

راهنمای کیت CMV RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۶/۰

جهت تشخیص و کمیت سنجی DNA ویروس سیتومگالوویروس انسانی
به روش Real-Time PCR
مخصوص تحقیقات

Σ 24 (Cat# CMVRQ24)

Σ 48 (Cat# CMVRQ48)

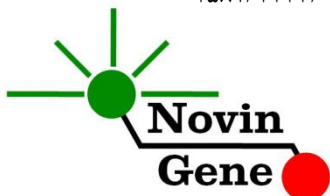
Σ 96 (Cat# CMVRQ96)

HB NG-WI-ASL-05-600

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

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



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. دستور کار 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 تیترو ویروس.....	۱۸
۲۳. محدوده خطی.....	۱۸
۲۴. میزان حساسیت.....	۱۸
۲۵. روش امحاء.....	۱۹
۲۶. پشتیبانی فنی.....	۱۹
۲۷. اطلاعات تماس.....	۱۹
۲۸. منابع.....	۲۰
۲۹. توضیحات برچسب.....	۲۰

۱. مقدمه

کیت CMV RQ جهت تشخیص و کمیت سنجی DNA ویروس سیتومگالوویروس (Cytomegalovirus, CMV) 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 CMV امکان بررسی نمونه پلاسمای بیمار را جهت تشخیص و کمیت سنجی DNA ویروس CMV 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

ویروس هرپس انسانی (human herpesvirus 5, HHV-5) معروف به سیتومگالو ویروس (Cytomegalovirus, CMV) از ویروس های خانواده هرپس ویریده (Herpesviridae) است و ژنوم آن از DNA دو رشته ای تشکیل شده است. این ویروس یکی از عوامل بیماری‌زای بسیار شایع است و حدود ۸۰٪ بزرگسالان به آن مبتلا هستند. عفونت اولیه معمولاً در سنین کودکی اتفاق می‌افتد و عمدتاً فاقد علائم بالینی واضح است. در پی عفونت اولیه ویروس به صورت نهفته (latent) تا پایان عمر در بدن فرد باقی می‌ماند. در صورت بروز ضعف سیستم ایمنی امکان فعال شدن ویروس نیز وجود دارد؛ به طور مثال پس

از پیوند سلول های بنیادی و مغز استخوان و یا پیوند بافت و عضو و همچنین در صورت عفونت با HIV. تشخیص و مدیریت عفونت سیتومگالوویروس در چنین بیمارانی عمدتاً مبتنی بر اندازه گیری تیترو ویروس می باشد. اندازه گیری کمی تیترو ویروس در خون بیمار امکان ارزیابی احتمال بازگشت عفونت و تشخیص زودهنگام آن، پیشگیری، بررسی پاسخ درمانی، تعیین موفقیت یا عدم موفقیت درمان و بروز گونه های مقاوم را فراهم می کند.

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی عامل عفونی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز Polymerase Chain Reaction/PCR انجام می شود. طی این واکنش ماده ژنتیکی عامل عفونی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب های فلورسنت قابل تشخیص می گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می توان 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 روش هایی 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 می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
CMV Mix	میکس آماده برای PCR*	۳۶۰ میکرولیتر
CMV S1	استاندارد ۱: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
CMV S2	استاندارد ۲: یک هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر

۱۵۰ میکرولیتر	استاندارد ۳: یک صدکی در میکرولیتر	CMV S3
۱۵۰ میکرولیتر	استاندارد ۴: ده کی در میکرولیتر	CMV S4
۲۵۰ میکرولیتر	کنترل داخلی*	Internal Ctrl
۲۰۰ میکرولیتر	آب مخصوص PCR	Water

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

۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست و چهار، 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 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 می گردد.
- 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
 - 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 آماده‌سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای

آماده‌سازی 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.
- پیش از باز کردن درپوش لوله های درون کیت، آن‌ها را کاملاً ذوب نموده 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 یخ خرد شده خودداری کنید.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش ویروس CMV با این کیت، خون کامل (whole blood) و پلاسمای خون محیطی (peripheral blood) می‌باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می‌تواند EDTA یا سیترات باشد. نمونه را می‌توان تا ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. هنگام دریافت نمونه در آزمایشگاه باید پلاسما را جدا نموده و در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. نمونه پلاسما در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیترو 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 ۱۰۰۰ میلی 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 CMV 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 کارایی خود را از دست خواهد داد. در صورتی که کنترل داخلی را به CMV 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 CMV 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 PCR، کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۸ تا ۳۲ در دستگاه روتورژن و ۲۸ تا ۳۴ در دستگاه StepOne 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)

۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی لوله‌ها 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. به تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه‌های مورد آزمایش، ۴ 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 **CMV Mix** اضافه کنید.

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به **CMV 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 و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه *StepOne* لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتیفریژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.
توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

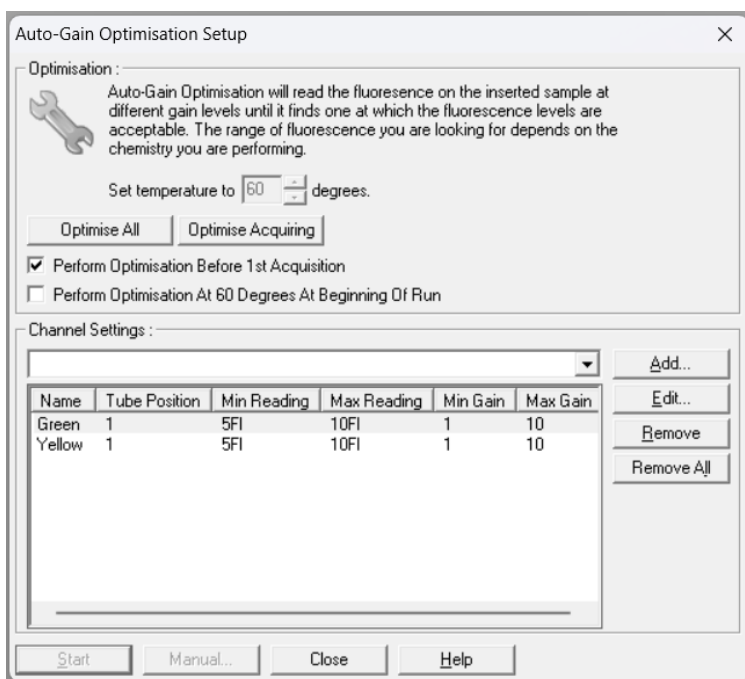
۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت CMV RQ جهت کار با دستگاه های 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 CMV را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل CMV 0.2 یا CMV 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 دقیقاً 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 CMV 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 مور 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 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 فلش کارت همراه کیت را انتخاب کنید. (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. یک کنترل منفی به همراه چهار استاندارد و چند 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 نیز اضافه کنید 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 دستگاه‌ها

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

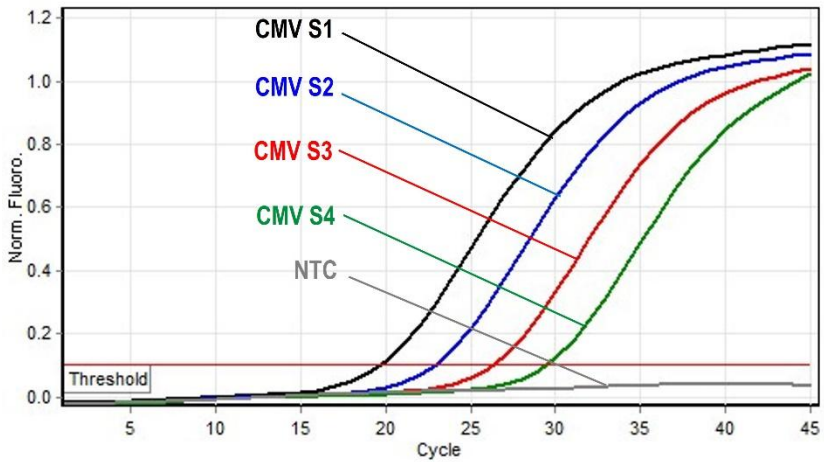
Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 3 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

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

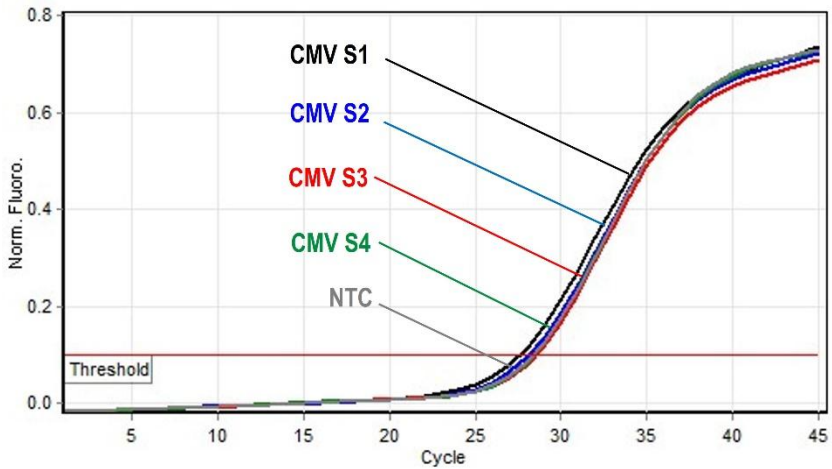
۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Quantitation, Analysis را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره auto-find 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 (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید. سپس در منوی Analysis مجدداً Quantitation و سپس Yellow را کلیک کنید. در پنجره auto-find threshold دکمه cancel را بزنید 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 CMV و افزایش تابش زرد (Yellow) حاصل از کنترل داخلی می‌باشد.



شکل ۱. منحنی استاندارد های CMV در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه روتورژن

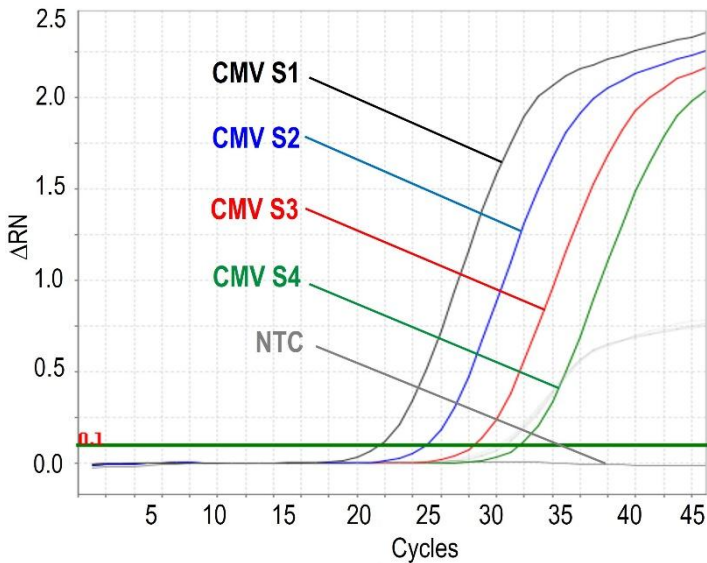
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

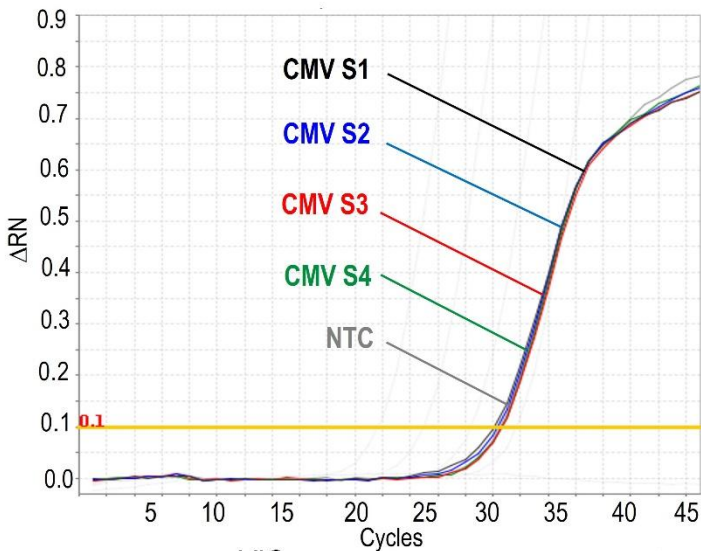
- در صورتی که نمونه در کانال سبز مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد می توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیترا محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال سبز منفی باشد ولی در کانال زرد مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۲ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال سبز و زرد منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

۲۱. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. آستانه (threshold) را برای CMV/FAM و برای IC/VIC 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 CMV/FAM** مربوط به **CMV** و افزایش **تابش IC/VIC** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد.



شکل ۳. منحنی استاندارد های CMV در کانال FAM دستگاه استپ وان



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

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.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال CMV/FAM مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال IC/VIC می‌توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیترا محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
 - در صورتی که یک نمونه در کانال CMV/FAM منفی باشد ولی در کانال IC/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۴ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.
 - در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال CMV/FAM و IC/VIC منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.
- خلاصه تفسیر نتایج آزمایش را می‌توانید در جدول زیر مشاهده نمایید.

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

۲۲. محاسبه تیترو ویروس

هر کیت حاوی چهار 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 با واحد کپی در میکرولیتر (copy/μl) مشخص شده‌اند. برای تبدیل نتایج به صورت کپی در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Result(copy/ml)} = \frac{\text{Result (copy/}\mu\text{l)} \times \text{elution volume (}\mu\text{l)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

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 کپی در میلی لیتر (copy/ml) تبدیل شوند.

۲۳. محدوده خطی

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

۲۴. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس بررسی شده است و معادل یک کپی در میکرولیتر می‌باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیترو ویروس در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیترو 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 بیولوژیک یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیماً به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه‌های 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.ir

۲۸. منابع

- Griffiths, P. and Reeves, M., 2021. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. *Nature Reviews Microbiology*, 19(12), pp.759-773.
- Kotton, C.N., 2013. CMV: prevention, diagnosis and therapy. *American Journal of Transplantation*, 13, pp.24-40.
- Mackay, Ian M. "Real-time PCR in the microbiology laboratory." *Clinical microbiology and infection* 10, no. 3. 2004: 190-212.
- Thomasini, R.L. ed., 2020. Human Herpesvirus Infection: Biological Features, Transmission, Symptoms, Diagnosis and Treatment. BoD–Books on Demand.

۲۹. توضیحات برچسب

دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید		تولید کننده		جهت مصارف پژوهشی	RUO
تاریخ انقضاء		تعداد >n< آزمون کافی		کدبهر (شماره بچ)	LOT
محدوده دمایی -30°C - 10°C		شماره سریال	SN	شماره کاتالوگ	REF

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

CMV RQ Kit Manual

Autumn 2025, Version 6.0

For Real-Time PCR Detection and Quantitation of
Cytomegalovirus (CMV) DNA
For Research Use Only

 24 (Cat# CMVRQ24)

 48 (Cat# CMVRQ48)

 96 (Cat# CMVRQ96)

 NG-WI-ASL-05-600

RUO



NovinGene ParsVira

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

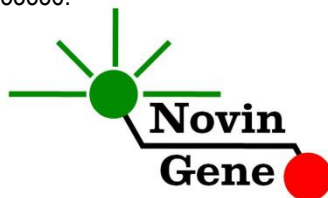


Table of Contents

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

20. Data Analysis: Rotor-Gene	10
21. Data Analysis: StepOne	13
22. Quantitation	15
23. Linear Range	16
24. Sensitivity.....	16
25. Disposal Method	16
26. Technical Support.....	16
27. Contact Information.....	16
28. References	17
29. Symbols	17

1. Introduction

CMV RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting and quantifying Cytomegalovirus (CMV) 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

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

3. Background Information

Human Herpesvirus 5 (HHV-5) known as Cytomegalovirus (CMV) is a double-stranded DNA virus and a member of Herpesviridae family. It is a widespread pathogen with high seropositivity (about 80%) in adult population. Primary infection is usually subclinical and mostly happens in early childhood. The primary infection is followed by the latent infection and CMV persists in the infected person through life. CMV can be reactivated in immunocompromised hosts, for example after stem cell, bone marrow or solid organ transplantation or in the course of HIV infection. In these patients, viral load assays are the cornerstone for the diagnosis and monitoring of CMV disease. Viral load

quantification in blood allows assessing patients at risk of developing relapsing infection, early detection of active CMV infection, guiding preemptive therapy, monitoring response to therapy, determining duration of therapy and prediction of treatment failure due to emergence of resistant strains.

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 Mix	PCR mix*	360 µl
CMV S1	Standard 1: 10,000 copy/µl	150 µl
CMV S2	Standard 2: 1,000 copy/µl	150 µl
CMV S3	Standard 3: 100 copy/µl	150 µl
CMV S4	Standard 4: 10 copy/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) 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 pipettors 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 CMV are peripheral blood and whole blood, which should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend EDTA or citrate plasma for CMV 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 two days or aliquoted and stored at -20°C for up to a few months.

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 Adenovirus RQ kit contains an internal control (IC). This IC can be used during the extraction process or added directly to the CMV 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 the IC is 10% of the elution buffer. For instance, if the extracted DNA is eluted with 100ul, then 10ul of the 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 CMV 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 CMV Mix before it is added to the tubes. In a successful DNA extraction and PCR test, the IC should generate a CT of 28-32 in the Yellow channel on RotorGene and 28-34 in VIC channel on StepOne.

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)
- QIAampUltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampMiniElute 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, four for standards and one for the negative control.

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

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

Then add 10ul 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

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

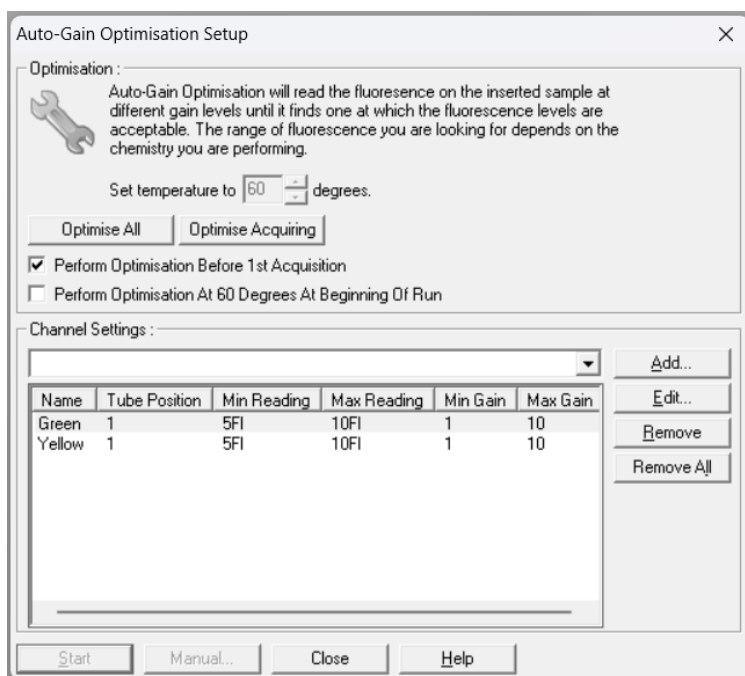
17. Programming Rotor-Gene

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

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



Auto-Gain Optimisation Setup

Optimisation :

Auto-Gain Optimisation will read the fluorescence on the inserted sample at different gain levels until it finds one at which the fluorescence levels are acceptable. The range of fluorescence you are looking for depends on the chemistry you are performing.

Set temperature to degrees.

☒ Perform Optimisation Before 1st Acquisition

☐ Perform Optimisation At 60 Degrees At Beginning Of Run

Channel Settings :

Name	Tube Position	Min Reading	Max Reading	Min Gain	Max Gain
Green	1	5FI	10FI	1	10
Yellow	1	5FI	10FI	1	10

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 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, 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	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. The CMV Mix contains ROX. Final concentration of ROX in reaction is 300nM.

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

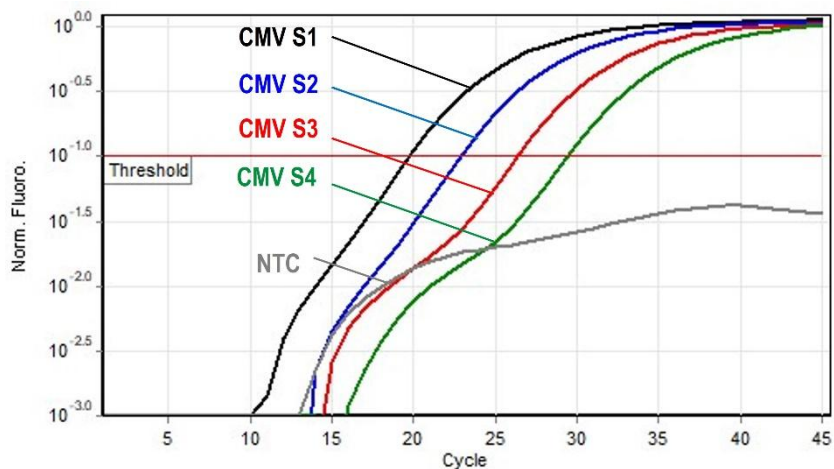


Fig 1. Typical CMV graph in Green channel for Rotor-Gene

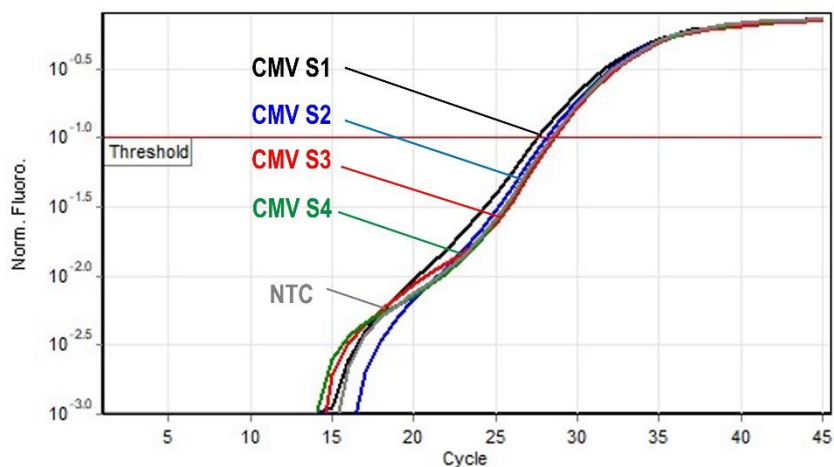


Fig 2. Typical IC graph in Yellow channel for Rotor-Gene

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in the Green channel with a 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 28-32.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of the Green and Yellow channels.

The interpretation of the results is summarized in the table on page 15.

21. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to StepOne manual. Briefly, click on Analyze and set the threshold for the CMV/FAM and IC/VIC at 0.1. 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.

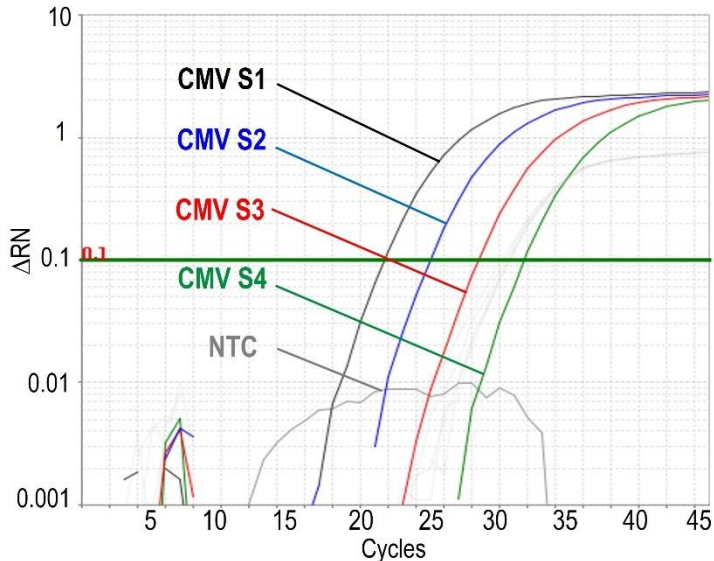


Fig 3. Typical CMV graph in FAM channel for StepOne

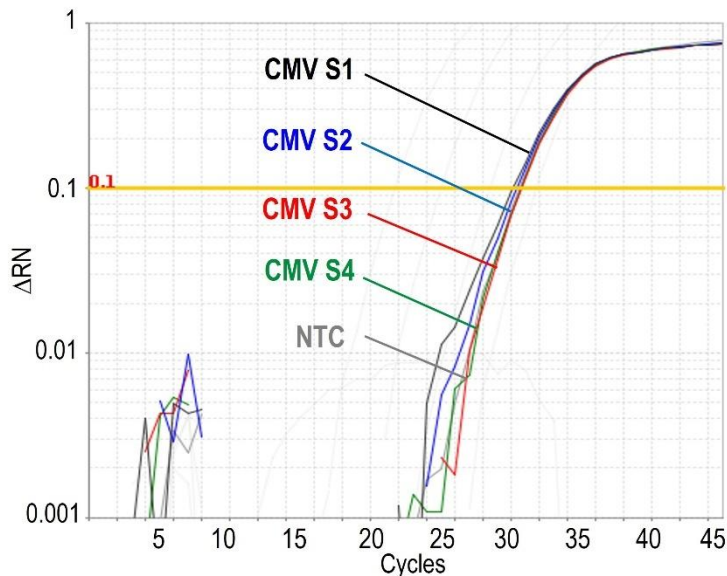


Fig 4. Typical IC graph in VIC channel for StepOne

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in the FAM/CMV 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/CMV channel while it is positive in the VIC/IC 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 FAM/CMV and the VIC/IC channels.

The interpretation of the results is summarized in the following table.

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

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:

$$\text{Result (copy/ml)} = \frac{\text{Result(copy/}\mu\text{l)} \times \text{elution volume (}\mu\text{l)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

“Sample volume” is the plasma volume used for DNA isolation and “Elution volume” is the volume of buffer or water used to elute or dissolve isolated DNA.

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 1,000,000 copies/ μ l to 1 copy/ μ l.

24. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with a cloned target and showed a limit of detection equal to 1 copy/ μ l.

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 at +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
 Email: info@novingene.com
 Website: www.novingene.com

28. References

- Griffiths, P. and Reeves, M., 2021. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. *Nature Reviews Microbiology*, 19(12), pp.759-773.
- Kotton, C.N., 2013. CMV: prevention, diagnosis and therapy. *American Journal of Transplantation*, 13, pp.24-40.
- Mackay, Ian M. "Real-time PCR in the microbiology laboratory." *Clinical microbiology and infection* 10, no. 3., 2004: 190-212.
- Thomasini, R.L. ed., 2020. Human Herpesvirus Infection: Biological Features, Transmission, Symptoms, Diagnosis and Treatment. BoD–Books on Demand.

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	 Temperature limit

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

