# راهنمای کیت HBV RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۵/۰

جهت تشخیص و کمیت سنجی ویروس هپاتیت ب

به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

Σ 24 (Cat# HBVRQ24)

Σ 48 (Cat# HBVRQ48)

Σ 96 (Cat# HBVRQ96)

NG-WI-ASL-01-500

RUO

**شرکت نوین ژن پارس ویرا**

تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

Novin Gene

# فهرست مندرجات


۱. مقدمه ..... ۳
۲. حیطه کاربرد ..... ۳
۳. اطلاعات زمینه ای ..... ۳
۴. اساس آزمایش ..... ۴
۵. محتویات کیت ..... ۴
۶. مدل های بسته بندی ..... ۵
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت ..... ۵
۸. محدودیت کاربرد ..... ۵
۹. سایر موارد مورد نیاز ..... ۶
۱۰. احتیاط و نکات لازم ..... ۶
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن ..... ۷
۱۲. عوامل مزاحم ..... ۸
۱۳. کنترل داخلی ..... ۸
۱۴. استخراج DNA ..... ۹
۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش ..... ۹
۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها ..... ۱۰
۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene ..... ۱۰
۱۸. تنظیم دستگاه StepOne ..... ۱۲
۱۹. تنظیم سایر دستگاه‌ها ..... ۱۲

۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene ۱۳
۲۱. آنالیز نتایج StepOne ۱۵
۲۲. محاسبه تیتر ویروس ۱۷
۲۳. محدوده خطی ۱۸
۲۴. میزان حساسیت ۱۸
۲۵. روش امحاء ۱۹
۲۶. پشتیبانی فنی ۱۹
۲۷. اطلاعات تماس ۲۰
۲۸. منابع ۲۰
۲۹. توضیحات برچسب ۲۱

## ۱. مقدمه

کیت HBV RQ جهت تشخیص و کمیت سنجی DNA ویروس HBV به روش Real-time PCR طراحی شده است. در این روش، DNA به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین میکس این کیت حاوی سری ثانویه ای از پرایمرها و پروب جهت شناسایی یک توالی سنتتیک به عنوان کنترل داخلی می‌باشد. کنترل داخلی از گزارش منفی کاذب ناشی از استخراج نامناسب و یا مهار PCR جلوگیری می‌کند. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

## ۲. حیطه کاربرد

کیت HBV RQ امکان بررسی نمونه بیمار را جهت تشخیص و کمیت سنجی DNA ویروس با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت جهت استفاده با دستگاه Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

## ۳. اطلاعات زمینه ای

هپاتیت ب (Hepatitis B) یک بیماری عفونی ناشی از ویروسی با همین نام است (Hepatitis B Virus/HBV). این بیماری تقریباً در تمام کشورهای جهان وجود دارد و یکی از مشکلات عمده بهداشت جهانی بشمار می‌رود. با توجه به گزارش ها حدود ۲ میلیارد نفر در دنیا به این ویروس مبتلا شده اند که در حدود ۲۵۰ الی ۳۰۰ میلیون نفر از آنها، بیماری به صورت مزمن بوده و ناقل این عفونت محسوب می‌گردند.

تحقیقات نشان می‌دهند که مطمئن‌ترین روش برای بررسی و مدیریت درمان این بیماری، ارزیابی میزان ویروس در خون بیمار می‌باشد. بر این اساس می‌توان مرحله

بیماری را تعیین نمود و موفقیت درمان را نیز سنجید و در عین حال گونه‌های جدید ویروس را که به درمان مقاوم می‌باشند به سرعت تشخیص داد.

## ۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی عامل عفونی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction/PCR انجام می‌شود. طی این واکنش، بخشی از ژنوم عامل عفونی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می‌شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب‌های فلورسنت قابل تشخیص می‌گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می‌توان وجود عامل عفونی را در نمونه تشخیص داد، بدون آنکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول واکنش با روش‌هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

## ۵. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک فلش کارت و مواد زیر می‌باشد:

| برچسب | محتوا | حجم |
|---|---|---|
| HBV Mix | میکس آماده برای PCR * | ۳۶۰ میکرولیتر |
| HBV S1 | استاندارد ۱: یکصد هزار واحد در میکرولیتر | ۱۵۰ میکرولیتر |
| HBV S2 | استاندارد ۲: ده هزار واحد در میکرولیتر | ۱۵۰ میکرولیتر |
| HBV S3 | استاندارد ۳: یک هزار واحد در میکرولیتر | ۱۵۰ میکرولیتر |
| HBV S4 | استاندارد ۴: یکصد واحد در میکرولیتر | ۱۵۰ میکرولیتر |
| HBV S5 | استاندارد ۵: ده واحد در میکرولیتر | ۱۵۰ میکرولیتر |
| Internal Ctrl | کنترل داخلی* | ۲۵۰ میکرولیتر |

| | | |
|---|---|---|
| Water | آب مخصوص PCR | ۲۰۰ میکرولیتر |

*۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

## ۶. مدل‌های بسته‌بندی

کیت در قالب‌های بیست و چهار، چهل و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می‌باشد.

## ۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل 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 می‌باشند.

از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن‌ها می‌شود.

همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

## ۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه‌ای و آموزش‌دیده طراحی شده است.
- تمامی مراحل کار بایستی مطابق دفترچه راهنمای کامل کیت انجام شود و هرگونه تغییری در آن منجر به بروز خطا در نتایج می‌گردد.
- از محتویات کیت نباید پس از گذشت تاریخ انقضای درج شده روی کیت استفاده شود.
- در صورت تغییر رنگ لیبل حرارتی (به صورتی یا قرمز) حتی به صورت جزئی کیت نباید مورد استفاده قرارگیرد.

- این کیت تنها برای مصارف تحقیقاتی طراحی شده و برای تشخیص طبی (IVD) مورد تایید نمی‌باشد.

## ۹. 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 DNA
- تیوب ۱/۵ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش وینیل یا نیتریل بدون پودر
- بلوک سرد (Cold Block)

## ۱۰. احتیاط و اقدامات لازم

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 افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می‌باشند. هر یک از سه فضای فوق

باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. 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.
- هنگام استفاده، مواد کیت را روی یخ خرد شده نگه دارید تا کاملاً ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن‌ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگه داری کنید. از استفاده از یخ‌های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد مناسب گذاشته، و از گذاشتن آن‌ها بر روی یخ خرد شده خودداری کنید.

## ۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش هپاتیت ب با این کیت، خون کامل (whole blood) و پلاسمای خون محیطی (peripheral blood) می‌باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع‌آوری شده است. ماده ضد انعقاد می‌تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می‌توان تا ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد زیر صفر یا پایین تر نگهداری نمود. نمونه پلاسما در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیتر ویروس در آن ثابت می‌ماند.

حداقل نمونه توصیه شده برای آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما می‌باشد که نیازمند نیم میلی لیتر خون کامل می‌باشد.

## ۱۲. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می‌شود. 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 نمی‌باشد.

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

## ۱۳. کنترل داخلی

برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار PCR و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، این کیت حاوی کنترل داخلی می‌باشد.

کنترل داخلی را می‌توانید در مرحله استخراج استفاده نموده یا آن را صرفاً در مرحله PCR به HBV Mix اضافه نمایید. در حالت اول، کنترل داخلی علاوه بر بررسی مهار واکنش، نشانگر کیفیت استخراج نیز می‌باشد. برای استفاده در مرحله استخراج، کنترل داخلی را پس از افزودن بافر lysis به نمونه، اضافه کنید. میزان مورد نیاز از کنترل داخلی ده درصد حجم حلال نهایی (elution buffer) می‌باشد. یعنی در صورتی که DNA را نهایتاً در ۱۰۰ میکرولیتر بافر حل می‌کنید، ۱۰ میکرولیتر از کنترل داخلی را به مخلوط نمونه و بافر Lysis اضافه نمایید. توجه داشته باشید که کنترل داخلی نباید مستقیماً به نمونه بیمار (یعنی پیش از افزودن بافر lysis) اضافه شود، زیرا کارآیی خود را از دست خواهد داد.

در صورتی که کنترل داخلی را به HBV Mix اضافه می‌نمایید، تنها می‌توانید مهار واکنش PCR را بررسی کنید. به این منظور به ازای هر واکنش PCR، یک میکرولیتر از کنترل داخلی را به HBV Mix اضافه نمایید. به طور مثال برای ۱۰

واکنش به ۱۵۰ میکرولیتر از میکس، ۱۰ میکرولیتر کنترل داخلی اضافه کنید و مخلوط حاصل را مطابق توضیحات بخش ۱۵ استفاده نمایید.

در صورت موفق بودن PCR کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۸ تا ۳۴ می‌شود.

## ۱۴. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه پلاسما از روش‌ها و کیت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت‌های زیر را توصیه می‌کنیم:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat# 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampUltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampMiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

در صورتی که تمایل دارید استخراج DNA از نمونه را با استفاده از کنترل داخلی بررسی نمایید، به توضیحات مربوط در قسمت ۱۳ (کنترل داخلی) مراجعه کنید.

## ۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی لوله های کیت را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، ۵ لوله برای استانداردها و یک لوله برای کنترل منفی نیز در نظر بگیرید.

**در صورتی که کنترل داخلی را در حین استخراج وارد کرده اید، به هر لوله مستقیماً ۱۵ میکرولیتر از HBV Mix اضافه کنید.**

**در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به HBV Mix اضافه نمایید، مطابق توضیحات قسمت ۱۳ کنترل داخلی را به میکس افزوده و ۱۵ میکرولیتر از مخلوط حاصل را به هر لوله منتقل کنید.**

**در پایان ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده، استاندارد یا آب به هر لوله اضافه کنید.**

درپوش لوله‌ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره‌ها 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.*

## ۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت HBV RQ جهت کار با دستگاه‌های Rotor-Gene و StepOne و MIC طراحی شده است.

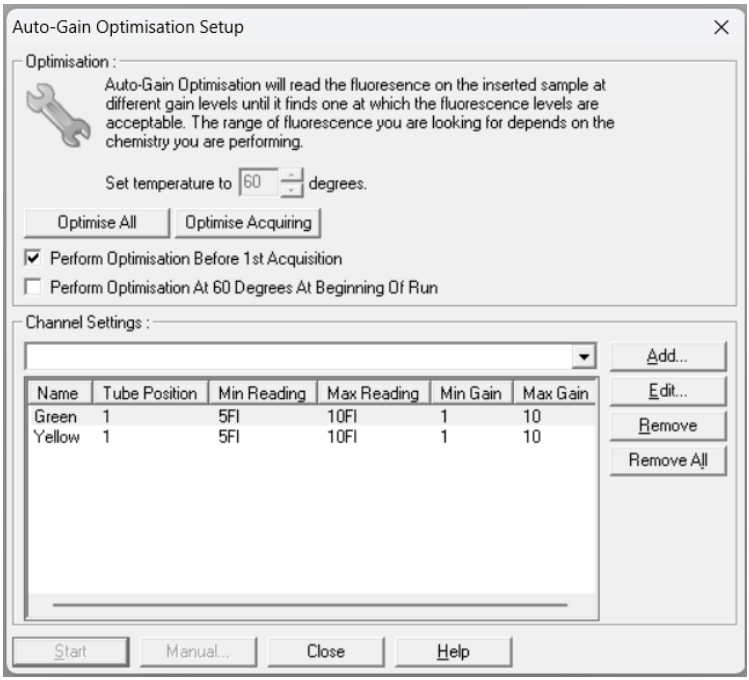
## ۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

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

فایل تمپلیت HBV را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل HBV 0.2 یا HBV 0.1 را با توجه به نوع لوله استفاده شده انتخاب کنید.

نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منوی نرم افزار، گزینه View، سپس Gain Optimisation را انتخاب کنید. در پنجره باز شده در Auto-Gain Optimisation Setup ابتدا گزینه Optimise Acquiring را بزنید. تنظیمات را

دقیقا مطابق تصویر زیر برای هر دو کانال انجام دهید. Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس HBV باشد). گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را فعال کنید و پنجره را ببندید.




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 ذخیره کنید (save) 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 standards را انتخاب کنید. سپس غلظت استانداردها را در ستون سمت راست با عنوان given

concentration وارد کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

## ۱۸. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل را از فلش کارت 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 پنج استاندارد و ده نمونه از پیش تعریف شده اند. استانداردها، کنترل منفی و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می‌توانید تعداد نمونه‌های مورد بررسی را نیز اضافه کنید و نام نمونه‌ها 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.

## ۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها

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

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

اندازه‌گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ‌های FAM و VIC تنظیم شود. HBV Mix موجود در کیت حاوی ROX است. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

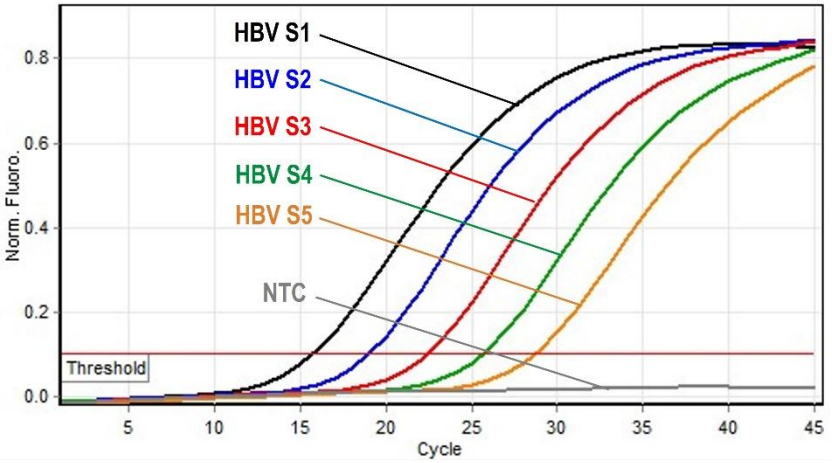
## ۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به طور خلاصه از منوی آنالیز، Quantitation را انتخاب کرده و آنالیز کانال سبز را باز نمایید. آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. موارد بالا را برای کانال زرد نیز تکرار نمایید.

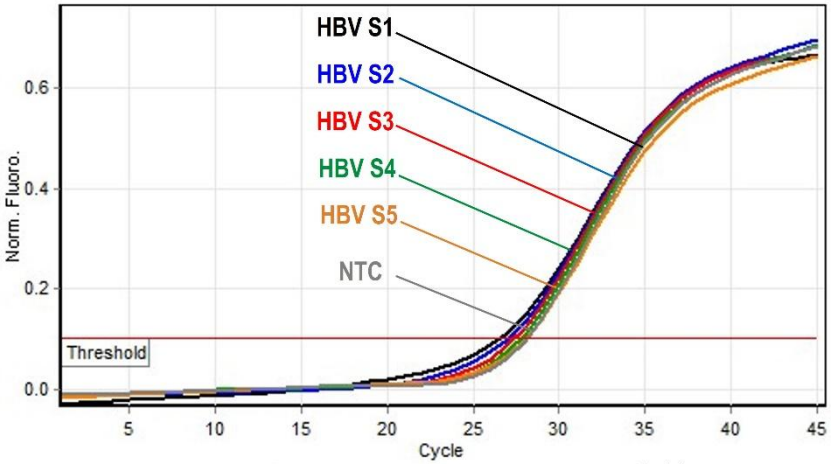
برای مشاهده نمودار مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید.

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

**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 می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و (CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می‌باشد.**




**شکل ۱.** منحنی استانداردهای HBV در کانال سبز دستگاه روتورژن




**شکل ۲.** منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه روتورژن

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال سبز مثبت و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد می‌توان 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 سیگموییید و CT بین ۲۸ تا ۳۴ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال سبز و زرد منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

تفسیر نتایج به صورت خلاصه در جدول صفحه ۱۷ آمده است.

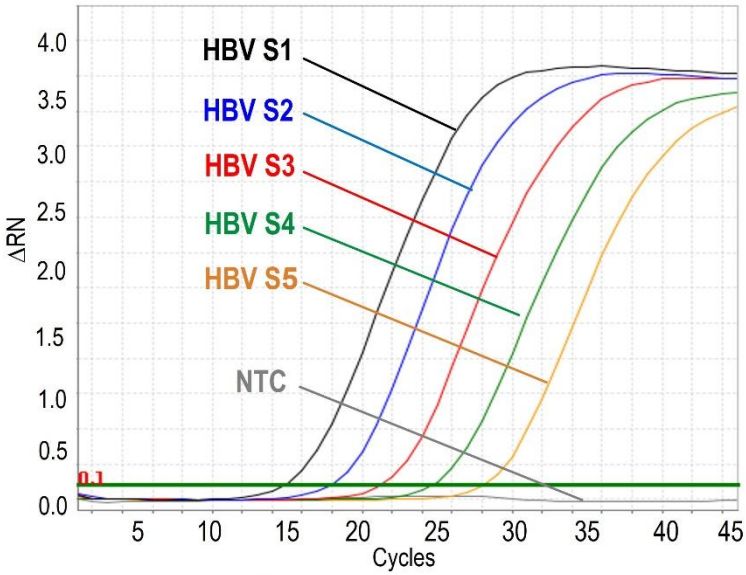
## ۲۱. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای HBV/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید. برای کانال IC/VIC نیز آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید.

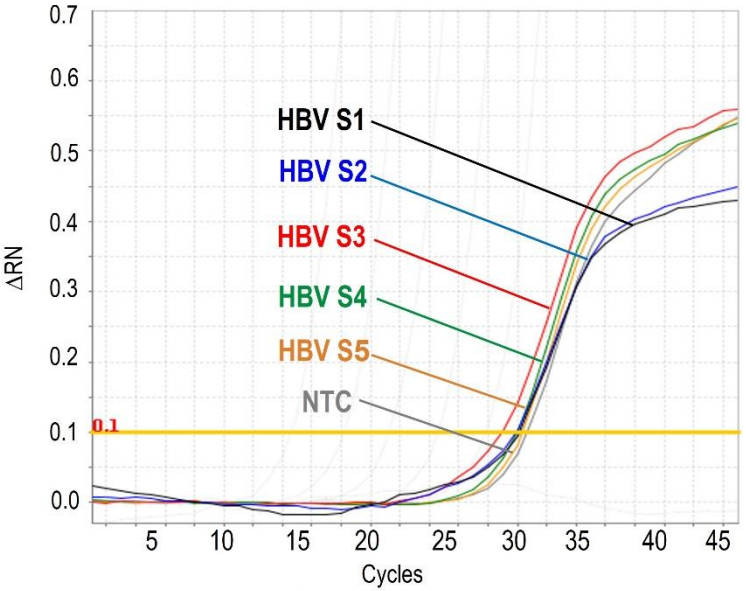
برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.

توجه داشته باشید که افزایش **تابش HBV/FAM** مربوط به **HBV** و افزایش **تابش IC/VIC** حاصل از **کنترل داخلی** می‌باشد.

**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 می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و (CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.**




**شکل ۳.** منحنی استانداردهای HBV در کانال FAM دستگاه استپ وان




**شکل ۴.** منحنی کنترل داخلی در کانال VIC دستگاه استپ وان

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال HBV/FAM مثبت و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال IC/VIC می‌توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیتر محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال HBV/FAM منفی باشد ولی در کانال IC/VIC مثبت و CT بین ۲۸ تا ۳۴ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال HBV/FAM و IC/VIC منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

تفسیر نتایج به صورت خلاصه در جدول زیر آمده است.

| Green | Yellow | Result |
|---|---|---|
| + | +/- | Positive |
| - | + | Negative |
| - | - | Inconclusive |

## ۲۲.محاسبه تیتر ویروس

هرکیت حاوی ۵ استاندارد کمی با غلظت مشخص می‌باشد که با استفاده از آنها منحنی استاندارد رسم شده و میزان ویروس در نمونه بیمار معین می‌شود. تیتر استانداردها با واحد در میکرولیتر (IU/ µl) مشخص شده‌اند. 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 DNA حاصل در ۵۰ میکرولیتر بافر حل شود، نتایج باید در عدد ۲۵۰ ضرب شوند تا به واحد در میلی‌لیتر (IU/ml) تبدیل شوند.

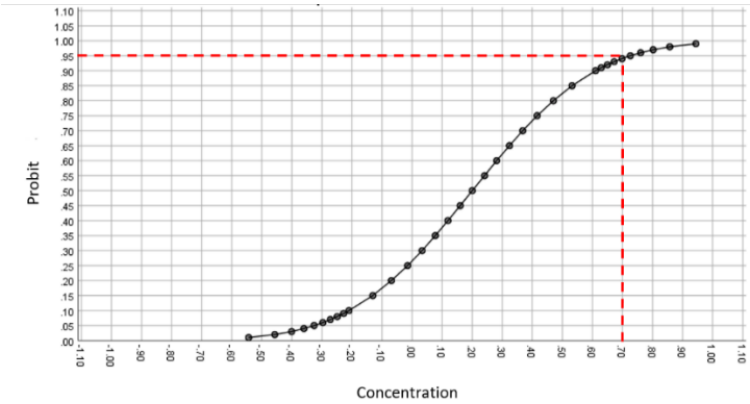
در کیت HBV RQ هر IU معادل ۷ کپی می‌باشد. بنابراین برای تبدیل واحد (IU/ml) به (copy/ml)، نتایج باید در عدد ۷ ضرب شوند.

## ۲۳. محدوده خطی

محدوده خطی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس هپاتیت ب بررسی شده است و شامل بازه ده میلیون واحد در میکرولیتر تا یک واحد در میکرولیتر می‌باشد.

## ۲۴. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس هپاتیت ب بررسی شده و معادل ۰/۱۵ IU/ µl واحد در میکرولیتر می‌باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتر ویروس در نمونه 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.




**تصویر ۵:** بررسی حساسیت کیت به روش Probit analysis

## ۲۵. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیما به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه های عفونی آزمایشگاه را در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت حداقل یک شبانه روز قرار دهید و سپس آنها را به سطل زباله منتقل کنید.

## ۲۶. پشتیبانی فنی

برای پشتیبانی فنی می‌توانید با شماره تلفن یا آدرس ایمیل زیر تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

## ۲۷. اطلاعات تماس

**شرکت نوین ژن پارس ویرا**

آدرس: تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

تلفن تماس:

۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com

وبسایت: www.novingene.ir

## ۲۸. منابع

- Avanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. J Viral Hepat. 2004;11(2):97-107.
- Broquetas T, Carrión JA. Past, present, and future of long-term treatment for hepatitis B virus. World J Gastroenterol 2023; 29(25): 3964-3983.
- Datta S, Chatterjee S, Veer V. Recent advances in molecular diagnostics of hepatitis B virus. World J Gastroenterol. 2014;20(40):14615-14625.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Thomas HC. Viral Hepatitis. Wiley Blackwell; 2014.

## ۲۹. توضیحات برچسب

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| RUO | جهت مصارف پژوهشی | | تولید کننده | | دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید |
| LOT | کدبهر (شماره بچ) | | تعداد <n> آزمون کافی | | تاریخ انقضاء |
| REF | شماره کاتالوگ | SN | شماره سریال | | محدوده دمایی |

***برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.ir مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.***

# HBV RQ Kit Manual

Winter 2025, Version 5.0

For Real-Time PCR Detection and Quantitation of
Hepatitis B Virus DNA
For use with Rotor-Gene or StepOne
For Research Use Only

24 (Cat# HBVRQ24)
48 (Cat# HBVRQ48)
96 (Cat# HBVRQ96)
NG-WI-ASL-01-500

RUO

**NovinGene ParsVira**
No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

# Table of Contents


1. Introduction ..... 3
2. Intended Use ..... 3
3. Background Information ..... 3
4. Test Principle ..... 3
5. Kit Contents ..... 4
6. Packaging models ..... 4
7. Storage and Stability ..... 4
8. Product Use Limitations ..... 4
9. Additionally Required Materials ..... 5
10. General Precautions ..... 5
11. Specimen, Storage and Transport ..... 6
12. Interfering Substances ..... 6
13. Internal Control (IC) ..... 6
14. DNA Isolation ..... 7
15. PCR Protocol ..... 7
16. Devices and software ..... 8
17. Programming Rotor-Gene ..... 8
18. Programming StepOne ..... 9
19. Programming Other Machines ..... 9

20. Data Analysis: Rotor-Gene ..... 10
21. Data Analysis: StepOne ..... 12
22. Quantitation ..... 14
23. Linear Range ..... 15
24. Sensitivity ..... 15
25. Disposal Method ..... 15
26. Technical Support ..... 16
27. Contact Information ..... 16
28. References ..... 16
29. Symbols ..... 17

## 1. Introduction

HBV RQ kit provides a ready-to-use Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) test designed for detecting and quantifying HBV DNA. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit. This Mix also contains a different series of primers and probe for detecting a synthetic DNA sequence. The kit supplies this synthetic DNA sequence as an Internal Control (IC). The IC can be used either during DNA extraction or in the PCR reaction to prevent false negative results due to failure in the above steps.
This kit is intended for Research Use Only!

## 2. Intended Use

HBV RQ kit is intended for detecting and quantifying HBV DNA. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene, StepOne and MIC machines.

## 3. Background Information

Hepatitis B, a viral infection with Hepatitis B virus (HBV) is a major global health issue. About 2 billion people have been infected worldwide of which 250-300 million are chronic carriers. In recent years, accessing the level of circulating virus in blood has been regarded as the most reliable tool for disease monitoring and patient management including clinical staging and pretreatment evaluation, monitoring and evaluation of antiviral therapy success and detection of emerging new resistant viruses.

## 4. Test Principle

The pathogen is detected using PCR, where primers specific to the target genome amplify its unique sequence. Real-Time PCR facilitates the detection of the amplified product through

fluorescent-labeled probes. Therefore, monitoring fluorescence provides a means for detecting the target without requiring post-amplification analysis. This greatly reduces the possibility of PCR product contamination.

## 5. Kit Contents

The kit contains a manual, a flash card and the following reagents:

| Label | Content | Quantity |
|---|---|---|
| HBV Mix | PCR mix* | 360 µl |
| HBV S1 | Standard 1: 100,000 IU/µl | 150 µl |
| HBV S2 | Standard 2: 10,000 IU/ µl | 150 µl |
| HBV S3 | Standard 3: 1,000 IU/ µl | 150 µl |
| HBV S4 | Standard 4: 100 IU/ µl | 150 µl |
| HBV S5 | Standard 5: 10 IU/ µl | 150 µl |
| Internal Ctrl | Internal Control* | 250 µl |
| Water | PCR Grade Water | 200 µl |

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

## 6. Packaging models

The kit is available in 24, 48, and 96 reactions of 25 microliters.

## 7. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiration date mentioned. Avoid repeated freeze-thaw more than three times to prevent reduced sensitivity.

## 8. Product Use Limitations

- This kit is intended to be used only by specially instructed and trained personnel.

- The User manual should be strictly followed, and any modification will invalidate the results.
- The kit and its contents should not be used past the expiration date on the package.
- The kit and its contents should not be used if there is any sign of pink or red color on the Warm Mark label.
- This kit is for Research use only and is not validated for IVD (in vitro diagnostics) applicatoins.

## 9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and the accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold Block

## 10. General Precautions

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 PCR mix is aliquoted into tubes, and c) Reaction preparation area for addition of extracted DNA to the tubes.

- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components on crushed ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice while working.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cooling blocks instead.

## 11. Specimen, Storage and Transport

Proper samples to test for HBV are whole blood and peripheral blood, which should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend EDTA or citrate plasma for HBV detection. 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 a few days or aliquoted and stored at -20°C for up to a few weeks.

## 12. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes and samples of heparinized patients must not be used.
Elevated levels of bilirubin (≤4.5 mg/dl) and lipids (≤1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

## 13. Internal Control (IC)

To assess the possibility of DNA extraction failure and PCR inhibition, and to prevent false negative results, the HBV RQ kit contains an internal control (IC). This IC can be used during the extraction process or added directly to the HBV Mix. To monitor both DNA extraction and PCR reaction, the IC should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample during extraction. The required volume of IC is 10% of the elution buffer. For instance, if

the extracted DNA is eluted with 100ul, then 10ul of IC should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample.
Please note that the IC should not be added directly to the patient sample (i.e, before the addition of lysis buffer) as it loses its efficiency.
If the IC is added to HBV Mix, only PCR inhibition can be monitored. For this purpose, 1ul of the IC should be added to each reaction. For example, for 10 PCR reactions, 10ul of the IC should be added to 150ul of the HBV Mix before it is added to the tubes. In a successful DNA extraction and PCR test, the IC should generate a CT of 28-34 in the Yellow/VIC Channel.

## 14. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend using either of:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat. no. 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, 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).

## 15. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely, followed by a brief mixing and a quick spin. Place the required number of tubes on a cold block. Consider one tube for each sample, five for standards and one for the negative control.
**If the IC is introduced during the extraction process, pipette 15µl of HBV Mix to each PCR tube.**

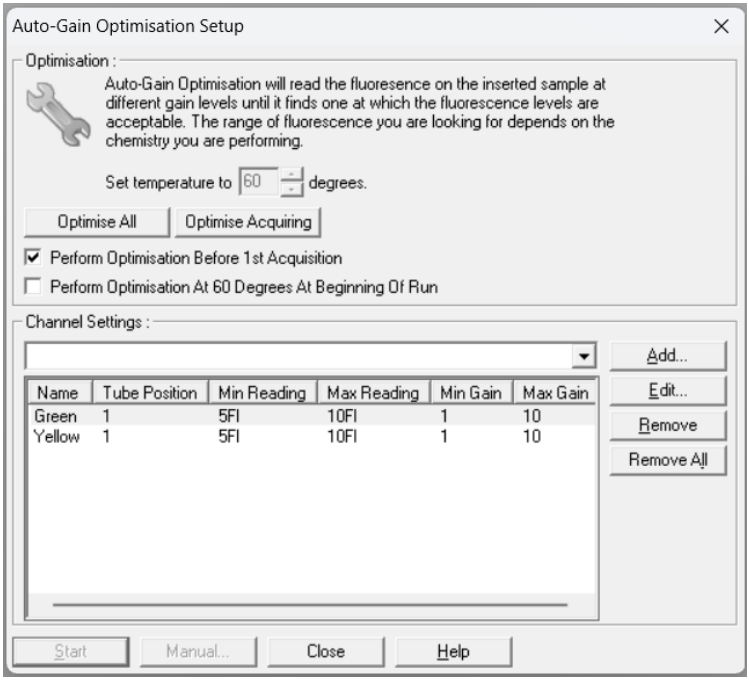
**If the IC is added to the HBV Mix, add 15µl of the prepared mix (as described in section 13) to each PCR tube.**
**Then add 10µl of extracted DNA, standard, or water to each tube.**
Cap the tubes and visually inspect to ensure all are capped securely. Place the tubes in the machine.
*Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.*
*Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring*.

## 16. Devices and software

HBV RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, StepOne and MIC.

## 17. Programming Rotor-Gene

*Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!*
Open the flash card provided in the kit and double-click on HBV 0.1 or HBV 0.2 template depending on used tubes. Program starts.
Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation.
Adjust the setting according to the next page image.
Make sure to set the Tube Position to number 1 for all channels (note that Tube number 1 should contain HBV Mix).
Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the program on the desired location.




## 18. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu, click Template (provided in the flash card, or accessible by kit QR code). Click on Plate Setup. One negative control, five standards, and a few samples are defined. You may change plate setup using right-click options (copy, paste, clear). You may also add /remove samples or change the sample name on the “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment to the desired location. The instrument will start shortly.

## 19. 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 | **95°C x 3 min** | 1 |
| 2 | **95°C x 15 sec** | 45 |
| | **60°C x 60 sec** | |

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC dyes. HBV Mix contains ROX with the final concentration of 300nM in the reaction.

## 20. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure that 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" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively.
Analyze the data according to the Rotor-Gene manual. A signal in the **Green channel** indicate HBV and a signal in the **Yellow channel** indicate IC. Briefly, click on the Analysis menu and then under the 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 or simply set the threshold on 0.1 for Green and Yellow channels. Figures 1 and 2 represent typical graphs for the Rotor-Gene machine.

**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 a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.**

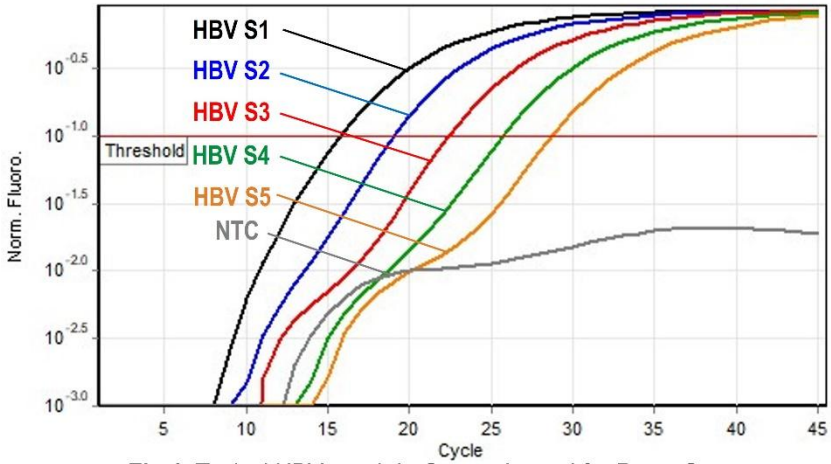



**Fig 1.** Typical HBV graph in Green channel for Rotor-Gene

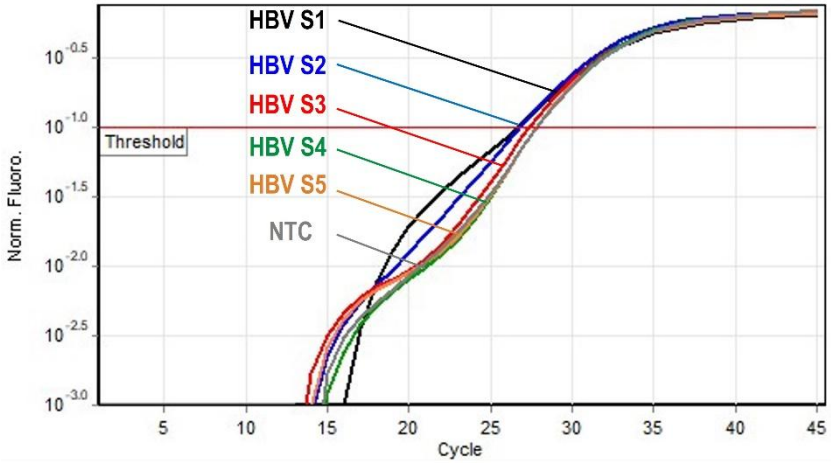



**Fig 2.** Typical IC graph in Yellow channel for Rotor-Gene

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in the Green channel with 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 the Green channel while it is positive in Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 28-34.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both the Green and Yellow channels.

The interpretation of results is summarized in the table on page 14.

## 21. Data Analysis: StepOne

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

**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 a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.**

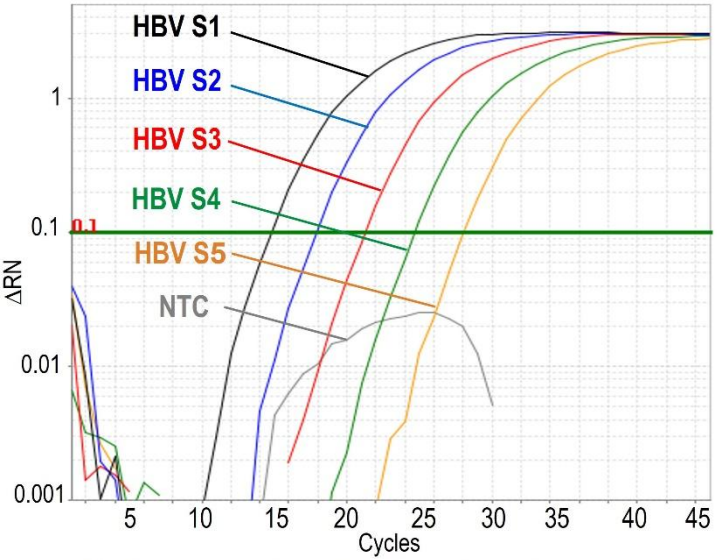



**Fig 3.** Typical HBV graph in FAM channel for StepOne

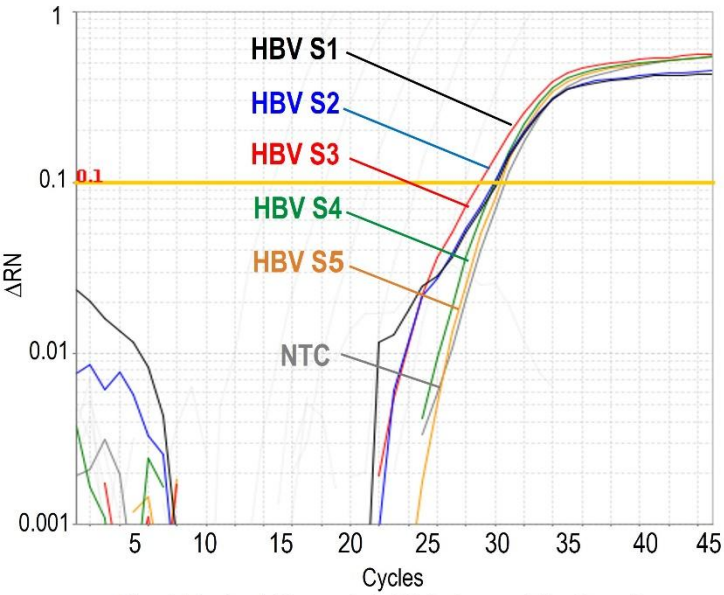



**Fig 4.** Typical IC graph in VIC channel for StepOne

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in the FAM/HBV channel with a CT of less than 40. The viral load or quantitation results are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in the FAM/HBV channel while it is positive in the VIC/IC channel with a CT of 28-34.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both the FAM/HBV and the VIC/IC channels.

The interpretation of results is summarized in the following table.

| Green | Yellow | Result |
|---|---|---|
| + | +/- | Positive |
| - | + | Negative |
| - | - | Inconclusive |

## 22. Quantitation

The kit provides five quantitation standards with defined titers to generate a standard curve for the quantification of samples, viral load. Working with Rotor-Gene machine, the standard curve from a previous run can also be imported for quantification of samples to the recent run. To do so, at least one standard must be used in the current run. Apparently, using all five standards in each run will lead to more accurate results.

Quantitation standards are defined as IU/ul. To convert the result to IU/ml the 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 patient sample volume used for DNA isolation and "Elution volume" is the volume of buffer or water used to elute or dissolve isolated DNA.
In the HBV RQ Kit, each IU equals 7 copy numbers. Thus, to report the results in copy/ml just, multiply the results of IU/ml by 7 to reach the results in copy/ml.

## 23. Linear Range

The linear range of the kit was assessed with dilution series of the cloned, target and the assay showed to be linear in the range of 10,000,000 IU/µl to 1 IU/µl.

## 24. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of a cloned target, and the detection limit was determined as 0.15 IU/µl.

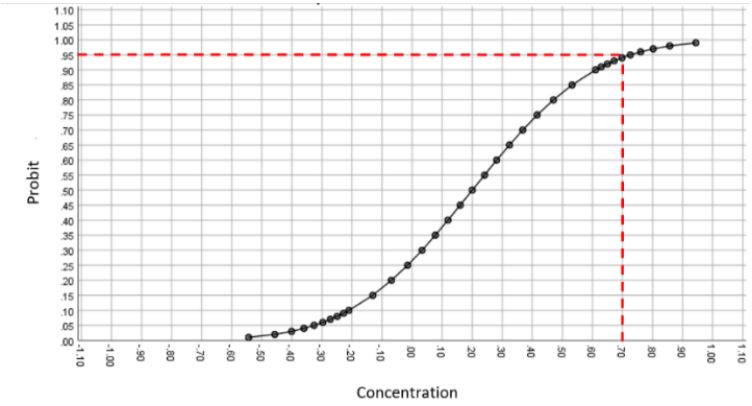



**Fig 5:** Evaluation of Kit Sensitivity Using Probit Analysis

## 25. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special treatment before disposal and can be directly discarded. Infectious specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

## 26. Technical Support

For technical support, contact us via
Phone: +98-9936223241
Email: info@novingene.com

## 27. Contact Information

**NovinGene ParsVira**
Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.
Tel: +98 21-88837393
+98 990-1813124
Email: info@novingene.com
Website: www.novingene.com

## 28. References

- Avanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. J Viral Hepat. 2004;11(2):97-107.
- Broquetas T, Carrión JA. Past, present, and future of long-term treatment for hepatitis B virus. World J Gastroenterol 2023; 29(25): 3964-3983.
- Datta S, Chatterjee S, Veer V. Recent advances in molecular diagnostics of hepatitis B virus. World J Gastroenterol. 2014;20(40):14615-14625.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.

- Thomas HC. Viral Hepatitis. Wiley Blackwell; 2014.


## 29. Symbols

| | | |
|---|---|---|
| RUO Research use only | Manufacturer | Consult instructions for use |
| LOT Lot number | Content sufficient for <n> tests | Use-by date |
| REF Catalogue number | SN Serial number | -10°C / -30°C Temperature limit |

**For more information and resources please visit our website; www.novingene.com**