-time PCR فعلی و نمونه های تهیه شده از نمونه های بیمار مثبت در سه غلظت مختلف مطابق با راهنمای EP۰۵-A^۳ مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) بدست آمد. ضریب تغییرات دقت درونی سنجی کمتر از ۱/۵٪ و برون سنجی ۰/۳٪ محاسبه گردید. بدین ترتیب ضرایب تغییرات بدست آمده موید تکرار پذیری کیت شناسایی کیفی ویروس HIV به روش Real-time PCR فعلی می باشد.

۵- اختصاصیت (Specificity):

ارزیابی اختصاصیت مطابق با راهنمای EP۰۷-A^۴ مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI)، جهت تعیین واکنش متقاطع (cross reaction) کیت شناسایی کیفی ویروس (HIV) به روش Real-time PCR فعلی با سایر DNA

HENRY'S clinical. (2017). McPherson R.A. et al. 6
diagnosis and management by laboratory
Elsevier Inc. (4-373 .pp). 23rd ed. Methods
Mosby's Manual of. (2018). Pagana K.D. et al. 7
pp). 6th ed. diagnostic and Laboratory tests
Elsevier Inc. (7--435
Clinical chemistry. (2018). Rifai Nader. et al. 8
(8-1587 .pp). 6th ed. and molecular diagnostics
Elsevier Inc

و RNA ویروس ها مختلف شامل هرپس
سیمپلکس ویروس تایپ او ۲، ابشتن بار ویروس،
HHV-۶-۷-۸، آدنووایروس، CMV، HBV و VZV،
انتروویروس، ویروس تب نیل غربی و ویروس B۱۹
واکنش متقاطع ندارد و اختصاصیت بالینی ۱۰۰
درصد است. همچنین ارزیابی درصد تداخل از
ناحیه مداخله گره های آلبومین، گلوکز، بیلی روبین،
چربی، اوره، اسید اوریک و گلبول قرمز انجام و
مشخص گردید که تأثیری بر ردیابی ویروس
(HIV)، ندارد.

جدول نمادها:

REF	Catalog number	شماره رفرنس
LOT	Batch code	سری ساخت
IVD	In vitro diagnostic medical device	فرآورده تشخیصی و بالینی
📅	Date of manufacture	تاریخ تولید
🕒	Expiry date	تاریخ انقضا
🌡️	Temperature limitation	دمای نگهداری
📖	Read instructions before use	مطالعه بروشور
📋	Sufficient for n tests	محتویات برای n تست کافیست
⚠️	Caution consult accompanying documents	توجه به مدارک همراه
🏭	Manufacturer	آدرس شرکت
☀️	Keep away from sunlight	در جای تاریک نگهداری شود

۶- حساسیت (Sensitivity):

ارزیابی حساسیت مطابق با راهنمای EP۰۷-A^۲
مؤسسه استانداردهای بالینی و
آزمایشگاهی (CLSI)، جهت تعیین حساسیت بالینی
کیت شناسایی کیفی ویروس HIV به روش
Real-time PCR فعلی در مقایسه با کیت مستقل
دیگر روی ۹۶ نمونه بالینی مثبت و ۴۵ نمونه
منفی از نظر ویروس مدنظر انجام شد که میزان
حساسیت بالینی ۹۹٫۳٪ (۹۵٪ CI: ۹۶٫۷-۱۰۰٪)
حاصل شد.

۷- پدیده هوک:

در این کیت پدیده هوک تا ۹:CT مشاهده نگردید.

منابع و مراجع:

1. CLSI. Evaluation of detection capability for. clinical laboratory measurement procedures; 2nd ed. CLSI document EP.approved guideline Pierson-Perry J.F. Clinical and .A2-17 Laboratory Standard Institute, 2012.
2. CLSI. Evaluation of precision of quantitative. measurement procedures; approved guideline. McEnroe R.J. Clinical .A3-05 CLSI document EP and Laboratory Standard Institute, 2014.
3. CLSI. Interference Testing in clinical .2nd ed. CLSI.chemistry; approved guideline McEnroe R.J. Clinical and .A23-document EP07 Laboratory Standard Institute, 2005.
4. Desirable Specifications for Total Error, and Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation, <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>.
5. Harrison's principles .(2015). Kasper D.L. et al. 19th ed. Mc Graw Hill.of internal medicine .Education