راهنمای کیت Herpes RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۲/۰

جهت تشخیص ویروس های CMV, HSV-1, HSV-2, EBV, VZV

به روش Multiplex Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene

مخصوص تحقیقات

Σ 24 (Cat# HerpesRQ24)

Σ 48 (Cat# HerpesRQ48)

Σ 96 (Cat# HerpesRQ96)

NG-WI-ASL-34-200

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 ۷
۱۳. کنترل داخلی ۸
۱۴. استخراج DNA ۸
۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش ۹
۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها ۹
۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene ۱۰
۱۸. تنظیم سایر دستگاه ها ۱۱
۱۹. تحلیل نتایج Rotor-Gene ۱۲
۲۰. میزان حساسیت ۱۶

۲۱. روش امحاء..... ۱۷
۲۲. پشتیبانی فنی..... ۱۷
۲۳. اطلاعات تماس..... ۱۷
۲۴. منابع..... ۱۸
۲۵. توضیحات برچسب..... ۱۸

۱. مقدمه

کیت Herpes RQ جهت تشخیص ویروس سیتومگالوویروس (Cytomegalovirus, CMV)، همچنین ویروس هرپس سیمپلکس تایپ ۱ و ۲ (Herpes Simplex Virus, HSV)، ویروس اپشتین بار (Epstein-Barr virus, EBV) و ویروس واریسلا زوستر (Varicella Zoster Virus, VZV) به روش Multiplex Real-Time PCR طراحی شده است. در این روش، DNA ویروس ها به کمک پرایمرها و پروب های اختصاصی شناسایی می‌شوند. همچنین میکس این کیت حاوی سری دیگری 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 Herpes RQ امکان بررسی نمونه بیمار را جهت تشخیص DNA ویروس‌های CMV، HSV-1، HSV-2، EBV و VZV فراهم می‌کند. این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

CMV، HSV-1، HSV-2، EBV و VZV همگی از ویروس های خانواده هرپس ویریده (Herpesviridae) بوده و ژنوم آن ها از DNA دو رشته ای تشکیل شده است. این ویروس ها بسیار شایع می‌باشند و در گستره ای از بیماری ها نقش دارند. از جمله مهمترین آنها می‌توان به آنسفالیت و مننژیت اشاره نمود. کیت حاضر

امکان تشخیص و تفکیک همزمان این پنج ویروس را به روش multiplex Real-Time PCR با هدف کاهش هزینه و افزایش سرعت فراهم می‌کند.

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
CMV-EBV Mix	میکس PCR برای تشخیص CMV و EBV	۳۶۰ میکرولیتر
HSV-VZV Mix	میکس PCR برای تشخیص HSV-1 و HSV-2 و VZV	۳۶۰ میکرولیتر
HH Pos Ctrl	شاهد مثبت	۱۰۰ 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

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 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 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 حرفه ای 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 DNA به همراه تجهیزات و مواد مورد نیاز آن
- تیوب ۱/۵ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

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 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 نگهداری 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 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 با این کیت، می‌تواند پلاسمای خون محیطی (peripheral blood)، مایع مغزی نخاعی یا بافت باشد. نمونه خون محیطی را میتوان تا ۴۸ ساعت در ۴ درجه نگهداری نمود. همچنین برای زمان طولانی تر از دو روز، می‌توان نمونه را در دمای ۲۰ درجه زیر صفر تا چندین هفته نگهداری نمود.

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 بایستی در مرحله استخراج استفاده نموده. به این منظور، هنگام استخراج DNA، 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 صورت موفق بودن PCR کنترل داخلی با میکس CMV-EBV منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد و CT بین ۲۸ تا ۳۲ می شود.

۱۴. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه از روش‌ها و کیت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های 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)
- QIAamp UltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

- QIAamp MiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی تیوب 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 آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

هر نمونه از نظر وجود DNA ویروس‌های CMV, HSV-1, HSV-2, EBV, VZV باید بررسی شود. به این منظور دو آزمایش PCR در دو سری میکروتیوب های جداگانه انجام می‌شود. در سری اول برای بررسی CMV و EBV علاوه بر یک میکروتیوب برای هر نمونه بیمار، دو میکروتیوب نیز برای شاهدهای مثبت و منفی (آب) در نظر بگیرید. در سری دوم نیز برای بررسی HSV-1، HSV-2 و VZV علاوه بر یک میکروتیوب برای هر نمونه بیمار، دو میکروتیوب نیز برای شاهدهای مثبت و منفی (آب) در نظر بگیرید. بر این مبنا به تعداد مورد نیاز، میکروتیوب در دو سری جداگانه روی بلوک سرد بگذارید.

به هر میکروتیوب سری اول، ۱۵ میکرولیتر از CMV-EBV Mix اضافه کنید.

به هر میکروتیوب سری دوم، ۱۵ میکرولیتر از HSV-VZV Mix اضافه کنید.

سپس ۱۰ میکرولیتر از DNA نمونه و یا شاهدهای مثبت و منفی (آب) به هر میکروتیوب اضافه کنید و درپوش میکروتیوب ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها 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 Herpes RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene طراحی شده است.

۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

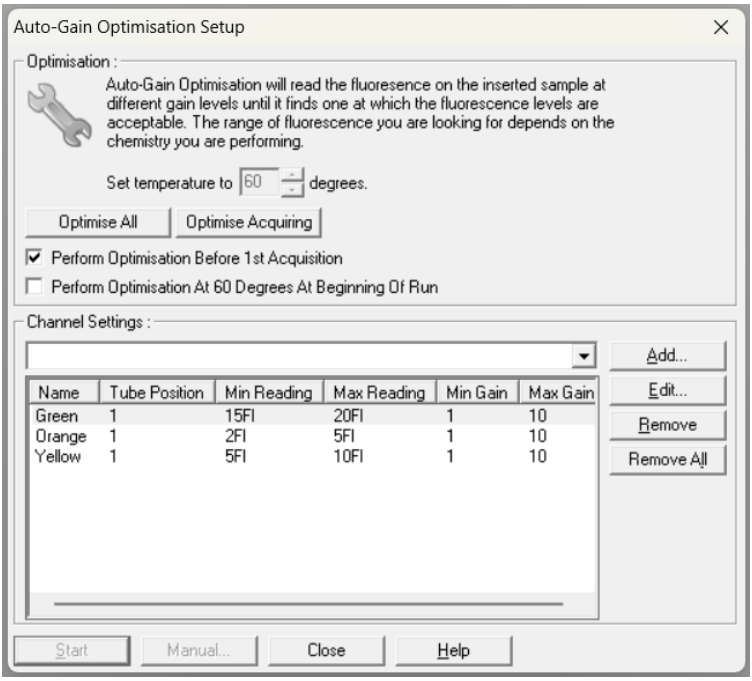
ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

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 Herpes را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل Herpes 0.1 یا Herpes 0.2 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 صفحه بعد برای هر سه کانال انجام دهید. Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس CMV-EBV 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 سپس فایل آزمایش را در پوشه مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند. در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای کنترل مثبت Positive Control را انتخاب کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یاNegative Control را انتخاب کنید.



۱۸. تنظیم سایر دستگاه ها

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

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 20 sec**	45
	60°C x 60 sec	

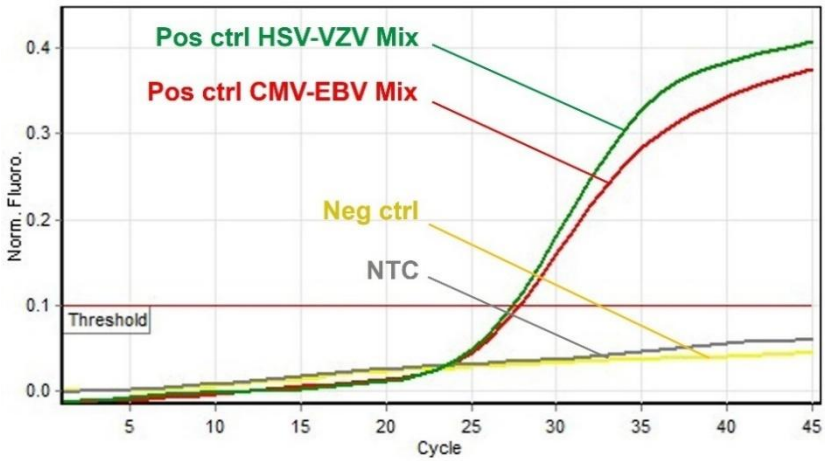
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM، VIC و ROX تنظیم شود. توجه داشته باشید که *Herpes Mix* فاقد *ROX* به

عنوان نرمال کننده است.
لذا گزینه استفاده از این رنگ به عنوان نرمال کننده normalizer) (باید غیرفعال باشد.

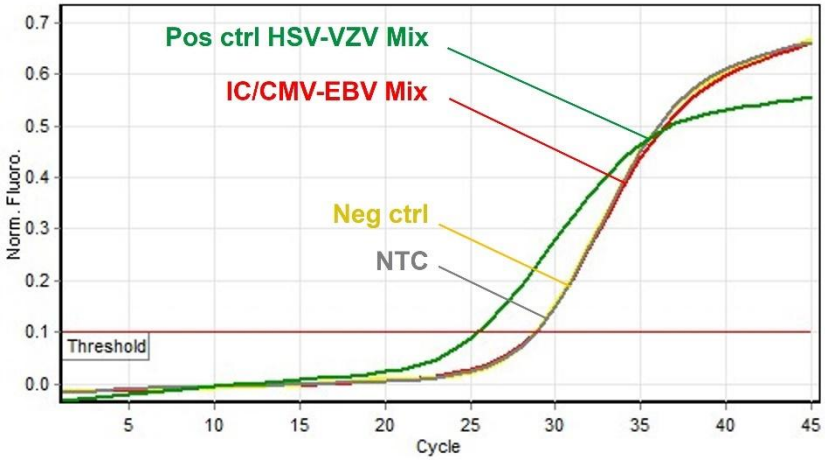
۱۹. تحلیل نتایج

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. آستانه (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید. همین مراحل را برای کانال‌های زرد و نارنجی نیز تکرار کنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدهای مثبت و منفی و کنترل داخلی، تصاویر یک، دو و سه را ملاحظه فرمائید.

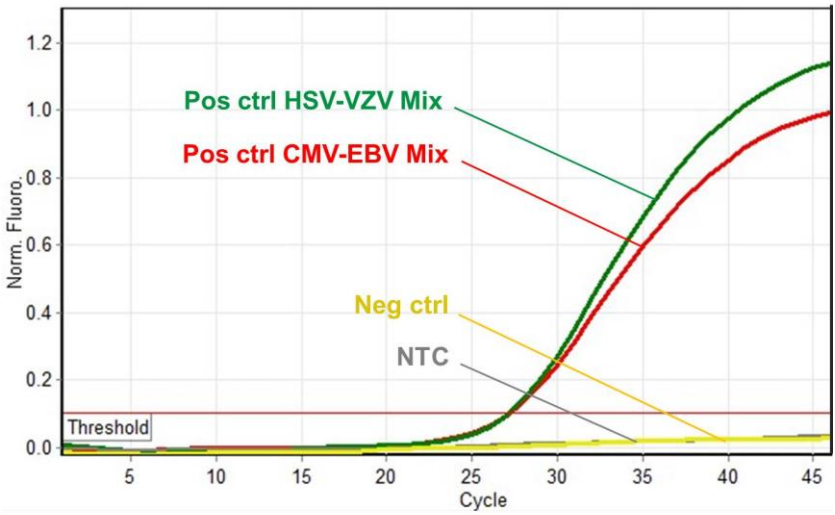
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می‌شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می‌شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می‌باشد.



شکل ۱. منحنی شاهدها در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. منحنی شاهدها و کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه روتورژن



شکل ۳. منحنی شاهدها در کانال نارنجی دستگاه روتورژن

توجه داشته باشید در **میکس CMV-EBV** افزایش **تابش سبز** مربوط به **EBV**، افزایش **تابش زرد** مربوط به **کنترل داخلی** و افزایش **تابش نارنجی** مربوط به **CMV** می باشد.

در **میکس HSV-VZV** افزایش **تابش سبز** مربوط به **HSV-1**، افزایش **تابش زرد** مربوط به **HSV-2** و افزایش **تابش نارنجی** مربوط به **VZV** می‌باشد.

توضیحات فوق به طور خلاصه در جدول یک آمده است.

میکس	کانال سبز	کانال زرد	کانال نارنجی
میکس CMV-EBV	EBV	کنترل داخلی	CMV
میکس HSV-VZV	HSV-1	HSV-2	VZV

جدول ۱. ارتباط نتایج به دست آمده با دو میکس در کانال های سبز، زرد و نارنجی

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه با میکس CMV-EBV در **کانال سبز** مثبت و CT آن کمتر از ۴۰ باشد، نمونه برای **EBV** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه با میکس CMV-EBV در **کانال نارنجی** مثبت و CT آن کمتر از ۴۰ باشد، برای **CMV** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه با میکس HSV-VZV در **کانال سبز** مثبت و CT آن کمتر از ۴۰ باشد، برای **HSV-1** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه با میکس HSV-VZV در **کانال زرد** مثبت و CT آن کمتر از ۴۰ باشد، برای **HSV-2** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه با میکس HSV-VZV در **کانال نارنجی** مثبت و CT آن کمتر از ۴۰ باشد، برای **VZV** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه با میکس CMV-EBV در هر دو کانال سبز و نارنجی منفی باشد و در **کانال زرد** دارای منحنی سیگموئیدی و CT بین ۲۸ تا ۳۲ باشد، نمونه منفی و فاقد ویروس های **CMV** و **EBV** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که نمونه در هر سه کانال **سبز**، **زرد** و **نارنجی** میکس HSV-VZV منفی بوده، و با میکس CMV-EBV در **کانال زرد** مثبت و دارای CT بین ۲۸ تا ۳۲ باشد، نمونه فاقد ویروس های **HSV-1**، **HSV-2** و **VZV** و منفی در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که نمونه در هر سه کانال **سبز**، **زرد** و **نارنجی** در دو میکس منفی باشد، آزمایش، نامعتبر بوده و باید **تکرار** شود.

تفسیر نتایج، در جدول ۲ خلاصه شده است.

Mix	Green	Yellow	Orange	Result
CMV-EBV	+	+/-	-	Pos: EBV
CMV-EBV	-	+/-	+	Pos: CMV
HSV-VZV	+	-	-	Pos: HSV-1
HSV-VZV	-	+	-	Pos: HSV-2
HSV-VZV	-	-	+	Pos: VZV

Mix	Green	Yellow	Orange	Result
CMV-EBV	-	+	-	Negative
HSV-VZV	-	-	-	

Mix	Green	Yellow	Orange	Result
CMV-EBV	-	-	-	Invalid
HSV-VZV	-	-	-	

جدول۲. تفسیر نتایج آزمایش در سه کانال سبز، زرد و نارنجی دستگاه روتورژن.

۲۰. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت برای هر یک از ویروس های مورد مطالعه با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس بررسی شده است. این مقدار حساسیت برای CMV، HSV-1 و HSV-2، ۰/۵ کپی در میکرولیتر، و برای VZV و EBV ، ۱ کپی 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.

۲۱. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیک 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.

۲۲. پشتیبانی فنی

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

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

۲۳. 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

۲۴. منابع

- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212.
- Spear, P.G. and Longnecker, R., 2003. Herpesvirus Entry: an Update. Journal of Virology, 77(19), pp.10179–10185.
- Spencer, J.V., 2005. Herpes. Philadelphia: Chelsea House Publishers.
- Välimaa, H., Seppänen, M. and Hukkanen, V., 2013. Herpes simplex. Duodecim; Laaketieteellinen Aikakauskirja, 129(1), pp.31-40.

۲۵. 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.

Herpes RQ
Kit Manual

Autumn 2025, Version 2.0

For Multiplex Real-Time PCR Detection of
CMV, HSV-1, HSV-2, EBV and VZV DNA
For use with Rotor-Gene
For Research Use Only

24 (Cat# HerpesRQ24)
48 (Cat# HerpesRQ48)
96 (Cat# HerpesRQ96)

NG-WI-ASL-34-200

RUO

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

Novin Gene

Table of Contents

1. Introduction 3
2. Intended Use 3
3. Pathogen 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 Substance 6
13. Internal Control (IC) 6
14 DNA Isolation 7
15 PCR Protocol 7
16. Devices and software 8
17. Programming of the Rotor-Gene 8
18. Programming Other Machines 9
19. Data Analysis: Rotor-Gene 10
20. Sensitivity 14
21. Disposal Method 14

22. Technical Support 14
23. Contact Information 14
24. References 15
25. Symbols 15

1. Introduction

Herpes RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR test for detection of Cytomegalovirus (CMV), Herpes Simplex virus-1 (HSV-1), Herpes Simplex virus-2 (HSV-2), Epstein Barr virus (EBV) and Varicella Zoster virus (VZV) DNA.
Kit contains two PCR Mixes, with all required reagents included. One of the Mixes 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.

2. Intended Use

Herpes RQ kit is intended for detecting CMV, HSV-1, HSV-2, EBV and VZV. Detection is achieved using Multiplex Real-Time PCR. This kit is designed for use with Rotor-Gene and MIC.

3. Background Information

CMV, HSV-1, HSV-2, EBV and VZV all are members of Herpesviridae family and have double-stranded DNA genome. These viruses are among common human pathogens and involved in a wide spectrum of diseases including CNS infections.
Herpes RQ kit, provides a fast, sensitive, and also cost-effective Multiplex Real-Time PCR system for detection of multiple viruses from Herpesviridae family (CMV, HSV-1, HSV-2, EBV and VZV) in variety of samples.

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
CMV-EBV Mix	PCR mix* for CMV and EBV	360 µl
HSV-VZV Mix	PCR mix* for HSV-1, HSV-2 and VZV	360 µl
HH Pos Ctrl	Positive control	100 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 content should not be used if there is any sign of pink or red color on the WarmMark 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 accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit and required equipments/items
- Nuclease free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

10. 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 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 ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Do not place PCR microtubes on crushed ice. Use cooling blocks instead.

11. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood plasma, CSF or tissue should be collected in sterile condition in proper and sterile containers. Samples can be stored at +4°C for 48 hours or 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 Herpes RQ kit contains an internal control (IC). This IC should be used during the extraction process 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.
In a successful DNA extraction and PCR test, IC should generate a CT of 28-32 in Yellow channel with CMV-EBV Mix.

14. DNA Isolation

DNA 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 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. Each sample should be evaluated for DNA of CMV, HSV-1, HSV-2, EBV and VZV, in two different series of microtubes. In the first series, examining CMV and EBV DNA, consider one tube for each sample plus one for each controls. In second series, examining HSV-1, HSV-2 and VZV DNA, consider one tube for each sample, plus one for each control. Place required number of tubes on cold block.

In first series of microtubes, pipette 15µl of CMV-EBV Mix to each PCR microtube.

In second series of microtubes, pipette 15µl of HSV-VZV Mix to each PCR microtube.

Then add 10ul of extracted DNA, positive or negative controls to each tube.

Cap the tubes and visually inspect to ensure all are caped securely.
Place the tubes in the machine.
Note: In Rotor-Gene machine, attach the locking ring.

16. Devices and software

Herpes RQ kit is designed to work with Rotor-Gene and MIC.

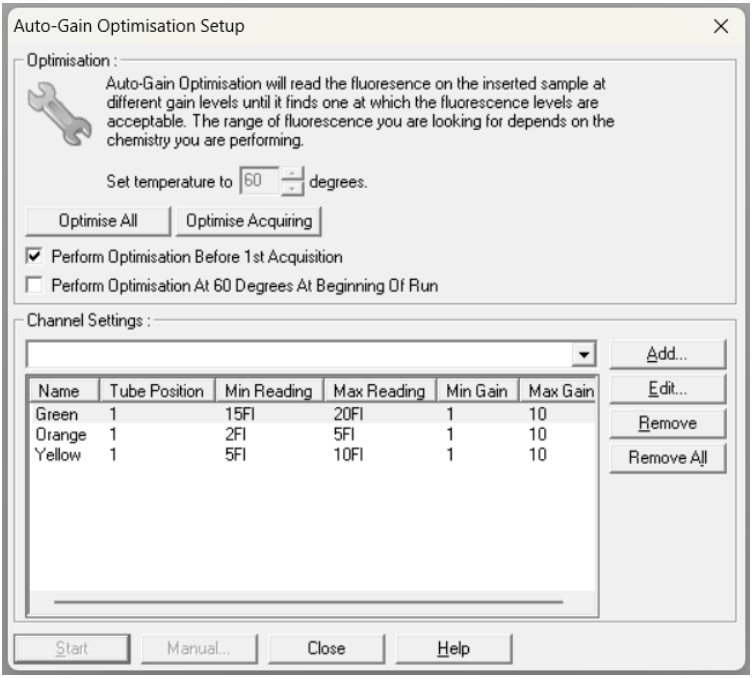
17. Programming of the Rotor-Gene

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

Open the Herpes template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); Herpes 0.1 is for strip tubes and Herpes 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 CMV-EBV Mix).

Click on the 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 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 20 sec**	45
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for Green/FAM, Yellow/VIC and Orange/ROX dyes.

Please note that Herpes Mix does not contain ROX dye as a normalizer!

19. Data Analysis

Before analyzing results, make sure that in the sample menu, Patient samples are defined as "unknown", Positive Control for the "Positive control", and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively.

Analyze data according to RotorGene Manual. Briefly, click on Analysis menu and then under Quantitation tab double click on Cycling A. Green. Set the threshold at 0.1. Repeat the above for the Yellow and the Orange channels and manually put threshold on 0.1. Figures 1, 2 and 3 represent typical graphs for the 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.

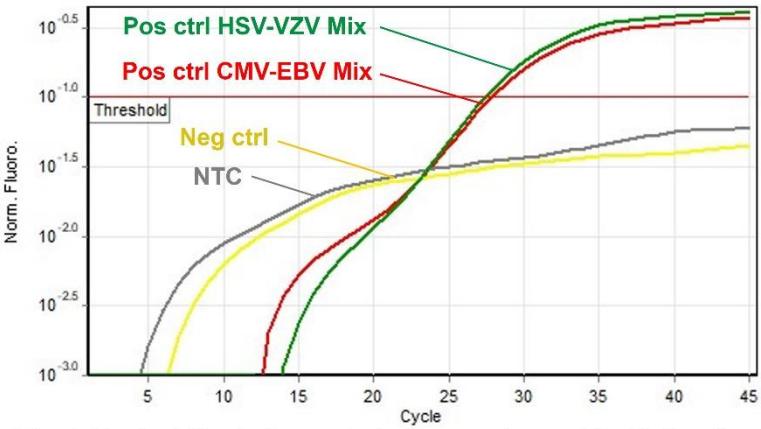


Fig 1. Typical Controls graph in Green channel for Rotor-Gene

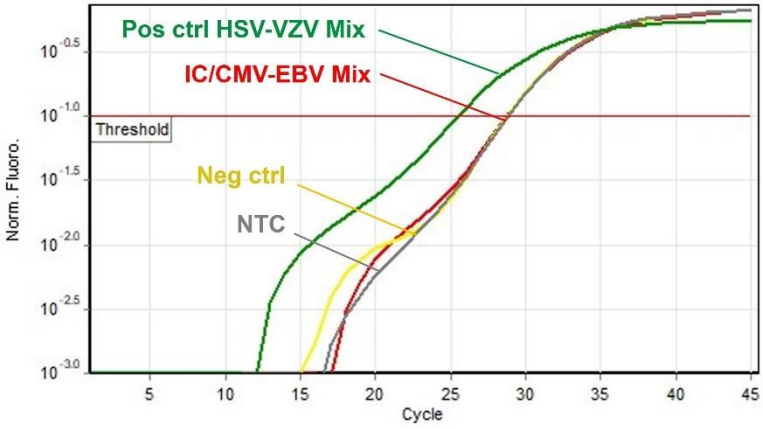


Fig 2. Typical Controls graph in Yellow channel for Rotor-Gene

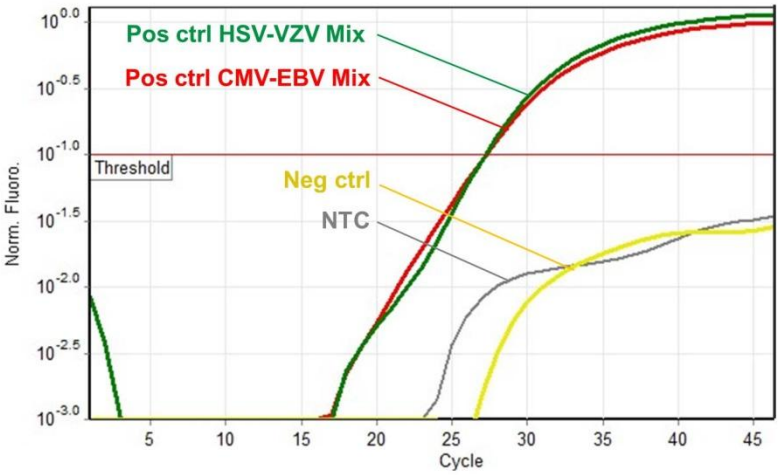


Fig 3. Typical Controls graph in Orange channel for Rotor-Gene

To interpret the results, please note that:

- In **CMV-EBV Mix**, a signal in the **Green channel** is due to **EBV**, in the **Yellow channel** due to **IC** and signal in the **Orange channel** is due to **CMV.**
- In **HSV-VZV Mix**, a signal in the **Green channel** is due to **HSV-1**, in the **Yellow channel** due to **HSV-2** and in the **Orange channel** is due to **VZV.**

Table 1 summarizes the above explanation.

Mix	Green Channel	Yellow Channel	Orange Channel
CMV-EBV	EBV	IC	CMV
HSV-VZV	HSV-1	HSV-2	VZV

Table 1: The relationship between results with each mixes in different channels

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive for EBV,** if it is positive in Green channel with CMV-EBV Mix and a CT of less than 40.
- A sample is **Positive for CMV,** if it is positive in Orange channel with CMV-EBV Mix and a CT of less than 40.
- A sample is **Positive for HSV-1** if it is positive in Green channel with HSV-VZV Mix and a CT of less than 40.
- A sample is **Positive for HSV-2** if it is positive in Yellow channel with HSV-VZV Mix and a CT of less than 40.
- A sample is **Positive for VZV** if it is positive in Orange channel with HSV-VZV Mix and a CT of less than 40.
- A sample is **Negative for CMV and EBV**, if it is negative in Green and Orange channels while it is positive in Yellow channel with a sigmoid graph and a CT of 28-32.
- A sample is **Negative for HSV-1, HSV-2 and VZV**, if it is negative in Green, Yellow and Orange channels with HSV-VZV mix while it is positive in the Yellow channel of CMV-EBV Mix with a sigmoid graph and CT of 28-32.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in all three channels (Green, Yellow and Orange) and also if IC in negative in Yellow channel of CMV-EBV Mix.

Interpretation of results is summarized in table 2.

Mix	Green	Yellow	Orange	Result
CMV-EBV	+	+/-	-	Pos: EBV
CMV-EBV	-	+/-	+	Pos: CMV
HSV-VZV	+	-	-	Pos: HSV-1
HSV-VZV	-	+	-	Pos: HSV-2
HSV-VZV	-	-	+	Pos: VZV

Mix	Green	Yellow	Orange	Result
CMV-EBV	-	+	-	Negative
HSV-VZV	-	-	-	

Mix	Green	Yellow	Orange	Result
CMV-EBV	-	-	-	Invalid
HSV-VZV	-	-	-	

Table 2. Interpretation of results in Green, Yellow and Orange channels of Rotor-Gene

20. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with a cloned target and showed a sensitivity of 0.5 copy/µl for CMV, HSV-1 and HSV-2; and 1 copy/µl for EBV and VZV.

21. 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.

22. Technical Support

For technical support, contact us via
Phone: +98 993-6223241
Email: info@novingene.com

23. Contact Information

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

Tel: +98 21 88837393
+98-990 11813124
Email: info@novingene.com
Website: www.novingene.com

24. References

- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212.
- Spear, P.G. and Longnecker, R., 2003. Herpesvirus Entry: an Update. Journal of Virology, 77(19), pp.10179–10185.
- Spencer, J.V., 2005. Herpes. Philadelphia: Chelsea House Publishers.
- Välimaa, H., Seppänen, M. and Hukkanen, V., 2013. Herpes simplex. Duodecim; Laaketieteellinen Aikakauskirja, 129(1), pp.31-40.

25. 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