راهنمای کیت

HHV6 RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۱/۱

جهت تشخیص و کمیت سنجی DNA ویروس‌های HHV-6A و HHV-6B

به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

Σ 24 (Cat# HHV6RQ24)

Σ 48 (Cat# HHV6RQ48)

Σ 96 (Cat# HHV6RQ96)

NG-WI-ASL-38-101

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 اقدامات لازم..... ۶
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن..... ۷
۱۲. عوامل مزاحم..... ۷
۱۳. کنترل داخلی..... ۸
۱۴. استخراج DNA..... ۹
۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش..... ۹
۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها..... ۱۰
۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۱۰
۱۸. تنظیم دستگاه StepOne..... ۱۲

۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۱۲
۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene..... ۱۳
۲۱. آنالیز نتایج StepOne..... ۱۶
۲۲. محاسبه تیتر ویروس..... ۱۹
۲۳. محدوده خطی..... ۲۰
۲۴. میزان حساسیت..... ۲۰
۲۵. روش امحاء..... ۲۰
۲۶. پشتیبانی فنی..... ۲۰
۲۷. اطلاعات تماس..... ۲۱
۲۸. منابع..... ۲۱
۲۹. توضیحات برچسب..... ۲۲

۱. مقدمه

کیت HHV6 جهت تشخیص و تفکیک ویروس های HHV-6A و HHV-6B 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 HHV6 امکان بررسی نمونه بیمار را جهت تشخیص و تفکیک ویروس های HHV-6A و HHV-6B و همچنین تعیین تیتر آنها را با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند.

۳. اطلاعات زمینه ای

ویروس هرپس انسانی ۶ (human herepesvirus 6, HHV-6) از ویروس های خانواده هرپس ویریده (Herpesviridae) است و ژنوم آن از DNA دو رشته ای تشکیل شده است. این ویروس شامل دو گونه HHV-6A و HHV-6B می‌باشد که از نظر بیماریزایی با یکدیگر متفاوت می‌باشند. عفونت اولیه در سنین پایین و معمولا قبل از دوسالگی اتفاق می افتد و اغلب با تب و بثورات جلدی (roseola infantum) همراه 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 هر دو نوع ویروس وجود دارد گرچه احتمال بروز HHV-6B پس از

پیوند مغز استخوان یا پیوند عضو بیشتر است. همچنین هر دو ویروس با مشکلات سیستم عصبی از جمله مننژیت و آنسفالیت نیز مرتبط شده اند.

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 بر طرف می‌گردد.

۵. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
HHV6 Mix	میکس آماده برای PCR*	۳۶۰ میکرولیتر
HHV6 S1	استاندارد ۱: ده هزارکپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HHV6 S2	استاندارد ۲: یک هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HHV6 S3	استاندارد ۳: یک صدکپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HHV6 S4	استاندارد ۴: ده کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
Internal Ctrl	کنترل داخلی	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* یک، دو یا چهار عدد، 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 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 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 و لوازم و تجهیزات لازم برای استخراج
- 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.
- 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 روی یخ خرد شده خودداری کنید.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش با این کیت، خون کامل (whole blood) و خون محیطی (peripheral blood) یا پلاسمای حاصل از آن می‌باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می‌تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می‌توان تا ۴۸ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. پس از دریافت، نمونه را بایستی به حجم های کوچکتر تقسیم کرده و در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. نمونه خون یا پلاسما در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیتر ویروس در آن ثابت می‌ماند. حداقل نمونه لازم برای آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر می‌باشد.

۱۲. عوامل مزاحم

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

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

۱۳. کنترل داخلی

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

کنترل داخلی را می‌توانید در مرحله استخراج استفاده نموده یا آن را صرفاً در مرحله PCR به HHV6 Mix اضافه نمایید. در حالت اول، کنترل داخلی علاوه بر بررسی مهار واکنش، نشانگر کیفیت استخراج نیز می‌باشد. برای استفاده در مرحله استخراج، کنترل داخلی را پس از افزودن بافر lysis به نمونه، اضافه کنید. میزان مورد نیاز از کنترل داخلی ده درصد حجم حلال نهایی (elution buffer) می‌باشد. یعنی در صورتی که DNA را نهایتاً در ۱۰۰ میکرولیتر بافر حل می‌کنید، ۱۰ میکرولیتر از کنترل داخلی را به مخلوط نمونه و بافر Lysis اضافه نمایید. توجه داشته باشید که کنترل داخلی نباید مستقیماً به نمونه بیمار (یعنی پیش از افزودن بافر lysis) اضافه شود، زیرا کارآیی خود را از دست خواهد داد.

در صورتی که کنترل داخلی را به HHV6 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 HHV6 Mix اضافه نمایید. به طور مثال برای ۱۰ واکنش به ۱۵۰ میکرولیتر از میکس، ۱۰ میکرولیتر کنترل داخلی اضافه کنید و مخلوط حاصل را مطابق توضیحات بخش ۱۵ استفاده نمایید.

در صورت موفق بودن واکنش، کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۸ تا ۳۲ می‌شود.

۱۴. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه بیمار از روش‌ها و کیت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. کیت های زیر توصیه می شود:

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

تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، 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 HHV6 Mix اضافه کنید.

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به HHV6 Mix اضافه نمایید، مطابق توضیحات قسمت ۱۳ کنترل داخلی را به میکس افزوده و ۱۵ میکرولیتر از مخلوط حاصل را به هر لوله منتقل کنید.

در پایان ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده، استاندارد یا آب به هر لوله

اضافه کنید. درپوش 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 سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت HHV6 RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

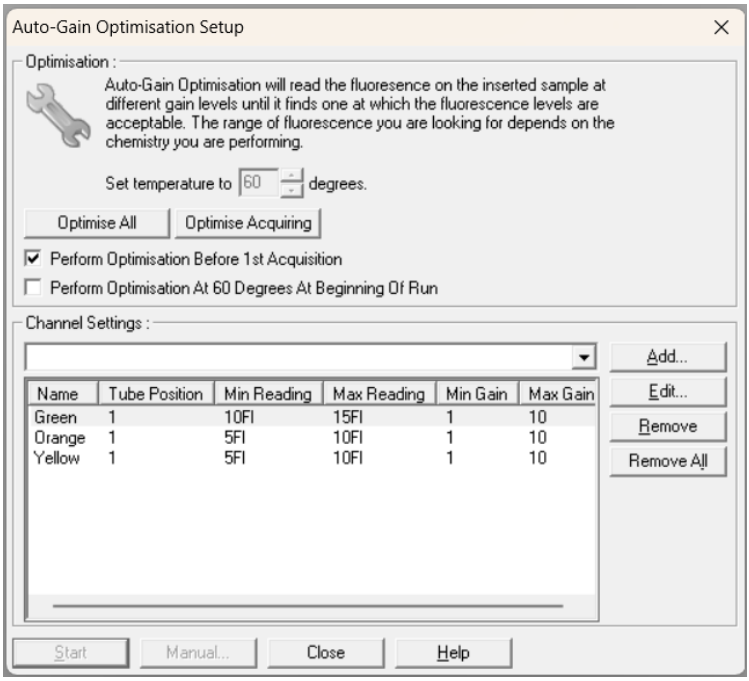
۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

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 HVV6 را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل HVV6 0.2 یا HHV6 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 دو کانال انجام دهید. Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس HHV6 باشد). گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را فعال کنید و پنجره را ببندید.



در منوی بالای صفحه روی دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) 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 استانداردها standard را انتخاب کنید. سپس غلظت استانداردها را در ستون سمت راست با عنوان given concentration وارد کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می توانید 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 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 اینکار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می توانید 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. به خاطر داشته باشید که میکس فاقد Rox به عنوان رنگ مرجع می باشد و این گزینه غیرفعال شده است. 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 زیر تنظیم نمایید:

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

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ‌های FAM و VIC و ROX تنظیم شود.

توجه داشته باشید که *HHV6 Mix* فاقد *ROX* به عنوان نرمال کننده است. لذا

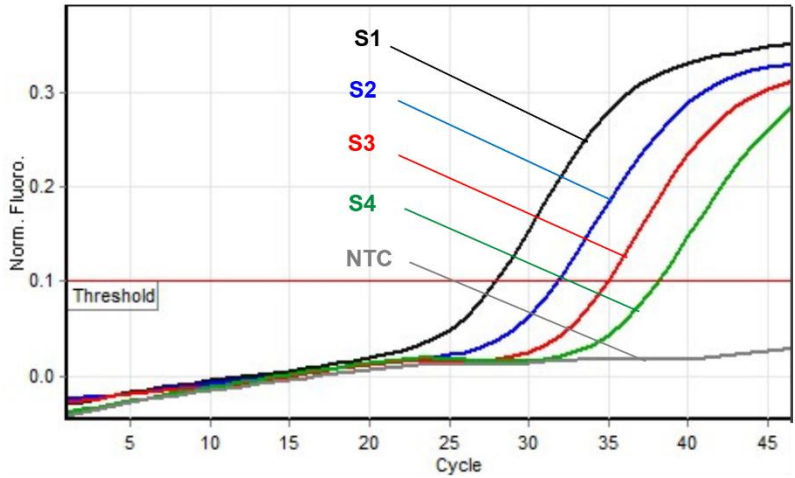
گزینه استفاده از این رنگ به عنوان نرمال کننده normalizer باید غیرفعال باشد.

۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene

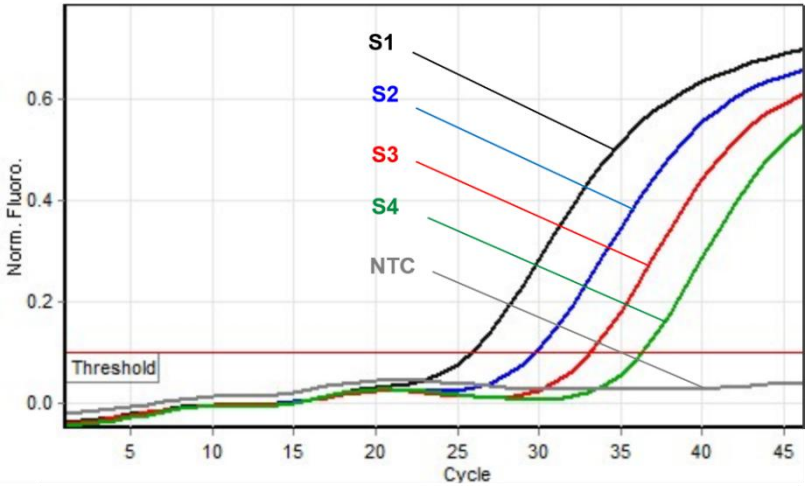
برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. و آستانه (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید. این مراحل را برای کانال‌های Orange و Yellow نیز تکرار کنید. برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر یک و دو و سه را ملاحظه فرمایید.

افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **HHV-6A**، **تابش نارنجی (Orange)** مربوط به **HHV-6B** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **کنترل داخلی** می‌باشد.

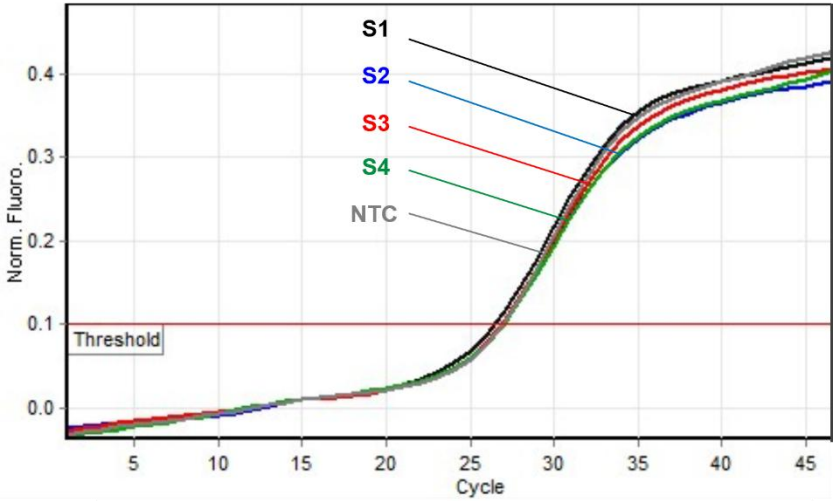
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می‌شود و CT آن در صورت وجود فاقد ارزش می‌باشد.



شکل ۱. منحنی استانداردهای HHV-6A در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل۲. منحنی استانداردهای HHV-6B در کانال نارنجی دستگاه روتورژن



شکل ۳. منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه روتورژن

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال سبز مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد می‌توان آن را برای HHV-6A **مثبت** تلقی نمود و تیتر محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که نمونه در کانال نارنجی مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد می‌توان آن را برای HHV-6B **مثبت** تلقی نمود و تیتر محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال های سبز و نارنجی منفی باشد ولی در کانال زرد مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۲ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.

- در صورتی که یک نمونه در کانال های FAM و ROX منفی باشد و در کانال زرد دارای CT بیشتر از ۳۵ باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و استخراج باید **تکرار** شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر سه کانال سبز، نارنجی و زرد منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

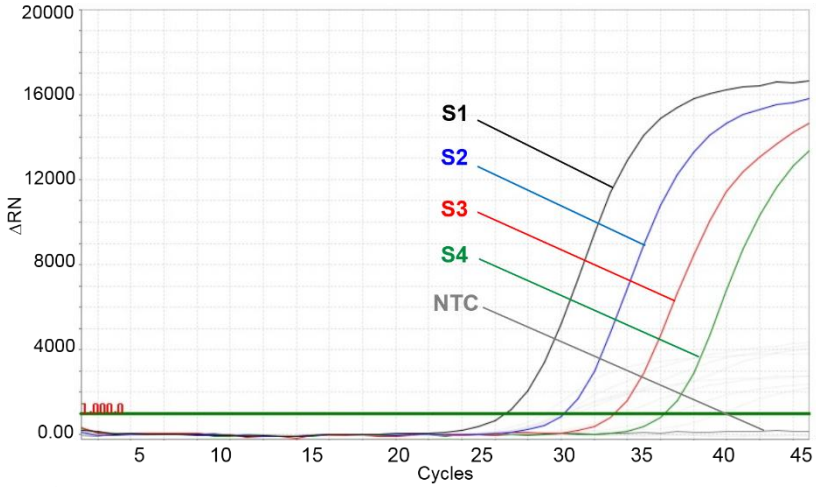
۲۱. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای FAM آستانه (threshold) را روی ۱۰۰۰ و برای ROX و VIC آستانه را روی ۵۰۰ قرار دهید.

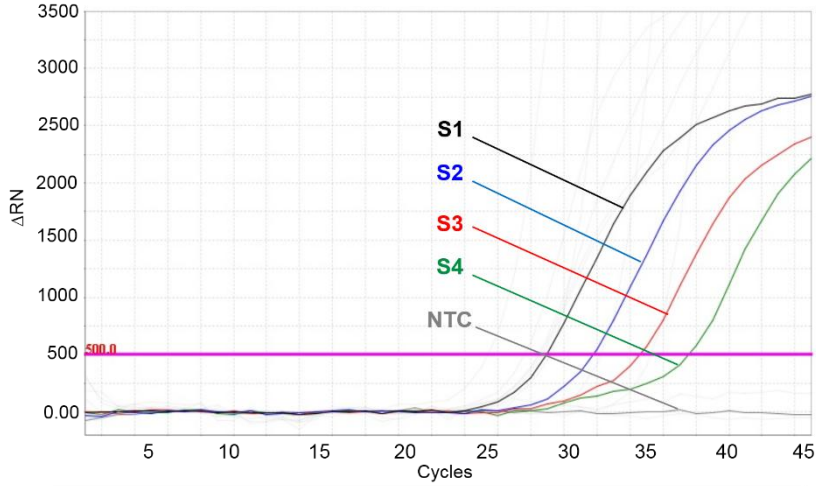
برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی وکنترل داخلی تصاویر چهار، پنج و شش را ملاحظه فرمایید.

افزایش **تابش FAM** مربوط به **HHV-6A** ، **تابش ROX** مربوط به **HHV-6B** و افزایش **تابش VIC** حاصل از **کنترل داخلی** می‌باشد.

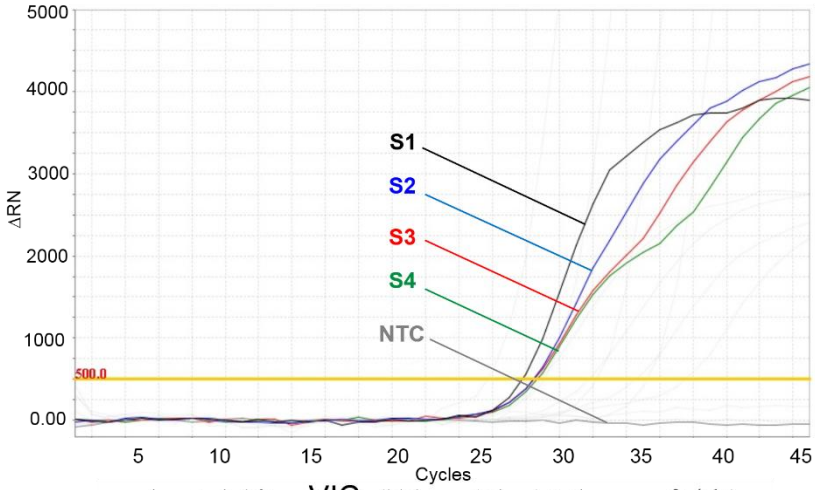
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می‌شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می‌شود و CT آن در صورت وجود، فاقد ارزش می‌باشد.



شکل۴. منحنی استانداردهای HHV-6A در کانال FAM دستگاه استپ وان



شکل۵. منحنی استانداردهای HHV-6B در کانال Rox دستگاه استپ وان



شکل۶. منحنی کنترل داخلی در کانال VIC دستگاه استپ وان

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال FAM مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال VIC می‌توان آن را برای HHV-6A **مثبت** تلقی نمود و تیتر محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که نمونه در کانال ROX مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال VIC می توان آن را برای HHV-6B **مثبت** تلقی نمود و تیتر محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال های FAM و ROX منفی باشد ولی در کانال VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۲ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.

- در صورتی که یک نمونه در کانال های FAM و ROX منفی باشد و در کانال زرد دارای CT بیشتر از ۳۵ باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و استخراج باید **تکرار** شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر سه کانال FAM، ROX و VIC منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

خلاصه تفسیر نتایج آزمایش را می‌توانید در جدول زیر مشاهده نمایید.

	Green/FAM	Yellow/VIC	Orange/ROX	Result
1	+	- / +	-	HHV-6A Pos
2	-	- / +	+	HHV-6B Pos
3	-	+ (CT 28-32)	-	HHV6 Neg
4	-	+ (CT > 35)	-	Invalid
5	-	-	-	Invalid

۲۲.محاسبه تیتر ویروس

هر کیت حاوی ۴ استاندارد کمّی 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 شده اند. برای تبدیل نتایج به صورت کپی در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده کنید:

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

به طور مثال چنانچه ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما استخراج و DNA حاصل در ۵۰ میکرولیتر بافر حل شود، نتایج باید در عدد ۲۵۰ ضرب شوند تا به 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 صد میلیون کپی در میکرولیتر تا ده 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 ده کپی در میکرولیتر می‌باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتر ویروس در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیتر نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

۲۵. روش امحاء

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

۲۶. پشتیبانی فنی

برای ارتباط با بخش پشتیبانی فنی می‌توانید با شماره تلفن یا آدرس ایمیل زیر

تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

۲۷. اطلاعات تماس

شرکت نوین ژن پارس ویرا

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

تلفن تماس:

۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com

وبسایت: www.novingene.com

۲۸. منابع

- Flamand, L., Lautenschlager, I., Krueger, G.R.F. and Ablashi, D.V. (2014). Human herpesviruses HHV-6A, HHV-6B & HHV-7 : diagnosis and clinical management. Amsterdam: Elsevier Science.
- Agut, H., Bonnafous, P. and Gautheret-Dejean, A., 2015. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. Clinical microbiology reviews, 28(2), pp.313-335.
- Komaroff, A.L., Pellett, P.E. and Jacobson, S., 2020. Human herpesviruses 6a and 6b in brain diseases: Association versus causation. Clinical microbiology reviews, 34(1), pp.10-1128.

- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212.

۲۹. 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.ir مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.

HHV6 RQ
Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.1

For Real-Time PCR Detection and Quantitation of
HHV-6A and HHV-6B DNA
For Research Use Only

24 (Cat# HHV6RQ24)
48 (Cat# HHV6RQ48)
96 (Cat# HHV6RQ96)
NG-WI-ASL-38-101

RUO

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

Novin Gene

Table of Contents

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

20. Data Analysis: Rotor-Gene 13
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 17
28. References 17
29. Symbols 18

1. Introduction

HHV6 RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting and quantifying HHV-6A and HHV-6B 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

HHV6 RQ kit is intended for detecting and quantifying HHV-6A and HHV-6B viruses. Detection is achieved using Real-Time PCR.

3. Background Information

Human Herpesvirus 6 (HHV-6) is a double-stranded DNA virus and a member of the Herpesviridae family. It comprises two distinct herpesvirus species of HHV-6A and HHV-6B. Primary infection occurs mostly in early childhood followed by a life-long latent infection. While both viruses may get re-activated later, HHV-6B is more prone to it especially in post-transplant patients. Both viruses have also been related to nervous system complications including meningitis and encephalitis.

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
HHV6 Mix	PCR mix*	360 µl
HHV6 S1	Standard 1: 10,000 copies/µl	150 µl
HHV6 S2	Standard 2: 1,000 copies/µl	150 µl
HHV6 S3	Standard 3: 100 copies/µl	150 µl
HHV6 S4	Standard 4: 10 copies/µl	150 µl
Internal Ctrl	Internal Control	250ul
Water	PCR Grade Water	200 µl

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

6. Packaging models

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

7. Storage and Stability

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

8. Product Use Limitations

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

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

9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

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

10. General Precautions

To prevent false results, always pay attention to the following points:

- Treat all samples as potentially infectious.
- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the PCR mix is aliquoted into tubes, and c) Reaction preparation area for addition of extracted DNA to the tubes.

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

11. Specimen, Storage and Transport

Proper samples to test for HHV6 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. Sample can be stored at +4°C for 48 hours or aliquoted and stored at -20°C for up to a few weeks.

12. Interfering Substances

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

13. Internal Control (IC)

To assess the possibility of DNA extraction failure and PCR inhibition, and to prevent false negative results, the HHV6 RQ kit contains an internal control (IC). This IC can be used during the extraction process or added directly to the HHV6 Mix. To monitor both DNA extraction and PCR reaction, the IC should be added to the mixture of lysis buffer and the patient sample during extraction. The required volume of IC is 10% of the elution buffer. For instance,

if the extracted DNA is eluted with 100ul, then 10ul of IC should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample.
Please note that the IC should not be added directly to the patient sample (i.e, before the addition of lysis buffer) as it loses its efficiency.
If the IC is added to HHV6 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 PCR 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/VIC Channel.

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 15ul of HHV6 Mix to each PCR tube.

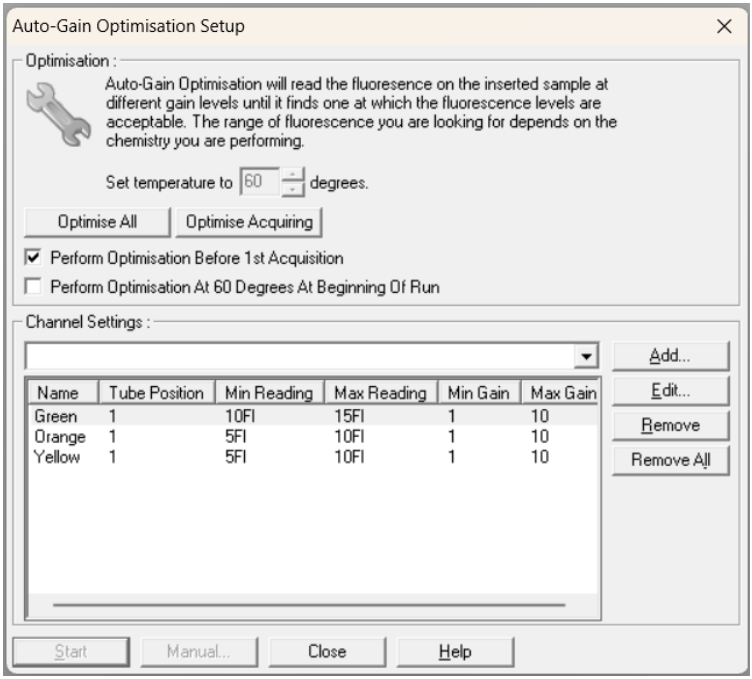
If the IC is added to the HHV6 Mix, add 15ul of the prepared Mix (as described in section 13) to each PCR tube.
Then add 10ul of standard, isolated DNA or water to each tube.
Cap the tubes and visually inspect to make ensure all are capped securely. Place the tubes in the machine.
Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.
Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

16. Devices and software

HHV6 RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, MIC and StepOne.

17. Programming Rotor-Gene

Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!
Open the flash card provided in the kit and double-click on HHV6 0.1 or HHV6 0.2 template depending on used tubes. Program starts.
Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation. Adjust the setting according to the below image. Make sure to set the Tube Position to number 1 for all channels (note that Tube number 1 should contain HHV6 Mix).
Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the program on the desired location.



18. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set-Up menu, click Template (provided in the flash card, or accessible by kit QR code). Click on Plate Setup. One negative control, 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. Please note that Herpes Mix does not contain ROX dye as a normalizer. 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, VIC and ROX dyes. *Please note that Herpes Mix does not contain ROX dye as a normalizer!*

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 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.

Perform quantitative analysis for the **HHV-6A (Green channel),** the **HHV-6B (Orange channel)** and qualitative analysis for the **Internal Control (Yellow channel)**. Briefly, click on Analysis menu and then under Quantitation tab double-click on Cycling A. Green and set the threshold on 0.1. Repeat above for the Orange and Yellow 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.**

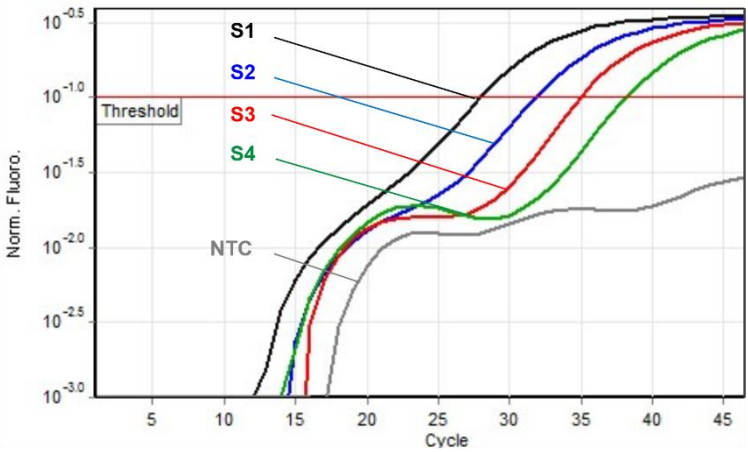


Fig 1. Typical HHV-6A graph in Green channel for Rotor-Gene

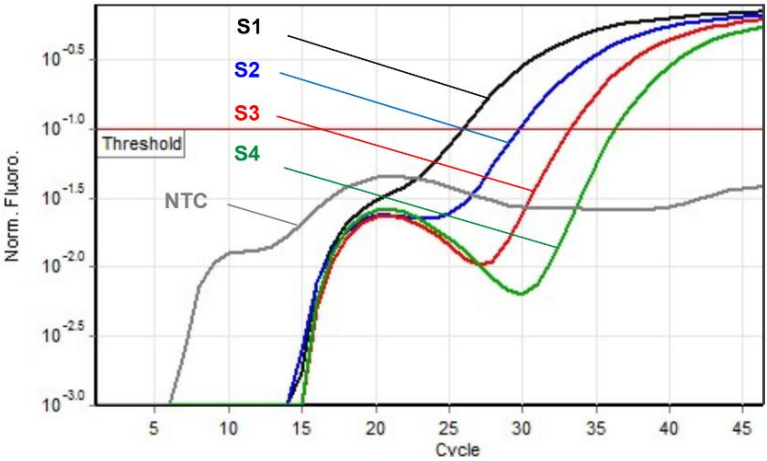


Fig 2. Typical HHV-6B graph in Orange channel for Rotor-Gene

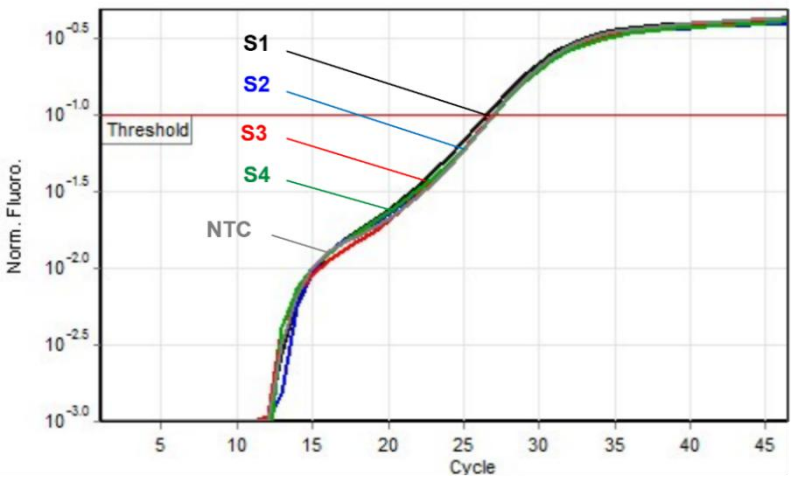


Fig 3. Typical IC graph in Yellow channel for Rotor-Gene

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** for HHV-6A 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 **Positive** for HHV-6B if it is positive in the Orange channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results in the Cycling A. Orange are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in the Green and Orange channels while it is positive in the Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 28-32.
- Results are **Invalid** and DNA isolation should be repeated if a sample is negative in the FAM and ROX with CT of higher than 35 in the VIC channels.

- Results are **Invalid** and the test should be repeated if a sample is negative in all the green, orange and yellow channels.

21. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to StepOne Manual. Briefly, click on Analyze and set the threshold for the FAM at 1000 and at 500 for the ROX and the VIC. Figures 4, 5 and 6 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.

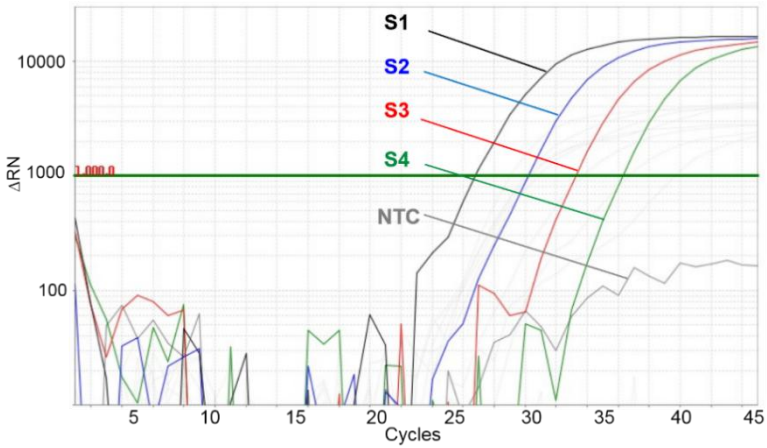


Fig 4. Typical HHV-6A graph in FAM channel for StepOne

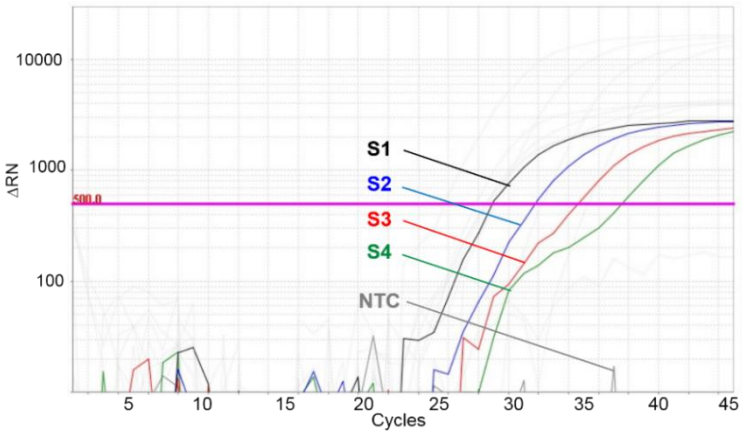


Fig 5. Typical HHV-6B graph in ROX Channel for StepOne

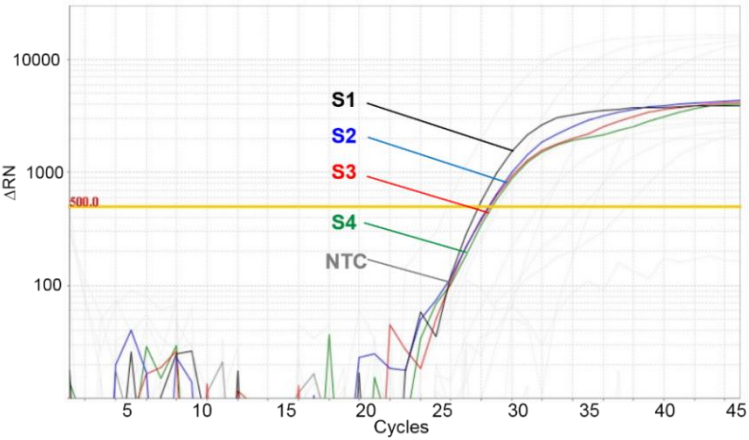


Fig 6. Typical IC graph in VIC channel for StepOne

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** for HHV-6A if it is positive in the FAM channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results are valid.
- A sample is **Positive** for HHV-6B if it is positive in the ROX 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 and ROX channels while it is positive in the VIC channel with a sigmoid graph and CT of 28-32.
- Results are **Invalid** and DNA isolation should be repeated if a sample is negative in the FAM and ROX with CT of higher than 35 in VIC channels.
- Results are **Invalid** and the test should be repeated if a sample is negative in all the FAM, ROX and VIC channels.

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

	Green/FAM	Yellow/VIC	Orange/ROX	Result
1	+	- / +	-	HHV-6A Pos
2	-	- / +	+	HHV-6B Pos
3	-	+ (CT 28-32)	-	HHV6 Neg
4	-	+ (CT > 35)	-	Invalid
5	-	-	-	Invalid

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 the 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/µl. To convert the result to copy/ml the following equation should be used:

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

"Sample volume" is the 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 100,000,000 copies/µl to 10 copies/µl.

24. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with a cloned target and showed a limit of detection equal to 10 copy/µl.

25. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special method of disposal and can be directly discarded. But infectious laboratory specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

26. Technical Support

For technical support, contact us via

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

27. Contact Information

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

28. References

- Agut, H., Bonnafous, P. and Gautheret-Dejean, A., 2015. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. Clinical microbiology reviews, 28(2), pp.313-335.
- Flamand, L., Lautenschlager, I., Krueger, G. and Ablashi, D. eds., 2014. Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B and HHV-7: diagnosis and clinical management. Elsevier.
- Komaroff, A.L., Pellett, P.E. and Jacobson, S., 2020. Human herpesviruses 6a and 6b in brain diseases: Association versus causation. Clinical microbiology reviews, 34(1), pp.10-1128.
- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212.

29. Symbols

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

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