راهنمای کیت HIV RQ

جهت تشخیص و کمیت سنجی HIV-1 RNA
به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-24-100
ویرایش ۱/۰
مرداد ۱۳۹۷

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱. مقدمه..... ۲

۲. محتویات کیت..... ۳

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت..... ۳

۴. سایر موارد مورد نیاز..... ۴

۵. نکات قابل توجه..... ۴

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن..... ۵

۷. عوامل مزاحم..... ۶

۸. استخراج RNA..... ۶

۹. کنترل داخلی..... ۶

۱۰. محاسبه تیتر ویروس..... ۷

۱۱. دستورکار PCR..... ۷

۱۲. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۸

۱۳. تنظیم دستگاه StepOne..... ۹

۱۴. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۹

۱۵. آنالیز نتایج Rotor-Gene ۱۱

۱۶. آنالیز نتایج StepOne..... ۱۳

۱۷. محدوده خطی..... ۱۴

۱۸. میزان حساسیت..... ۱۴

کیت **HIV-1 RQ** جهت تشخیص و کمیت سنجی RNA ویروس HIV-1 (Group M, subtypes A-H; Group N) در پلاسما می باشد. این کیت برای کار با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است و مخصوص مصارف تحقیقاتی می باشد.

۱. مقدمه

ویروس نقص ایمنی انسانی یا HIV (Human Immunodeficiency Virus) یک رتروویروس با ژنومی متشکل از دو رشته RNA و هر یک به طول حدود ۹۷۰۰ نوکلئوتید می باشد. عفونت با این ویروس باعث تضعیف سیستم ایمنی میزبان شده و با گذشت زمان می تواند منتهی به بیماری نقص اکتسابی سیستم ایمنی یا AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) شود. دو نوع از این ویروس در عفونت های انسانی شناسائی شده اند: HIV-1 و HIV-2 که از نظر بیماریزایی و شیوع با یکدیگر تفاوت دارند. بیشتر موارد جهانی ابتلا به ویروس HIV-1 نسبت داده شده است و عفونت با HIV-2 عمدتا محدود به ناحیه غرب آفریقا می باشد. مطابق آمار سازمان بهداشت جهانی حدود ۴۰ میلیون نفر در سرتاسر دنیا به این ویروس مبتلا هستند. درمان قطعی برای این ویروس وجود ندارد اما با رژیم درمانی ART، افراد مبتلا می توانند تا حد زیادی از عوارض بیماری محافظت شوند.

تحقیقات نشان می دهند که یکی از مطمئن ترین روش ها برای تشخیص این بیماری یافتن RNA ویروس به روش RT-PCR در نمونه می باشد. با این روش تشخیص بیماری حدود دو تا سه هفته زودتر از روش های مبتنی بر جستجوی آنتی ژن و آنتی بادی امکان پذیر می شود. همچنین با این روش می توان میزان

ویروس در خون بیمار را نیز سنجید و در نتیجه به عنوان بهترین روش برای ارزیابی موفقیت درمان شناخته می شود.

کیت حاضر امکان بررسی نمونه جهت تشخیص و تعیین تیتر ویروس HIV-1 (شامل ساب تایپهای A-H از گروه M و نیز گروه N) را به روش One-Step Real-Time RT-PCR فراهم می کند. در حال حاضر در مقایسه با سایر روش های ارزیابی میزان ویروس، این روش دارای بیشترین حساسیت و وسیع ترین دامنه اندازه گیری می باشد. در این تکنیک با استفاده از پروب های نشاندار شده به رنگ های فلورسنت می توان محصول PCR را بررسی نمود. بر همین اساس می توان تعداد ویروس را در نمونه مورد بررسی تعیین نمود بدون این که پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به این که در این روش نیازی به بررسی محصول PCR وجود ندارد، احتمال ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت. این کیت برای استفاده با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می‌باشد که از گزارش منفی کاذب حاصل از ناکارآمدی PCR پیشگیری می کند.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک لوح فشرده و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
HIV Mix	میکس RT-PCR *	۳۶۰ میکرولیتر
HIV S1	استاندارد ۱: پنجاه هزار واحد در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HIV S2	استاندارد ۲: پنج هزار واحد در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HIV S3	استاندارد ۳: پانصد واحد در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HIV S4	استاندارد ۴: پنجاه واحد در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

*یک، دو یا چهار عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر این مواد به ویژه میکس PCR بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

۴. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج RNA
- تیوب ۱/۷ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

برای کار با این کیت نیازی به مواد سنتز cDNA ندارید!

۵. نکات قابل توجه

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج ، فضای آماده سازی مواد (برای انتقال میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه RNA به لوله PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود داشته باشند به ویژه سمپلر. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.
- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- پیش از باز کردن درپوش لوله های کیت، آن ها را روی یخ خرد شده نگهداری کنید تا کاملاً ذوب شود. سپس با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین اسپین کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آنها می شود.

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش HIV-1 با این کیت، پلاسمای خون محیطی (peripheral blood) می باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می توان تا ۷۲ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. هنگام

دریافت نمونه در آزمایشگاه باید پس از سانتریفوژ پلاسمای آن را جدا نموده و در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. نمونه پلاسما در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیتر ویروس در آن ثابت می ماند.
حداقل نمونه توصیه شده برای آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما می باشد که نیازمند نیم میلی لیتر خون کامل می باشد.

۷. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می شود. به همین دلیل لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی باشد.

مقادیر بالای بیلیروبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰ میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمی کند.

۸. کنترل داخلی

برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار واکنش و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، این کیت حاوی کنترل داخلی می‌باشد.
در صورت موفق بودن PCR کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۷ تا ۳۵ می شود.

۹. استخراج RNA

برای استخراج RNA از نمونه پلاسما از روش ها و کیت های مختلفی می توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می کنیم:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat# 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Cat. no. 52904, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAamp UltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAamp MiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۱۰. دستورکار PCR

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا به طور کامل محتویات آن ها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آن ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن ها را با سرعت کم سانتریفوژ کنید.

به تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، چهار لوله برای استانداردها و یک لوله برای کنترل منفی نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله ۱۵ میکرولیتر از HIV Mix اضافه کنید. سپس ۱۰ میکرولیتر از RNA استخراج شده و یا استاندارد یا آب به هر لوله اضافه کنید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه *StepOne* لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

در لوح فشرده همراه کیت روی فایل HIV 0.1 V1 و یا HIV 0.2 V1 (با توجه به نوع لوله های استفاده شده) دوبار کلیک کنید تا برنامه باز شود.

در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای استانداردها standard را انتخاب کنید. سپس غلظت استانداردها را در ستون سمت راست با عنوان given concentration وارد کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۲. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*) . از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل لوح فشرده همراه کیت را انتخاب کنید.

از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. یک کنترل منفی به همراه چهار استاندارد و تعدادی نمونه از پیش تعریف شده اند. استانداردها، کنترل منفی و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای این کار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی

Define Targets and Samples می توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را اضافه کرده و نام نمونه ها را نیز مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۳. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاههای Real-Time PCR استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**50°C x 30 min**	1
2	**95°C x 15 min**	1
3	**95°C x 30 sec**	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود.

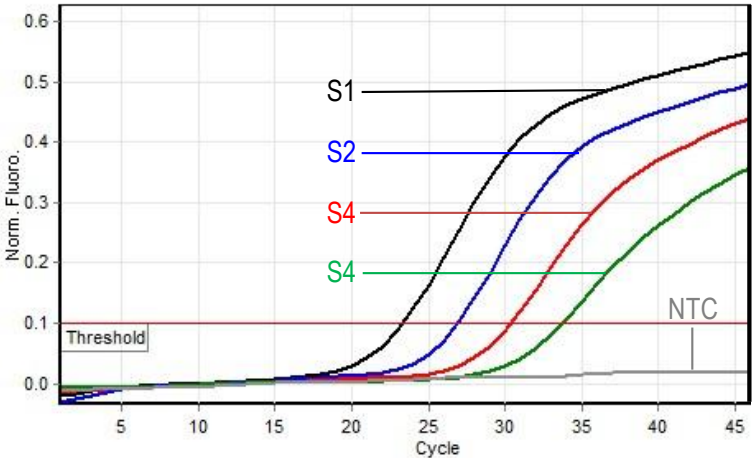
HIV Mix موجود در کیت حاوی ROX می باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nMمی باشد.

۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene

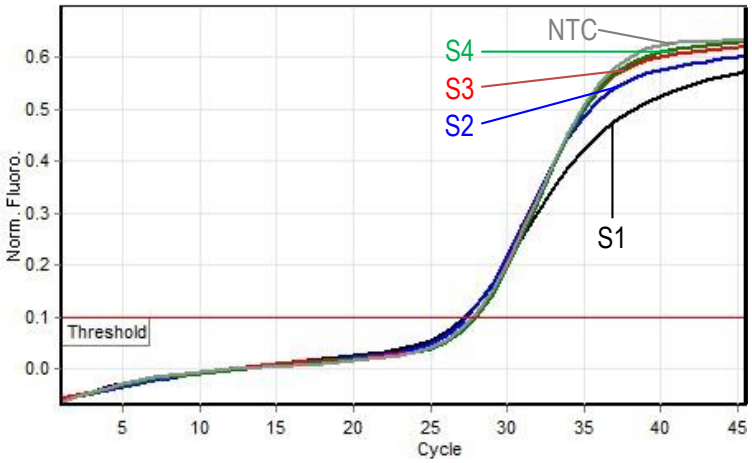
برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold حداقل را روی ۰/۰۲ یا بالاتر از فلورسانس زمینه قرار داده و دکمه OK را بزنید تا پس از رسم منحنی استاندارد نتایج در جدول

پایین صفحه نشان داده شوند. همچنین می توانید به طور ساده آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. سپس در منوی Analysis مجددا Quantitation و سپس Yellow را کلیک کنید. در پنجره autofind threshold دکمه cancel را بزنید و threshold را روی ۰/۱ قرار دهید.

برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید.



تصویر ۱: منحنی استانداردهای HIV در کانال سبز Rotor-Gene



تصویر ۲: منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه Rotor-Gene

توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green) مربوط به HIV** و افزایش **تابش زرد (Yellow) حاصل از کنترل داخلی** می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود 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.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

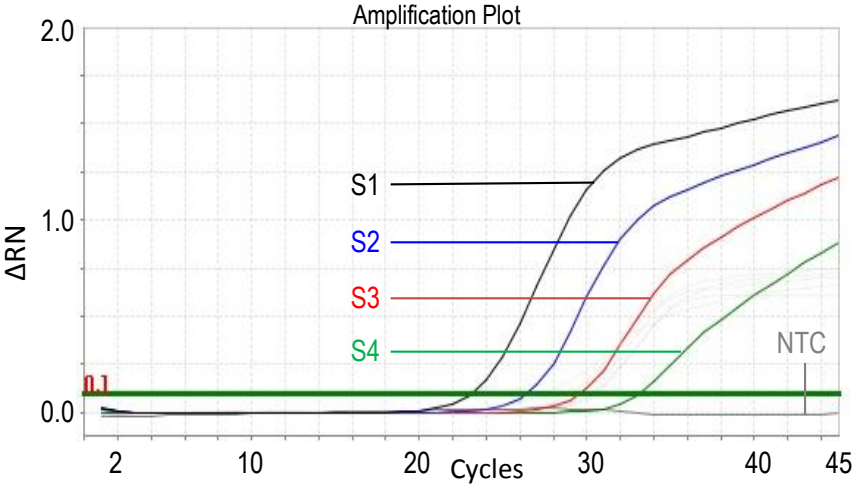
- در صورتی که نمونه در کانال سبز مثبت و دارای نمودار سیگموید و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد می توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیتر محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.

- در صورتی که یک نمونه در کانال سبز منفی باشد ولی در کانال زرد مثبت و دارای منحنی سیگموید و CT بین ۲۷ تا ۳۲ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال سبز و زرد منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

۱۵. آنالیز نتایج StepOne

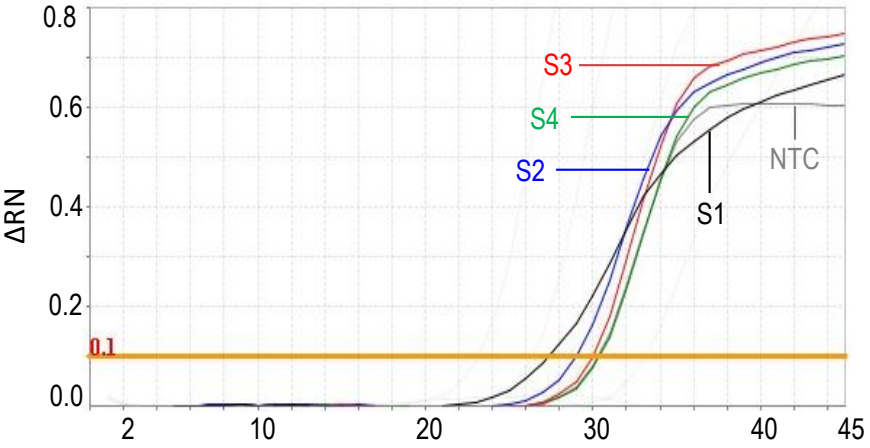
برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای HIV/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ و برای IC/VIC نیز آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید.

برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.



تصویر ۳: منحنی استانداردهای HIV در کانال FAM دستگاه StepOne

Amplification Plot



تصویر ۴: منحنی کنترل داخلی در کانال VIC دستگاه StepOne

توجه داشته باشید که افزایش **تابش HIV/FAM** مربوط به **HIV** و افزایش **تابش IC/VIC** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود 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.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال HIV/FAM مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال IC/VIC می توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیتر محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.

- در صورتی که یک نمونه در کانال HIV/FAM منفی باشد ولی در کانال IC/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموید و CT بین ۳۰ تا ۳۵ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال HIV/FAM و IC/VIC منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

۱۶. محاسبه تیتر ویروس

هر کیت حاوی ۴ استاندارد می باشد که با استفاده از آنها منحنی استاندارد رسم شده و میزان ویروس در نمونه بیمار معین می شود.
تیتر استانداردهای کیت به صورت واحد در میکرولیتر (IU/µl) مشخص شده اند.
برای تبدیل نتایج به صورت واحد در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Result (IU/ml)} = \frac{\text{Result (IU/µl)} \times \text{elution volume (µl)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

به طور مثال چنانچه ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما استخراج و RNA حاصل در ۵۰ میکرولیتر بافر حل شود، نتایج باید در عدد ۲۵۰ ضرب شوند تا به واحد در میلی لیتر (IU/ml) تبدیل شوند.

۱۷. محدوده خطّی

محدوده خطّی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس HIV-1 بررسی شده است و شامل بازه پنجاه میلیون واحد در میکرولیتر تا پنجاه واحد در میکرولیتر می باشد.

۱۸. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس HIV-1 بررسی شده است و معادل ده واحد در میکرولیتر 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 همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

HIV RQ Kit Manual

For Real-Time PCR Detection and Quantitation of HIV-1 RNA

For use with Rotor-Gene or StepOne
Research use only

NG-WI-ASL-24-100
Version 1.0
July 2018

Novin Gene

Table of Contents:

1. Introduction 2
2. Kit Contents 3
3. Storage and Stability 3
4. General Precautions 3
5. Additionally Required Materials 4
6. Specimen, storage and transport 4
7. Interfering substances 5
8. RNA isolation 5
9. Internal control (IC) 5
10. Quantitation 5
11. RT-PCR Protocol 6
12. Programming of the Rotor-Gene 6
13. Programming of StepOne 7
14. Programming other machines 7
15. Data Analysis: Rotor-Gene 9
16. Data Analysis: StepOne 11
17. Linear Range 12
18. Sensitivity 12

HIV RQ kit is intended for the quantitative detection of HIV-RNA (Group M, subtyps A-H; Group N) extracted from plasma. It is designed for use with Rotor-Gene or StepOne machines. This kit is for research use only.

1. Introduction

Human Immunodeficiency virus (HIV) is a retrovirus with 2 strands of RNA as genome, each about 9.7 kb. Infection with this virus, affects the immune system and over the time leads to Aqcuired Immunodeficiency Syndrom (AIDS). There are two types of HIV, HIV-1 and HIV-2. Most of world wide cases are due to HIV-1, while HIV-2 is mostly limited to West Africa. According to WHO, about 40 million people are infected with HIV world wide. Currently there is no cure for HIV but, with ART, patients may have a long and healthy life.

HIV RQ kit provides a ready-to-use One-Step Real-Time RT-PCR system for detection and quantitation of HIV-1 RNA (Group M subtypes A-H; and Group N) with Rotor-Gene or StepOne machines. Currently the Real-Time RT-PCR provides very high sensitivity and widest dynamic range among other methods. In this method application of fluorescent probes allows detection of amplified product. Analysis of fluorescent kinetics also leads to quantification of the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis therefore, reducing the possibility of contamination with the PCR product. This kit also incorporates an *Internal Control (IC)* to identify possible PCR inhibition.

2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with Rotor-Gene and StepOne templates and following reagents:

Label	Content	Quantity
HIV Mix	RT-PCR Master mix	360 µl*
HIV S1	Standard 1: 50,000 IU/ul	150 µl
HIV S2	Standard 2: 5,000 IU/ul	150 µl
HIV S3	Standard 3: 500 IU/ul	150 µl
HIV S4	Standard 4: 50 IU/ul	150 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits respectively.

3. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws especially for HIV Mix more than few times to prevent reduced sensitivity.

4. General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- Treat all samples as potentially infectious.
- Within the pre-PCR work area assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the master-mix is aliquoted into tubes and c) Reaction preparation area for addition of extracted RNA to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.

- Thaw on ice kit components completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Keep RT-PCR Mix tube at -20°C at all times. Take it out just before use and return it to freezer immediately after.
- Do not place 0.2ml PCR tubes on crushed ice. Use cold block instead.

5. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Table top microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- RNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

This kit does not require cDNA synthesis reagents!

6. Specimen, Storage and Transport

We recommend EDTA or citrate plasma for HIV detection. Peripheral blood should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. Whole blood or plasma should be shipped at +4°C. Upon receipt plasma should be separated from whole blood and can be stored at +4°C for few days or aliquoted and stored at -20°C for up to few weeks.

7. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes should not be used. Samples of

heparinized patients must not be used as well. Elevated levels of bilirubin (≤4.5 mg/dl) and lipids (≤1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

8. Internal Control (IC)

In

To examine possible PCR inhibition and to prevent false negative results, the kit contains an *Internal Control* included in HIV Mix. Internal control should generate a CT of 27-32 in Yellow Channel on Rotor-Gene and a CT of 30-35 in VIC channel on StepOne.

9. RNA Isolation

RNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend the following:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat. no. 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Cat. no. 52904, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAamp UltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAamp MiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

To monitor RNA extraction process, internal control should be applied to the extraction process. For more details, please, refer to section 8 of this handbook

10. RT-PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely followed by a brief mixing and a quick spin. Place required number of tubes cold block. Consider one tube for each sample plus one for each standard and one for the negative control.

Pipette 15ul of HIV Mix directly to each tube followed by adding 10ul of isolated RNA or standard or water.

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are caped securely. Place tubes in the machine.

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring too.

11. Programming of the Rotor-Gene

Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the CD provided in the kit and double click on "HIV 0.2" or on "HIV 0.1" depending on the tubes used. Program starts. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save program on desired location.

12. Programming of StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu click on Template and select the file on CD provided with the kit. Click on Plate Setup. One negative control, 4 standards and 10 samples are defined. You may change plate set up using right click options (copy, paste, clear). You may also add/remove samples or change sample name on “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment on desired location. Instrument will start shortly.

13. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**50°C x 30 min**	1
2	**95°C x 15 min**	1
3	**95°C x 30 sec**	45
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC dyes. The HIV Mix contains ROX. Final concentration of ROX in the reaction is 300nM.

14. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure in the sample menu all the standards have been defined as “standard” and the relative concentrations have been entered. Patient samples should be defined as "unknown". Name Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC", respectively.

Analyze data according to manufacturer recommendations. Perform quantitative analysis for **HIV (Green channel)** and qualitative analysis for **Internal Control (Yellow channel)**. Briefly, click on analysis menu and then under Quantitation tab double click on cycling A. Green.

In the pop up for Automatic Threshold increase the minimum or lower bound until it surpasses the negative control or the NTC fluorescence, and then click on OK. Alternatively, you may simply set threshold at 0.1.

Repeat the above for Cycling A. Yellow, cancel the Automatic Threshold and manually put threshold on 0.1.

Figures 1 and 2 represent typical graphs for Rotor-Gene machine.

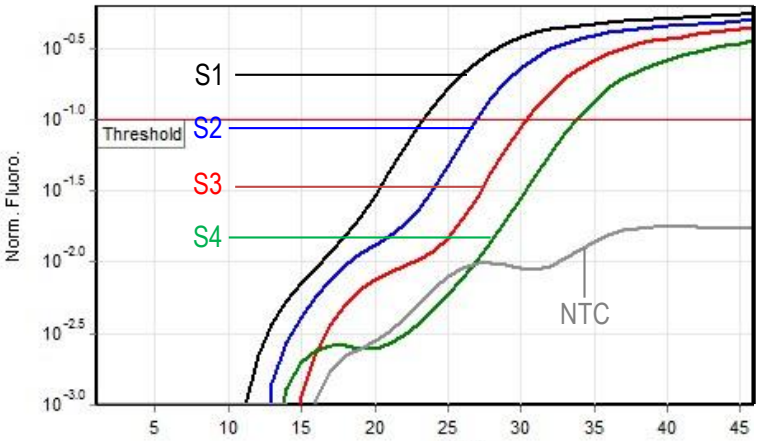


Figure 1: Typical HIV graph in green channel for Rotor-Gene instrument.

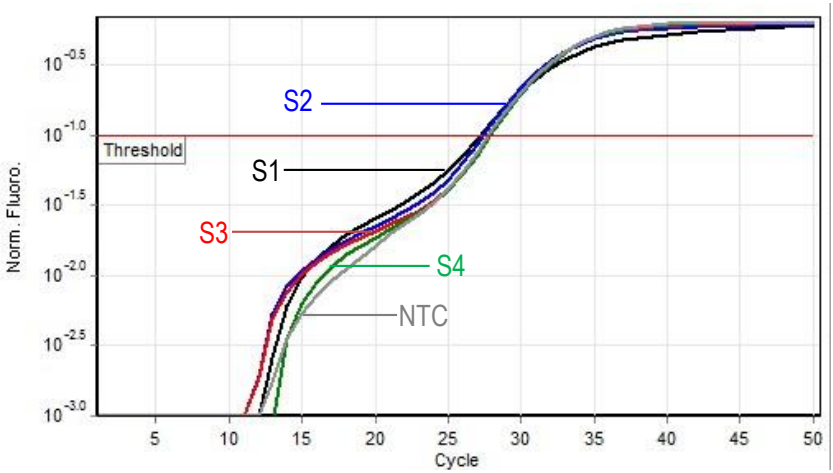


Figure 2: Typical IC graph in yellow channel for Rotor-Gene instrument.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used.
In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in Green channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results in the Cycling A. Green are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in Green channel while it is positive in Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 27-32.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of Green and Yellow channels.

15. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to the manufacturer's recommendations. Briefly, click on Analyze and set the threshold for **HIV/FAM** at 0.1 and at 0.1 for **IC/VIC**.
Figures 3 and 4 represent typical graphs for StepOne machine.

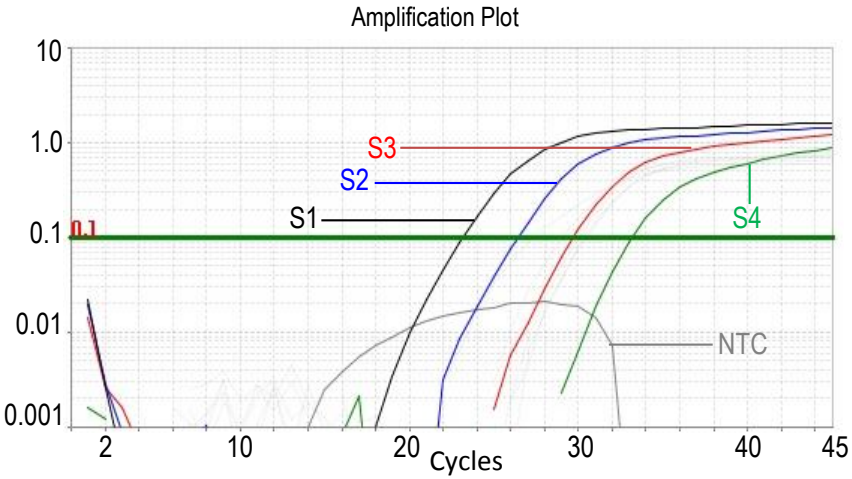


Figure 3: Typical HIV graph in FAM channel for StepOne instrument.

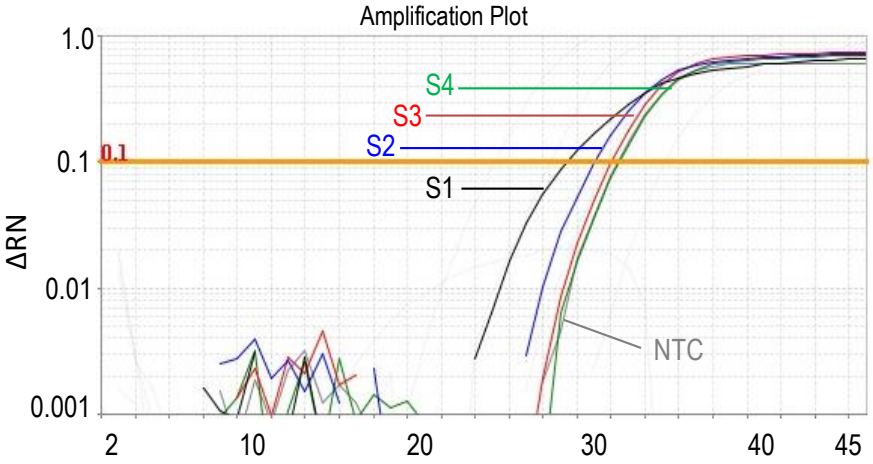


Figure 4: Typical IC graph in VIC channel for StepOne instrument.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used.
In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in FAM/HIV channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in FAM/HIV channel while it is positive in VIC/IC channel with a sigmoid graph and CT of 30-35.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of FAM/HIV and VIC/IC channels.

16. Quantitation

The kit provides 4 quantitation standards with defined titers to generate a standard curve for quantification of samples viral load. Working with Rotor-Gene machine, the standard curve from a previous run can also be imported to the recent run. To do so, at least one standard must be used in the current run. Apparently using all four standards in each run will lead to more accurate results.
Quantitation standards are defined as IU/µl. To convert the result to IU/ml following equation should be used:

$$\text{Result (IU/ml)} = \frac{\text{Result (IU/µl)} \times \text{elution volume (µl)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

"Sample volume" is the plasma volume used for RNA isolation and "Elution volume" is the volume of buffer or water used to elute or dissolve isolated RNA.

17. Linear Range

The linear range of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and showed to be linear in the range of 50,000,000 IU/µl to 50 IU/µl.

18. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and showed a limit of detection equal to 10 IU/µl.