راهنمای کیت

HCV Genotype RG

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۲/۱

جهت تعیین ژنوتایپ ویروس هپاتیت ث به روش Real-Time RT-PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene

مخصوص تحقیقات

Σ 24 (Cat# HCVGenRG24)

Σ 48 (Cat# HCVGenRG48)

Σ 96 (Cat# HCVGenRG96)

NG-WI-ASL-03-201

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. استخراج RNA..... ۸
۱۴. دستورکار RT-PCR و مراحل آزمایش..... ۸
۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها..... ۹
۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۹
۱۷. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۱۰
۱۸. تحلیل نتایج Rotor-Gene ۱۱
۱۹. میزان حساسیت..... ۱۴

۲۰. روش امحاء..... ۱۴
۲۱. پشتیبانی فنی..... ۱۵
۲۲. اطلاعات تماس..... ۱۵
۲۳. منابع..... ۱۵
۲۴. توضیحات برچسب..... ۱۶

۱. مقدمه

کیت HCV Genotype RG جهت تعیین ژنوتایپ ویروس هپاتیت C به روش Real-Time RT-PCR طراحی شده است. در این روش به کمک پرایمرها و پروب‌های اختصاصی، کیت قادر به تشخیص ژنوتایپ ویروس هپاتیت C برای تایپ‌های ۱، ۲ و ۳ می‌باشد. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

۲. حیطه کاربرد

کیت HCV Genotype RG امکان بررسی نمونه بیمار را جهت تعیین ژنوتایپ ویروس هپاتیت ث تایپ ۱، ۲ و ۳ با روش Real-Time RT-PCR را فراهم می‌کند. این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene طراحی شده است. این کیت قادر به تشخیص ژنوتایپ های ۴، ۵ و ۶ هپاتیت ث نمی‌باشد.

۳. اطلاعات زمینه ای

ویروس هپاتیت ث (Hepatitis C Virus, HCV) مهمترین عامل سیروز و سرطان کبد می‌باشد. تا کنون ۶ ژنوتایپ و بیش از ۸۰ ساب تایپ مختلف این ویروس شناخته شده است.

بر اساس مطالعات بالینی، تیتر ویروس در خون بیمار قبل از شروع درمان و همچنین ژنوتایپ ویروس مهمترین عواملی هستند که در انتخاب رژیم درمانی و پیش بینی پاسخ بیمار به درمان موثر می باشند. به همین دلیل پس از تشخیص عفونت بیمار با این ویروس، تعیین تیتر و ژنوتایپ الزامیست. به علاوه از آنجا که ژنوتایپ‌های HCV توزیع و شیوع جهانی یکسانی ندارند، تعیین ژنوتایپ در مطالعات اپیدمیولوژی نیز اهمیت ویژه ای دارد.

بهترین روش تعیین ژنوتایپ ویروس هپاتیت ث در حال حاضر تعیین توالی و بررسی های فیلوژنتیک می‌باشد. به دلیل محدودیت‌های فنی استفاده از این روش

ها بطور مستمر و روزانه در آزمایشگاه‌های بالینی ممکن نمی‌باشد، لذا از روش‌های دیگر که عمدتا مبتنی بر PCR می‌باشند استفاده می‌شود.

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 دفترچه راهنما، فلش کارت و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
HCV Gen Mix RG	میکس RT-PCR *	۳۰۰ میکرولیتر
HCV-1	شاهد مثبت تایپ ۱	۱۵۰ میکرولیتر
HCV-2	شاهد مثبت تایپ ۲	۱۵۰ میکرولیتر
HCV-3	شاهد مثبت تایپ ۳	۱۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* یک، دو یا چهار تیوب، به ترتیب برای کیت های 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 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 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 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)

توجه! برای استفاده از این کیت نیازی به سنتز cDNA در یک مرحله جداگانه نمی‌باشد. میکس کیت حاوی مواد لازم برای سنتز cDNA و واکنش PCR می‌باشد.

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 RNA 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 استفاده از کیت، لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا محتویات آن ها کاملا ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن مواد 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 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 هپاتیت ث و تعیین ژنوتایپ آن 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. خون کامل را می توان تا ۴۸ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. هنگام دریافت نمونه در آزمایشگاه باید پس از سانتریفوژ، پلاسمای آن را جدا نموده و در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. نمونه پلاسما در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیتر ویروس در آن ثابت می‌ماند.

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

۱۲. عوامل مزاحم

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

برای استخراج RNA از نمونه پلاسما از روش ها و کیت های مختلفی می‌توان استفاده نمود. استفاده از کیت های زیر را توصیه می‌شود:

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

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

تعداد مورد نیاز لوله PCR را روی بلوک سرد بگذارید. **به هر لوله ۱۲/۵ میکرولیتر از HCV Gen Mix RG اضافه کنید. سپس ۱۲/۵ میکرولیتر از RNA**

استخراج شده و یا شاهد مثبت 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: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت HCV Gen RG جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene و MIC طراحی شده است.

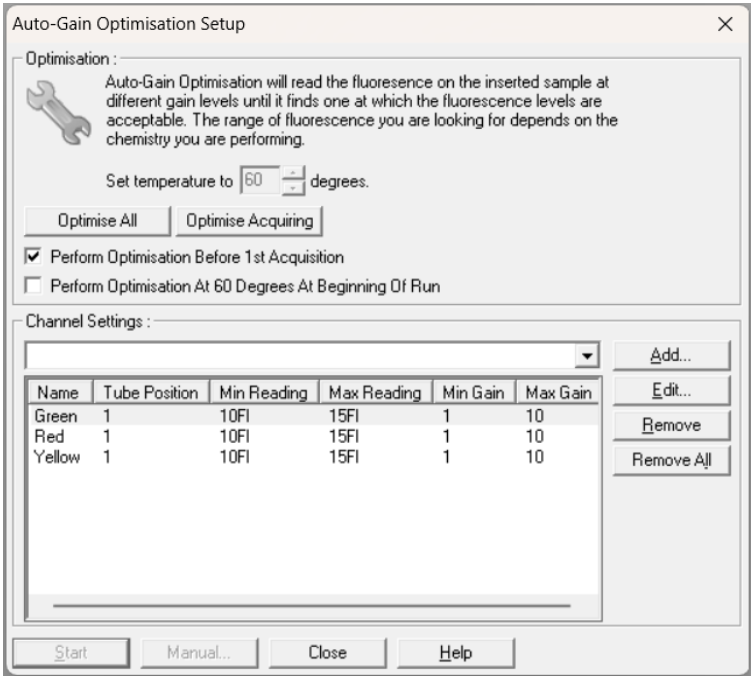
۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

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 Gen را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل HCV Gen 0.2 یا HCV Gen 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 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 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 در محل مورد نظرتان ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود. در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای کنترل مثبت Positive Control را انتخاب کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یاNegative Control را انتخاب کنید.

۱۷. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های 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**	10
	63°C x 15 sec	
	72°C x 15 sec	
4	**95°C x 15 sec**	45
	62°C x 15 sec	
	72°C x 15 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۲ درجه و برای رنگ‌های FAM و VIC و Cy5 تنظیم شود. Mix موجود در کیت حاوی ROX می‌باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 30nM می باشد.

۱۸. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. توجه داشته باشید هر یک از ژنوتایپ ها باعث افزایش تابش فلورسانس در کانال مخصوص به خود می‌شود. یعنی نمونه **تایپ ۱ در کانال سبز**، نمونه **تایپ ۲ در کانال قرمز** و نمونه **تایپ ۳ در کانال زرد** تشخیص داده می شود.

به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold دکمه cancel را بزنید و threshold را روی ۰/۱ قرار دهید. همین کار را برای کانال زرد و قرمز تکرار کنید. برای کانال‌های زرد و قرمز threshold را روی ۰/۲ قرار دهید.

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 CT کمتر از ۴۰ باشد، نمونه حاوی **ژنوتایپ ۱** ویروس هپاتیت ث می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال قرمز** مثبت و دارای CT کمتر از ۴۰ باشد، نمونه حاوی **ژنوتایپ ۲** ویروس هپاتیت ث می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال زرد** مثبت و دارای CT کمتر از ۴۰ باشد، نمونه حاوی **ژنوتایپ ۳** ویروس هپاتیت ث می‌باشد.

در صورتی که در هیچ کدام از کانال های فوق مثبت نشود، حالات زیر را باید در نظر گرفت:

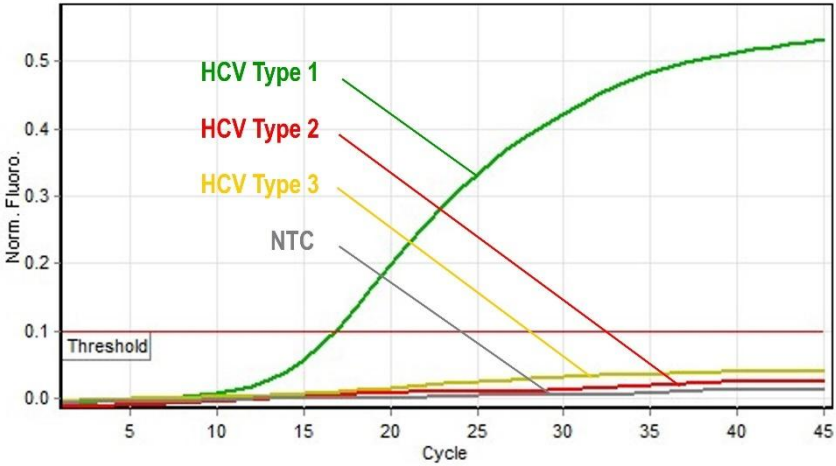
- نمونه از نظر هپاتیت ث منفی است.
- نمونه از نظر هپاتیت ث تایپ ۱یا ۲ یا ۳ مثبت است اما تیتر آن کمتر از حساسیت کیت می باشد.
- نمونه از نظر هپاتیت ث تایپ ۴ یا ۵ یا ۶ مثبت می باشد.

توجه: بر اساس مطالعات اپیدمیولوژی، در ایران تایپ ۱ و سپس تایپ ۳ شایع ترین تایپ ها می باشند. تایپ ۲ نیز بعضاً گزارش شده است. تایپ های ۴ و ۵ و ۶ تاکنون در ایران مشاهده نشده اند.

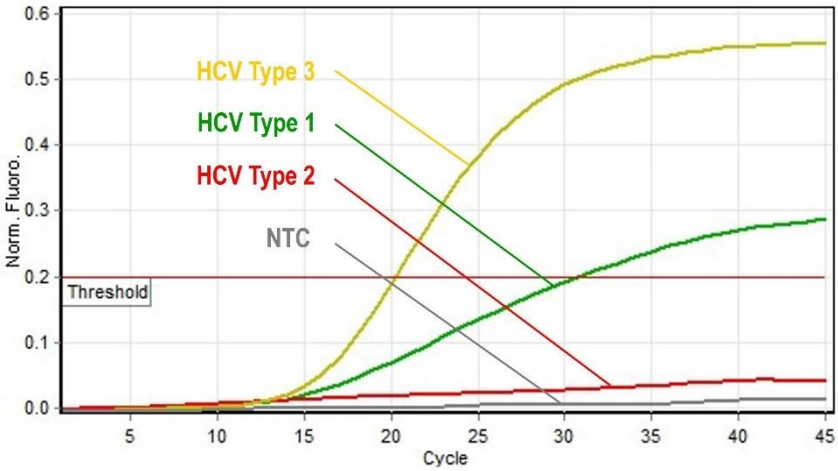
نتایج را با توجه به جدول ۱ تفسیر کنید:

FAM	HEX	CY5	Result
+	-	-	Pos: HCV Type 1
-	+	-	Pos: HCV Type 3
-	-	+	Pos: HCV Type 2
-	-	-	Neg for HCV or Pos for other types

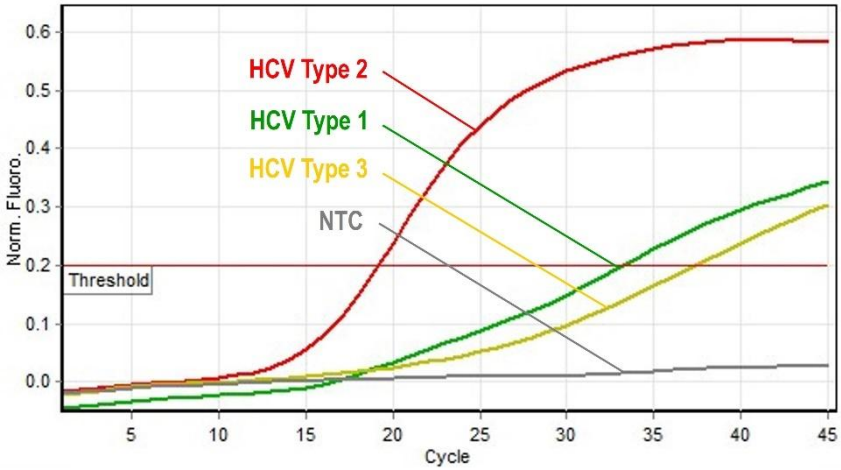
برای مشاهده گراف مورد انتظار شاهدهای مثبت و شاهد منفی، تصاویر یک، دو و سه را ملاحظه فرمایید.



شکل۱. منحنی کنترل های HCV در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل۲. منحنی کنترل های HCV در کانال زرد دستگاه روتورژن



شکل ۳. منحنی کنترل های HCV در کانال قرمز دستگاه روتورژن

۱۹. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده تایپ ۱ معادل شش واحد در میکرولیتر (IU/µl) می‌باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتر ویروس در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد و ژنوتایپ آن قابل تعیین می‌باشد. در صورت کاهش تیتر نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص و تعیین تایپ خواهد بود اما با ضریب اطمینانی به مراتب کمتر.

۲۰. 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.

۲۱. پشتیبانی فنی

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

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

۲۲. 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

۲۳. منابع

- Hnatyszyn, H.J., 2005. Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. Antiviral therapy, 10(1), pp.1-11.
- 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.
- Tan, S.-L., 2006. Hepatitis C viruses: Genomes and molecular biology. Wymondham, Norfolk, U.K.: Horizon Bioscience.

۲۴. توضیحات برچسب

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

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

HCV Genotype RG Kit Manual

Autumn 2025, Version 2.1

For Genotyping of Hepatitis C Virus (HCV)
With Real-Time RT-PCR
For use with Rotor-Gene
For Research Use Only

24 (Cat# HCVGenRG24)
48 (Cat# HCVGenRG48)
96 (Cat# HCVGenRG96)
NG-WI-ASL-03-201

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 4
5. Kit Contents 4
6. Packaging models 4
7. Storage and Stability 4
8. Product Use Limitations 5
9. Additionally Required Materials 5
10. General Precautions 5
11. Specimen, Storage and Transport 6
12. Interfering Substances 6
13. RNA Isolation 7
14. RT-PCR Protocol 7
15. Devices and software 7
16. Programming Rotor-Gene 7
17. Programming Other Machines 8
18. Data Analysis 9

19. Sensitivity 12
20. Disposal Method 12
21. Technical Support 12
22. Contact Information 13
23. References 13
24. Symbols 13

1. Introduction

HCV Genotype RG kit provides a ready-to-use Real-Time RT-polymerase chain reaction (PCR) test designed for genotyping of Hepatitis C virus RNA using Real-Time PCR (based on polymerase chain reaction) with Rotor-Gene. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit.
This kit is intended for Research Use Only!

2. Intended Use

HCV Genotype RG kit is intended for the genotyping of HCV type 1, 2 and 3 using Real-Time RT-PCR. Detection is achieved using Real-Time RT-PCR and is compatible with Rotor-Gene and MIC machines.

3. Background Information

Hepatitis C virus (HCV) is the major cause of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. So far 6 major genotypes and more than 80 subtypes have been identified.
Based on current clinical trials, pre-treatment viral load and HCV genotype are the two best indicators for medication choice as well as patient response to therapy. Therefore, once a patient tested positive for HCV, both viral load and genotype should be determined. Moreover, since HCV genotypes have significant differences in their global distribution and prevalence, genotyping can be a useful tool for epidemiologic studies.
The gold standard method for HCV genotyping is sequencing and phylogenetic studies. Since this method is not feasible for routine practice in a clinical laboratory, other methods have been used for this purpose which most of them are PCR-based.

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 Gen Mix	RT-PCR Mix*	300 µl
HCV-1	HCV Type 1 control	150 µl
HCV-2	HCV Type 2 control	150 µl
HCV-3	HCV Type 3 control	150 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 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

Note! This kit does not require cDNA synthesis reagents. They are already included in the Mix.

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 HCV Gen 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 kit components on crushed ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

11. Specimen, Storage and Transport

Proper samples to test for HCV Gen are whole blood and peripheral blood, which should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend EDTA or citrate plasma for HCV detection and genotyping. Whole blood or plasma should be shipped at +4°C. Upon receipt, plasma should be separated from whole blood, then stored at +4°C for a few 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. RNA Isolation

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

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

14. RT-PCR Protocol

Thaw kit reagents on crushed ice completely, followed by a brief mixing and a quick spin. **Pipette 12.5ul of HCV Gen Mix RG directly to each tube followed by adding 12.5ul of isolated RNA or Positive Ctrl or water.** Cap the tubes and visually inspect to make sure all are capped securely. Place the tubes in the machine.

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

15. Devices and software

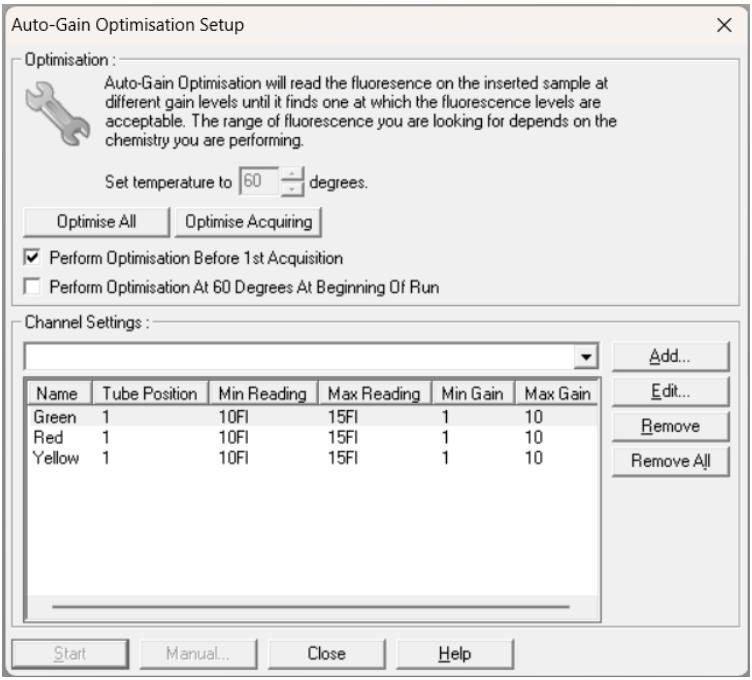
HCV Gen RG kit is designed to work with Rotor-Gene and MIC.

16. Programming Rotor-Gene

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

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



17. Programming Other Machines

HCV Gen RG kit is intended for use with the Rotor-Gene machine. 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**	10
	63°C x 15 sec	
	72°C x 15 sec	
4	**95°C x 15 sec**	45
	62°C x 15 sec	
	72°C x 15 sec	

Fluorescence should be collected at 62°C for FAM, VIC and Cy5 dyes. The Mix contains ROX with the final concentration of 30nM in reaction.

18. Data Analysis

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. Each of HCV genotypes generates a signal in a different channel: the **Green channel: Type 1, Red channel: Type 2** and the **Yellow channel: Type 3**.

Briefly, click on Analysis menu and then under Quantitation tab double click on “Cycling A. Green”. Close the pop-up window for Automatic Threshold and set threshold manually on 0.1 for the Green channel and 0.2 for the Yellow and Red channels. Figures 1, 2 and 3 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.

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** for **HCV Genotype 1** when it is positive in the **Green channel**.
- A sample is **Positive** for **HCV Genotype 2** when it is positive in the **Red channel.**
- A sample is **Positive** for **HCV Genotype 3** when it is positive in the **Yellow channel**.

If a sample is Negative in all three the Green, Yellow and Red channels, there are following possibilities:

- Sample is Negative for HCV.
- Sample is Positive for HCV genotypes 1, 2 or 3 but the viral load is lower than the kit sensitivity.
- Sample is Positive for HCV genotypes 4, 5 or 6.

Note! according to published studies, type 1 is the most prevalent type in Iran with type 3 as the second most prevalent type. Type 2 has also been reported. Types 4, 5 and 6 have not been reported from Iran yet.

The Interpretation of results is summarized in the following Table.

FAM	HEX	CY5	Result
+	-	-	Pos: HCV Type 1
-	+	-	Pos: HCV Type 3
-	-	+	Pos: HCV Type 2
-	-	-	Neg for HCV or Pos for other types

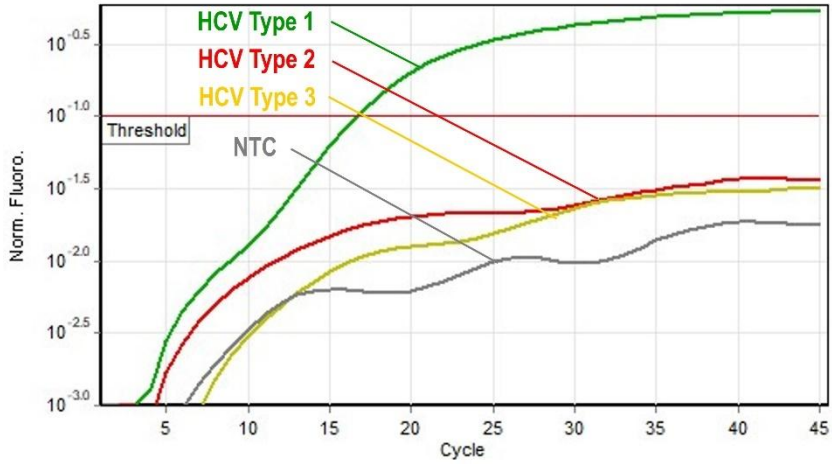


Fig 1. Typical HCV graph in Green channel for Rotor-Gene

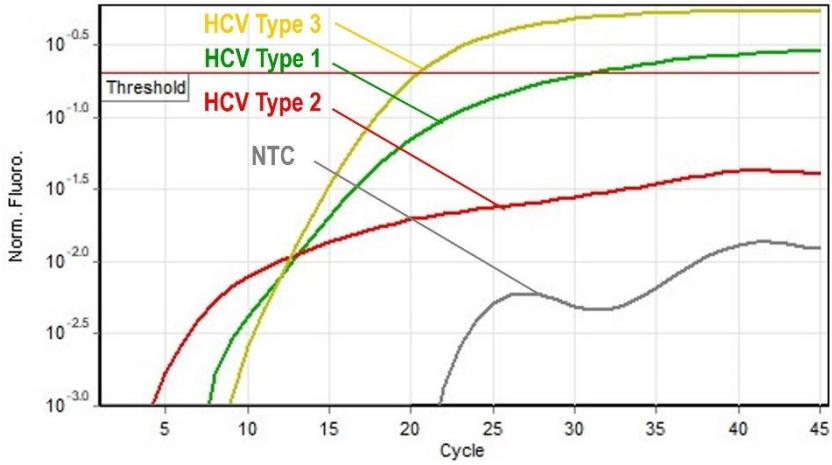


Fig 2. Typical HCV graph in Yellow channel for Rotor-Gene

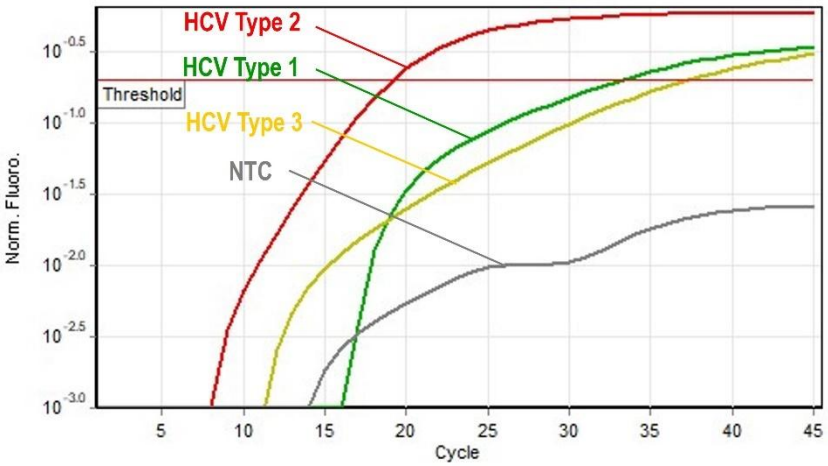


Fig 3. Typical HCV graph in Red channel for Rotor-Gene

19. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the cloned HCV genotype 1 sequence and showed a limit of detection equal to 6 IU/µl.

20. 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.

21. Technical Support

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

22. 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

23. References

- Hnatyszyn, H.J., 2005. Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. Antiviral therapy, 10(1), pp.1-11.
- 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.
- Tan, S.-L., 2006. Hepatitis C viruses: Genomes and molecular biology. Wymondham, Norfolk, U.K.: Horizon Bioscience.

24. Symbols

RUO	Research use only		Manufacturer		Consult instructions for use
LOT	Lot number	Σ	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