راهنمای کیت HCV RQ

زمستان ۱۴۰۳، ویرایش ۶/۰

جهت تشخیص و کمیت سنجی RNA ویروس هپاتیت ث به روش
Real-Time RT-PCR
مخصوص تحقیقات

24 (Cat# HCVRQ24)
48 (Cat# HCVRQ48)
96 (Cat# HCVRQ96)
NG-WI-ASL-02-600

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 RNA ۹

۱۵. دستورکار RT- 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 دستگاه ها 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 ۱۸
۲۶. پشتیبانی فنی ۱۹
۲۷. اطلاعات تماس ۱۹
۲۸. منابع ۱۹
۲۹. برچسب توضیحات ۲۰

۱. مقدمه

کیت HCV RQ جهت تشخیص و کمیت سنجی RNA ویروس هپاتیت ث به روش Real-time RT-PCR طراحی شده است. در این روش، RNA ویروس به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین میکس این کیت حاوی سری ثانویه‌ای 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 HCV RQ امکان تشخیص و کمیت سنجی RNA ویروس هپاتیت ث را در نمونه بیمار به روش One-Step Real-Time RT-PCR فراهم می‌نماید این کیت برای استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene و StepOne و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

هپاتیت ث (Hepatitis C) یک بیماری عفونی ناشی از ویروسی با همین نام است (Hepatitis C Virus/HCV). ژنوم این ویروس متشکل از RNA و به طول تقریبی ۹۵۰۰ نوکلئوتید می‌باشد. شیوع جهانی این ویروس بالا بوده و نزدیک به ۱۸۰ میلیون نفر در دنیا به آن مبتلا می‌باشند.

تحقیقات نشان می‌دهند که مطمئن ترین روش برای تشخیص این بیماری یافتن RNA ویروس به روش RT-PCR در نمونه می‌باشد. با این روش تشخیص بیماری حدود چند هفته تا چند ماه زودتر از روش های مبتنی بر جستجوی 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 و یا

بررسی میزان پیشرفت بیماری و تفکیک انواع حاد، فعال و مزمن از یکدیگر شناخته می‌شود.

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی عامل عفونی با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای 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 برطرف می‌شود.

۵. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
HCV Mix	میکس RT-PCR *	۳۶۰ میکرولیتر
HCV S1	استاندارد۱: پنجاه هزار واحد در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HCV S2	استاندارد۲: پنج هزار واحد در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HCV S3	استاندارد۳: پانصد واحد در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HCV S4	استاندارد۴: پنجاه 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 کیت‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست وچهار، چهل و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می باشد.

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 می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

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

۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه‌ای و آموزش دیده 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 نمود.
- در صورت تغییر رنگ لیبل حرارتی (به صورتی یا قرمز) حتی به صورت جزئی کیت نباید مورد استفاده قرار گیرد.
- 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 RNA
- تیوب ۱/۵ 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!

۱۰. احتیاط و نکات 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 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 سانتریفوژ 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.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش هپاتیت ث با این کیت، خون کامل (whole blood) و پلاسمای خون محیطی (peripheral blood) می باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می‌تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می‌توان تا ۴۸ 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.

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 نمی باشد.
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 HCV 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 RNA 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 HCV 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 HCV 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 واکنش، کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۷ تا ۳۴ می‌شود.

۱۴. استخراج RNA

برای استخراج RNA از نمونه پلاسما از روش ها و کیت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت‌های 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)

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

۱۵. دستورکار RT- PCR و مراحل آزمایش

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

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

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به HCV 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 RNA استخراج شده، استاندارد یا آب به هر لوله اضافه کنید.

درپوش لوله‌ها را ببندید. سپس آنها 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 HCV RQ جهت کار با دستگاه‌های Rotor-Gene و StepOne و MIC طراحی شده است.

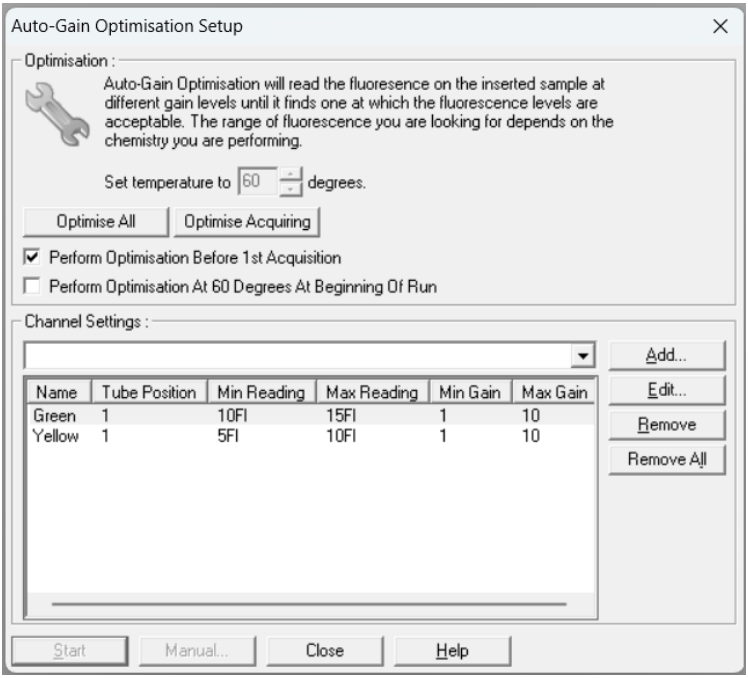
۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

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

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

فایل تمپلیت HCV را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل HCV 0.2 یا HCV 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 HCV 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

standard 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 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) می‌توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می‌توانید 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.

۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها

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

Step	Temperature and time	Cycles
1	**50°C x 10 min**	1
2	**95°C x 3 min**	1
3	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

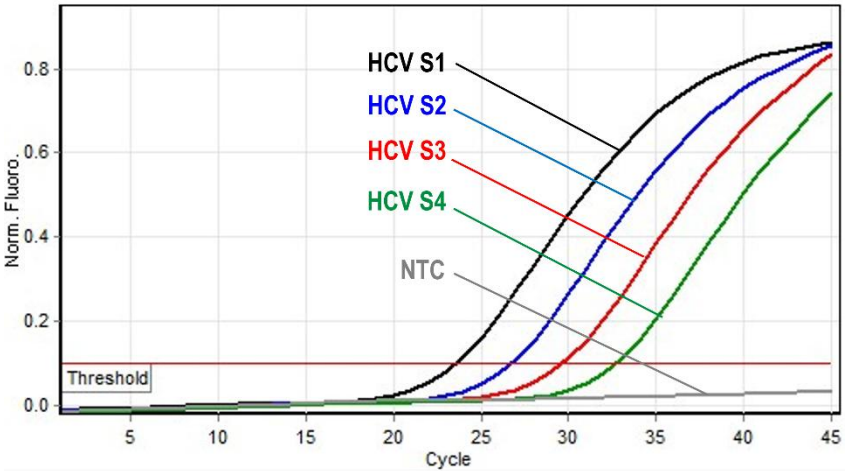
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ‌های FAM و VIC تنظیم شود. HCV Mix موجود در کیت حاوی ROX می‌باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene

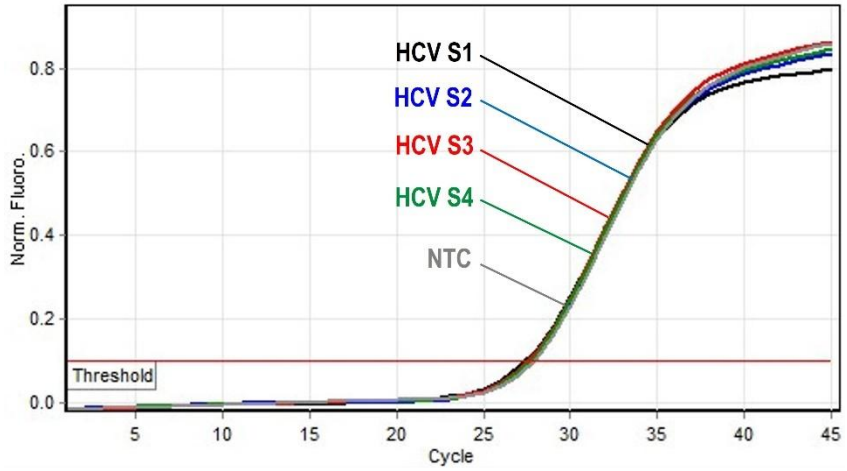
برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold حداقل را روی ۰/۰۲ یا بالاتر از فلورسانس زمینه قرار داده و دکمه OK را بزنید تا پس از رسم منحنی استاندارد نتایج در جدول پایین صفحه نشان داده شوند. همچنین می‌توانید به طور ساده آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. سپس مراحل فوق را برای کانال Yellow نیز تکرار کرده و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده گراف 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 HCV** و افزایش **تابش زرد (Yellow) حاصل از کنترل داخلی** می‌باشد.

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.



شکل ۱. منحنی استانداردهای HCV در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. منحنی استانداردهای HCV در کانال زرد دستگاه روتورژن

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال سبز مثبت و دارای نمودار سیگموییید 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 ۲۷ تا ۳۴ 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.

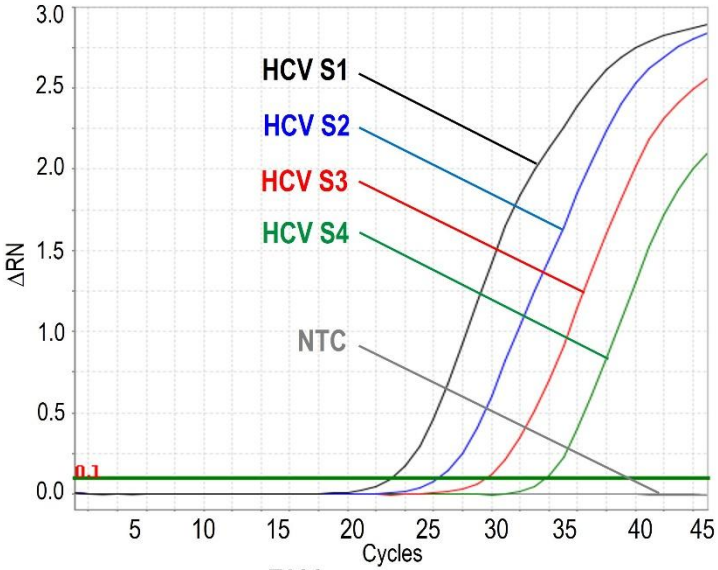
۲۱. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای HCV/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ و برای IC/VIC آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید.

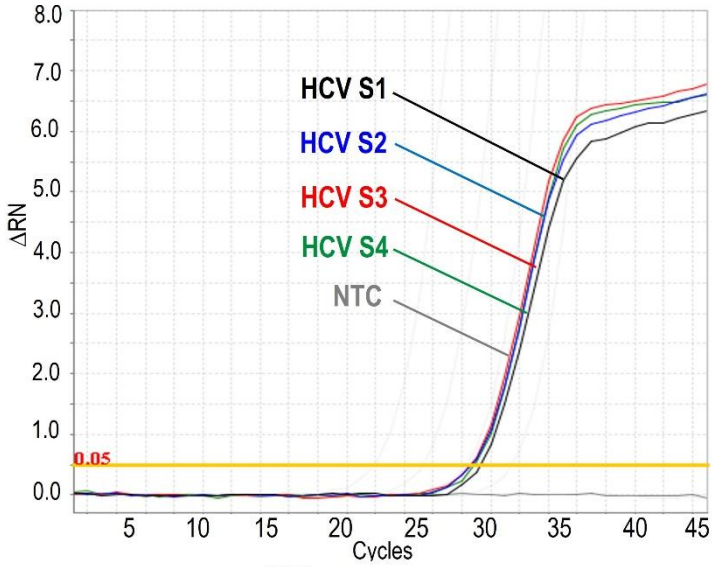
برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.

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

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



شکل ۳. منحنی استانداردها در کانال FAM دستگاه استپ وان



شکل ۴. منحنی استانداردها در کانال VIC دستگاه استپ وان

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال HCV/FAM مثبت و دارای منحنی سیگموییدو 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 HCV/FAM منفی باشد ولی در کانال IC/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدو CT بین ۲۷ تا ۳۴ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال HCV/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

هر کیت حاوی ۴ استاندارد کمی با غلظت مشخص می‌باشد که با استفاده از آنها منحنی استاندارد رسم شده و میزان ویروس در نمونه بیمار معین می‌شود.
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 میلی‌لیتر (IU/ml) تبدیل شوند.

در کیت HCV RQ هر IU معادل ۴ کپی می‌باشد. بنابراین برای تبدیل واحد (IU/ml) به (copy/ml)، نتایج باید در عدد ۴ ضرب شوند.

۲۳. محدوده خطّی

محدوده خطّی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس هپاتیت ث بررسی شده است و شامل بازه دو میلیون و پانصد هزار واحد در میکرولیتر تا پنج واحد در میکرولیتر می‌باشد.

۲۴. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس هپاتیت ث بررسی شده است و معادل یک و نیم واحد در میکرولیتر می‌باشد. 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.

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 ارتباط با بخش 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.com

۲۸. منابع

- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212.
- Martinez, M.A. and Franco, S., 2020. Therapy implications of hepatitis C virus genetic diversity. Viruses, 13(1), p.41.
- Pham, T.N., MacParland, S.A., Mulrooney, P.M., Cooksley, H., Naoumov, N.V. and Michalak, T.I., 2004. Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. Journal of virology, 78(11), pp.5867-5874.
- Tan, S.L., 2006. Hepatitis C viruses: genomes and molecular biology.

- Watzinger, F., Ebner, K. and Lion, T., 2006. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. Molecular aspects of medicine, 27(2-3), pp.254-298.

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 10°C -30°C

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

HCV RQ Kit Manual

Winter 2025, Version 6.0

For Real-Time RT-PCR Detection and Quantitation of
Hepatitis C virus (HCV) RNA
For Research Use Only

Σ 24 (Cat# HCVRQ24)
Σ 48 (Cat# HCVRQ48)
Σ 96 (Cat# HCVRQ96)
NG-WI-ASL-02-600

RUO

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

Novin Gene

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. RNA Isolation 7
15. RT-PCR Protocol 7
16. Devices and software 8
17. Programming of the Rotor-Gene 8
18. Programming of StepOne 9
19. Programming Other Machines 10

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 15
27. Contact Information 16
28. References 16
29. Symbols 16

1. Introduction

HCV RQ kit provides a ready-to-use Real-Time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) test designed for detecting and quantifying HCV RNA. 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

HCV RQ kit is intended for detecting and quantifying HCV RNA. Detection is achieved using One-Step Real-Time RT-PCR and is compatible with Rotor-Gene, MIC or StepOne machines.

3. Background Information

Hepatitis C virus (HCV) is an RNA virus and an important human pathogen. It is estimated that about 180 million individuals are infected worldwide. It can cause acute and chronic hepatitis followed by liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma.
Currently infection can be diagnosed by detection of HCV RNA through RT-PCR in patient sample, weeks to months before antibody response. In addition, monitoring viral load by the same method has become a clinical gold standard for evaluation of therapy success as well as disease progress.

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 eliminates the possibility of PCR product contamination.

5. Kit Contents

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

Label	Content	Quantity
HCV Mix	RT-PCR mix*	360 µl
HCV S1	Standard 1: 50,000 IU/ul	150 µl
HCV S2	Standard 2: 5,000 IU/ul	150 µl
HCV S3	Standard 3: 500 IU/ul	150 µl
HCV S4	Standard 4: 50 IU/ul	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 respectively.

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) applications.

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
- RNA extraction kit
- Nuclease-free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

This kit does not require cDNA synthesis reagents!

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 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 PCR tubes on crushed ice. Use cold block instead.

11. Specimen, Storage and Transport

We recommend EDTA or citrate plasma for HCV 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 48 hours 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 RNA extraction failure and PCR inhibition and prevent false negative results, the HCV RQ kit contains an internal control (IC). This IC can be used during the extraction process or added directly to the HCV Mix. To monitor both RNA extraction and PCR reaction, the IC should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample. The required volume

of IC is 10% of the elution buffer. For instance, if the extracted RNA 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 HCV 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 HCV Mix before it is added to the tubes.
In a successful RNA extraction and PCR test, the IC should generate a CT of 27-34 in the Yellow/VIC Channel.

14. 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 13 of this handbook.

15. RT-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, plus one for each standard and one for the negative control.

If the IC is introduced during the extraction process, pipette 15µl of HCV Mix directly to each PCR tube.

If the IC is added to the HCV Mix, add 15ul of the prepared mix (as described in section 13) to each PCR tube.

Then add 10ul of extracted RNA, 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 too.

16. Devices and software

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

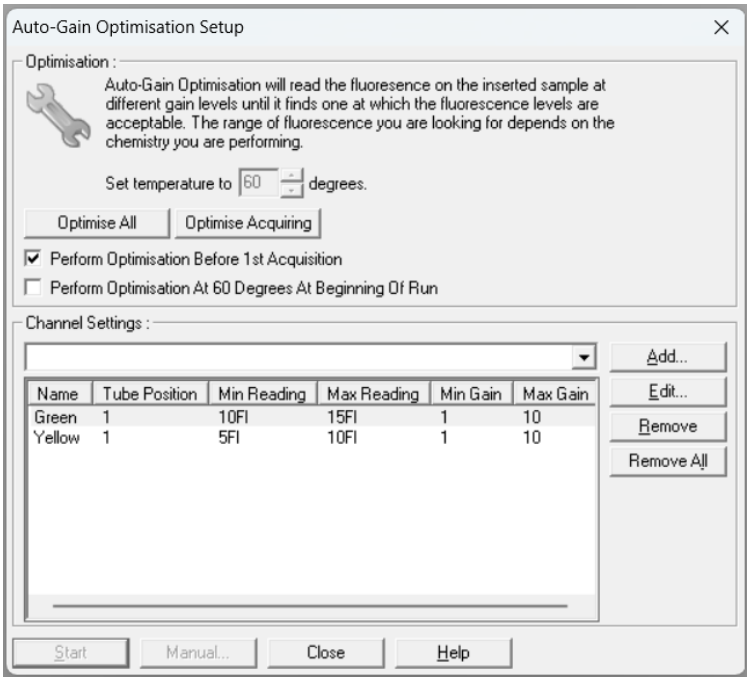
17. Programming of the Rotor-Gene

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

Open the HCV template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); HCV 0.1 is for strip tubes and HCV 0.2 is for 0.2ml tubes. Program starts.

Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation. Adjust the setting according to the below image. Make sure to set the Tube Position to number 1 for all channels (note that Tube number 1 should contain HCV Mix).

Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the file to start the machine.



18. Programming of StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu, click HCV template file (provided in the flash card, or accessible by kit QR code). Click on Plate Setup. One negative control, four 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	**50°C x 10 min**	1
2	**95°C x 3 min**	1
3	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

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

20. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure that in the sample menu, patient samples are 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 indicates **HCV** and a signal in the **Yellow channel** indicates **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 the Green and Yellow channels. Figures 1 and 2 represent typical graphs for the Rotor-Gene machine.

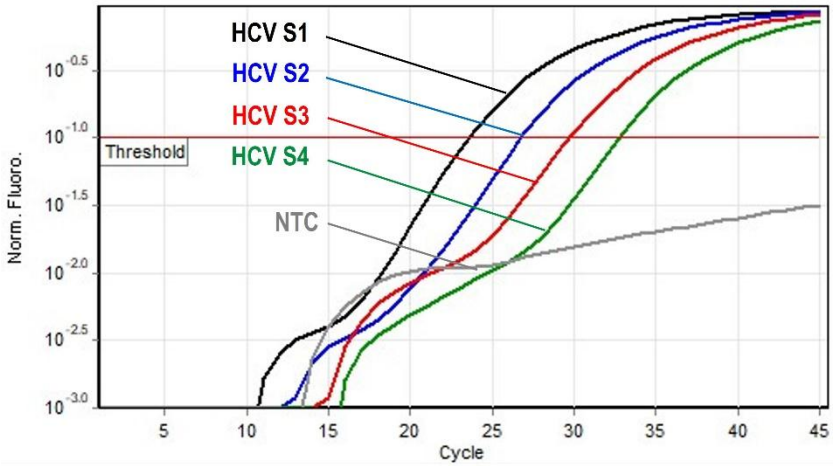


Fig 1. Typical HCV graph in Green channel for Rotor-Gene

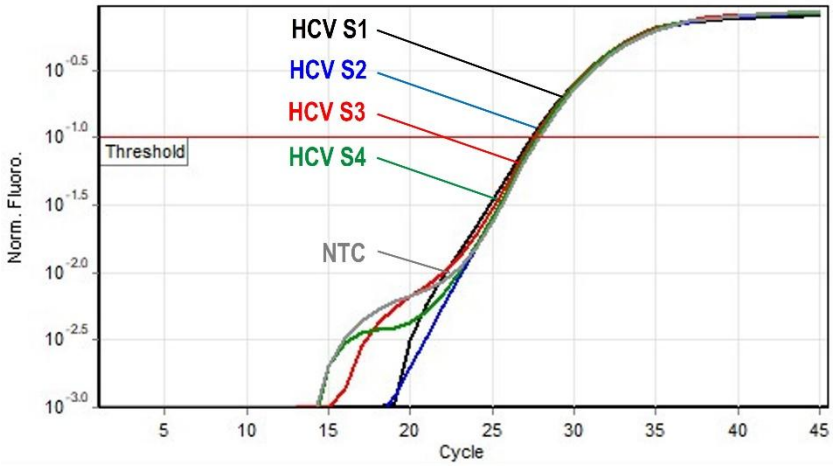


Fig 2. Typical HCV graph in Yellow channel for Rotor-Gene

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.

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in the 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 the Green channel while it is positive in the Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 27-34.
- 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 following table.

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

21. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to the StepOne Manual. Briefly, click on Analyze and set the threshold for the **HCV/FAM** at 0.1 and at 0.05 for the **IC/VIC**.

Figures 3 and 4 represent typical graphs for the StepOne machine.

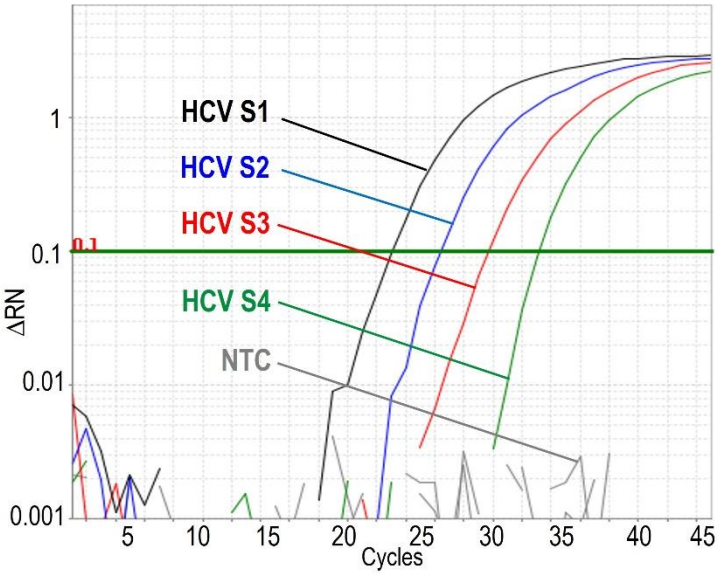


Fig 3. Typical HCV graph in FAM channel for StepOne

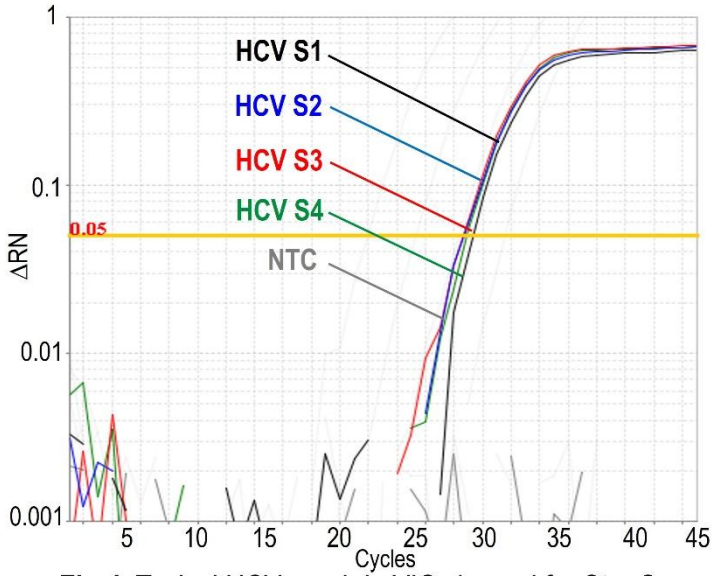


Fig 4. Typical HCV graph in VIC channel for StepOne

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.

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in the FAM/HCV 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 the FAM/HCV channel while it is positive in the VIC/IC channel with a sigmoid graph and CT of 27-34.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both the FAM/HCV and VIC/IC channels.

The interpretation of results is summarized in the table on page 12.

22. Quantitation

The kit provides four 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 four standards in each run will lead to more accurate results.

Quantitation standards are defined as copy/ul. To convert the result to copy/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 plasma volume used for RNA isolation and "Elution volume" is the volume of buffer or water used to elute or dissolve isolated RNA.
In the HCV RQ Kit, each IU equals 4 copy numbers. Thus, to report the results in copy/ml just, multiply the results of IU/ml by 4 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 showed to be linear in the range of 2,500,000 IU/µl to 5 IU/µl.

24. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with a cloned target and showed a limit of detection equal to 1.5 IU/µl.

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: +98 993-6223241
email: info@novingene.com

27. Contact Information

NovinGene ParsVira
Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

Tel: +98 21-88837393
+98 990-1813124
Website: www.novingene.com

28. References

- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212.
- Martinez, M.A. and Franco, S., 2020. Therapy implications of hepatitis C virus genetic diversity. Viruses, 13(1), p.41.
- Pham, T.N., MacParland, S.A., Mulrooney, P.M., Cooksley, H., Naoumov, N.V. and Michalak, T.I., 2004. Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. Journal of virology, 78(11), pp.5867-5874.
- Tan, S.L., 2006. Hepatitis C viruses: genomes and molecular biology.
- Watzinger, F., Ebner, K. and Lion, T., 2006. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. Molecular aspects of medicine, 27(2-3), pp.254-298.

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	-30°C -10°C Temperature limit

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