V.2.0.2

عنوان محصول:

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

معرفی محصول:

ویروس نقص ایمنی (HIV) که منجر به سندرم اکتسابی نقص ایمنی (AIDS) میگردد. دو نوع ویروس HIV مسئول انتقال این بیماری میباشد (HIV-I, HIV-II) که در شدت و شیوع با یکدیگر تفاوت دارند. اکثر موارد گزارش شده ایدز در سراسر دنیا به ویروس HIV-I نسبت داده شده است. ویروس HIV از طریق خون آلوده، مایع واژن، شیر مادر، و سایر مایعات بدن منتقل میشود. 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 HIVدر ابتدا سلولهای سیستم ایمنی مانند لنفوسیتهای Tرا آلوده میکند، و این آلودگی منجر به کاهش سطح این سلولها میگردد. وقتیکه 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 براثر چنین عفونتهایی ایجاد میشود. از این روHIV 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 شناسایي کیفی ویروس نقص ایمنی (HIV) بر مبنای روش Real time PCR با استفاده از پروب TaqMan خاص برای شناسایي کیفی ویروس نقص ایمنی (HIV) طراحي 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 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	۳۶۰ µl/Vial	۲ × ۳۳۶ µl/Vial	۴ × ۳۳۶ µl/Vial
مخلوط آنزیمی	RT Enzyme	۲۴ µl/Vial	۲ × ۲۴ µl/Vial	۴ × ۲۴ µl/Vial
استاندارد ۱ (10^4 copy/µl)	HIV STD-۱	۱۰۰ µl/Vial	۲ × ۱۰۰ µl/Vial	۴ × ۱۰۰ µl/Vial
استاندارد ۲ (10^3 copy/µl)	HIV STD-۲	۱۰۰ µl/Vial	۲ × ۱۰۰ µl/Vial	۴ × ۱۰۰ µl/Vial
استاندارد ۳ (10^2 copy/µl)	HIV STD-۳	۱۰۰ µl/Vial	۲ × ۱۰۰ µl/Vial	۴ × ۱۰۰ µl/Vial
استاندارد ۴ (10^1 copy/µl)	HIV STD-۴	۱۰۰ µl/Vial	۲ × ۱۰۰ µl/Vial	۴ × ۱۰۰ µl/Vial
کنترل منفی	Negative Control (NC)	۱۰۰ µl/Vial	۲ × ۱۰۰ µl/Vial	۴ × ۱۰۰ µl/Vial
کنترل مثبت	Positive Control (PC)	۱۰۰ µl/Vial	۲ × ۱۰۰ µl/Vial	۴ × ۱۰۰ µl/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 هاي سازگار با کیت:

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

نگهداری کیت:

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای ۲۰- درجه سانتي گراد و در تاريکي نگهداري شوند. حفظ دما در مدت زمان نگهداری محصول الزامی است.

۲. با افزایش دفعات ذوب کردن مجدد مواد، از حساسیت کیت کاسته می شود. براي کارايي هر چه بهتر کيت، از ذوب و يخ زدگي چندين باره محلول ها (بیش از ۳ مرتبه) خودداري شود.

۳. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج برروی 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 نمونه‌گیری: 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 ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگهداری کرد. برای مدت طولانی‌تر نمونه ها باید در°۲۰C- 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 تائید یا رد عفونت نباید استفاده نمود.

۲. پیش از استفاده از کیت، ویال ها رو از لحاظ نشتی 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 می‌گیرند باید قبل و بعد از انجام تست با هیپوکلریت سدیم ۱۰% و الکل ۷۰% ضد عفونی شوند و از جابه‌جایی این وسایل بین بخش های مختلف پرهیز کنید. در واقع هر بخش باید وسایل، مواد و مخصوصا 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 برروی 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 برروی 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 مستقیما در واکنش qPCR مورد استفاده قرار مي 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- در یک ران کاری ۴ استاندارد HIV استفاده می شود و برای هر بیمار ۵ میکروتیوب همراه با میکروتیوب‌های کنترل منفی و NTC نامگذاری نمایید.
۲- جهت انجام آزمایش، مواد و واکنش¬گر را روی یخ قرار دهید.
۳- ۱۴ میکرولیتر از هر کدام از HIVM به تمامی میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.
۴- ۱ میکرولیتر از RT-Enzyme را به تمامی میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.
۵- ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل را به میکروتیوب NTC اضافه کنید.
۶- ۵ میکرولیتر کنترل منفی به میکروتیوب هایی که برای آن نام گذاری شده است اضافه کنید.
۷- ۵ میکرولیتر از استانداردها در یک فضای دور از محوطه آماده سازی سایر مخلوط‌های واکنش به تیوب واکنش استانداردها اضافه کنید.
۸- 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.

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 معتبر	نتیجه و تفسیر
کنترل منفی	عدم حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM یا CT بالاتر 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 بالاتر 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 ۲۶-۲۲ 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 بالاتر 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: تکرارنمونه 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 تنها زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.

محاسبه تیتر ویروس:

این کیت حاوی ۴ استاندارد است که غلظت‌های آنها مشخص شده است، با استفاده از این استانداردها میزان ویروس در نمونه بیمار معین می‌شود و تعریف می‌شود. (copy/ µl) IU/ µl واحد آن برحسب منحنی استاندارد با استفاده از این استانداردها رسم می‌شود. تبدیل نتایج به صورت واحد در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده می‌شود

$$\text{غلظت (copy/ ml)} = \frac{\text{غلظت (copy/ µl)} \times \text{حجم بافر elution (µl)}}{\text{حجم نمونه (ml)}}$$

به طور مثال اگر ۲۵۰ میکرولیتر پلاسما استخراج و حاصل در ۵۰ میکرولیتر بافر حل شود، نتایج RNA باید در عدد ۵۰ ضرب شود و بر ۲۵۰ تقسیم شود تا .تبدیل شوند (copy/ml) به واحد کپی در میلی لیتر

کنترل کیفی:

در هر کیت علاوه بر مسترمیکس سه میکروتیوب شامل کنترل منفی و مثبت وجود دارد که مشخصات هر یک برروی 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- حدپایینی اندازه گیری(Lower limit of measurement):

حد آشکار سازی(Limit-of-detection: LOD)، مطابق با راهنمای EP۱۷-A۲ 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 ویروس HIV بررسی شده است و معادل یك و نیم واحد در میلی لیتر می باشد. یعنی در ۹۵ % مواردی که تیتر ویروس در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیتر نمونه به کمتر از این میزان اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود.

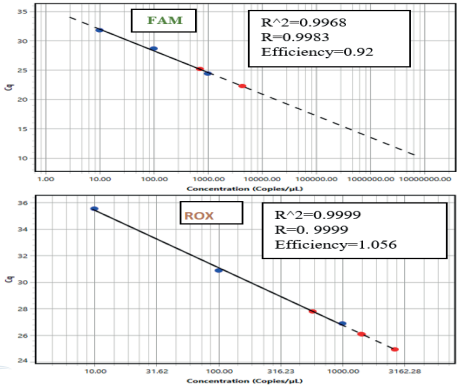
۲- خطی بودن (Linearity):

خطّی 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.

biosina

۳- رنج دینامیک (Dynamic Range):

رنج دینامیک و رنج خطی کیت موجود برابر با 10^1 تا 10^9 می باشد. و ضریب همبستگی واکنش (r^2) 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 EP05-A[3] 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 EP07-A[2] 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 و RNA ویروس ها مختلف شامل هرپس سیمپلکس ویروس تایپ او ۲، ابشتن بار ویروس، HHV-6-7-8، آدنوویروس، CMV، HBV و VZV ، انتروویروس، ویروس تب نیل غربی و ویروس B19 واکنش متقاطع ندارد و اختصاصیت بالینی ۱۰۰ درصد است. همچنین ارزیابی درصد تداخل از ناحیه مداخله گرهای آلبومین، گلوکز، بیلی روبین، چربی، اوره، اسید اوریک و گلبول قرمز انجام و مشخص گردید که تأثیری بر ردیابی ویروس (HIV)، ندارد.

۶- حساسیت (Sensitivity):

ارزیابی حساسیت مطابق با راهنمای EP07-A[2] 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 9:CT مشاهده نگردید.

منابع و مراجع:

1. CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP 17-A2. Pierson-Perry J.F. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012.
2. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.
3. CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.
4. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation, https://www.westgard.com/biodatabase1.htm
5. Kasper D.L. et al. (2015). Harrison's principles of internal medicine.19th ed. Mc Graw Hill Education.
6. McPherson R.A. et al. (2017). HENRY'S clinical diagnosis and management by laboratory Methods. 23rd ed. (pp. 4-373). Elsevier Inc.
7. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. (pp. 7–435). Elsevier Inc.
8. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. (pp. 8-1587) Elsevier Inc.

جدول نمادها:

REF	Catalog number	شماره رفرنس
LOT	Batch code	سری ساخت
IVD	In vitro diagnostic medical device	فرآورده تشخیصی و بالینی
	Data of manufacture	تاریخ تولید
	Expiry date	تاریخ انقضا
	Temperature limitation	دمای نگهداری
	Read instructions befor 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