راهنمای کیت HSV Typ RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۳/۰

جهت تشخیص و تعیین تایپ ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ و ۲
به روش Real-Time PCR
مخصوص تحقیقات

24 (Cat# HSVTypRQ24)
48 (Cat# HSVTypRQ48)
96 (Cat# HSVTypRQ96)
NG-WI-ASL-07-300

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..... ۵
۶. مدل های بسته بندی..... ۵
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت..... ۵
۸. محدودیت کاربرد..... ۶
۹. سایر موارد مورد نیاز..... ۶
۱۰. احتیاط و نکات لازم..... ۷
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن..... ۷
۱۲. کنترل داخلی..... ۸
۱۳. استخراج DNA..... ۹
۱۴. دستورکار PCR و مراحل آزمایش..... ۹
۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها..... ۱۰
۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۱۰
۱۷. تنظیم دستگاه StepOne..... ۱۲
۱۸. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۱۲

۱۹. آنالیز نتایج Rotor-Gene ۱۳
۲۰. آنالیز نتایج StepOne ۱۵
۲۱. میزان حساسیت ۱۸
۲۲. روش امحاء ۱۸
۲۳. پشتیبانی فنی ۱۹
۲۴. اطلاعات تماس ۱۹
۲۵. منابع ۱۹
۲۶. توضیحات برچسب ۲۰

۱. مقدمه

کیت HSV Typ RQ جهت تشخیص و تعیین تایپ ویروس هرپس سیمپلکس 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 HSV Typ RQ امکان بررسی نمونه بیمار را جهت تشخیص و تعیین تایپ DNA ویروس هرپس سیمپلکس تایپ ۱ و ۲ با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت برای استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

ویروس هرپس انسانی یک و دو (Human Herpes Virus) معروف به ویروس هرپس سیمپلکس تایپ ۱ و ۲ (Herpes Simplex Virus/HSV) از ویروس‌های خانواده هرپس ویریده (Herpesviridae) می‌باشد. این ویروس دارای غشای خارجی بوده و ژنوم آن از DNA دو رشته ای به طول حدود یکصد و پنجاه هزار جفت باز تشکیل شده است. این ویروس تقریبا در همه‌جا حضور دارد و عامل عفونت‌های بسیار متنوعی است که معمولاً در بزرگسالان فاقد علائم بالینی واضح می‌باشد. با این وجود، این ویروس شایع ترین عامل انسفالیت ویروسی بوده و عفونت تناسلی با این ویروس نیز جزء متداول ترین بیماری های آمیزشی می‌باشد.

علایم بالینی عفونت با ویروس هرپس تایپ یک و دو معمولا شبیه هم می‌باشند، اما پیامد عفونت یعنی شدت آن و میزان تلفات، پاسخ به درمان، مقاومت دارویی و نیز احتمال فعال شدن مجدد این دو ویروس با یکدیگر متفاوت می‌باشد. لذا تشخیص تایپ ویروس از جنبه بالینی دارای اهمیت زیادی می‌باشد.

به طور معمول ویروس هرپس تایپ یک را بیشتر عامل عفونت های ناحیه دهانی و تایپ دو را عامل عفونت های ناحیه تناسلی می دانند. اما این دسته بندی دقیق نیست، چرا که هر دو ویروس می‌توانند عامل عفونت های پوستی، مخاطی و احشایی باشند. همچنین عامل عمده عفونت های تناسلی هرپس در کشورهای توسعه یافته نیز تایپ یک این ویروس می باشد. لذا با توجه به موارد بالا امکان تشخیص تایپ ویروس بر اساس علایم بالینی وجود ندارد و نیازمند روش‌های آزمایشگاهی است. همچنین باید توجه داشت که در موارد انسفالیت ویروسی تشخیص سریع ویروس هرپس سیمپلکس برای مدیریت بیماری و شروع به موقع درمان و کاهش تلفات الزامی بوده و این مورد وابسته به تشخیص آزمایشگاهی است.

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 برطرف می‌شود.

۵. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
HSV Typ Mix	میکس آماده برای PCR *	۳۶۰ میکرولیتر
HSV-1 Ctrl	شاهد مثبت ویروس هرپس تایپ یک	۱۵۰ میکرولیتر
HSV-2 Ctrl	شاهد مثبت ویروس هرپس تایپ دو	۱۵۰ میکرولیتر
Internal Control	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
- 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 ها) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود داشته باشند بویژه سمپلر. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.
- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- پیش از باز کردن درب لوله های درون کیت، آنها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا کاملا ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ‌های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای بررسی عفونت ویروس هرپس سیمپلکس با این کیت، مایع مغزی نخاعی (CSF) و یا سواب زخم ناحیه تناسلی می‌باشد که به صورت استریل

جمع آوری شده است. نمونه را می‌توان تا ۴۸ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. برای نگهداری نمونه بیش از سه روز بهتر است آن را در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. نمونه در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیتر ویروس در آن ثابت می‌ماند.

۱۲. 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 HSV Typ 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 HSV Typ 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 HSV Typ 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 ۱۴ استفاده نمایید.

در صورت موفق بودن واکنش، کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش نارنجی (ROX/Orange) و CT بین ۲۶ تا ۳۴ می شود.

۱۳. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه روش‌ها و کیت های مختلفی را می‌توان استفاده نمود. استفاده از کیت های زیر توصیه می‌شود:

- 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)

در صورتی که تمایل دارید استخراج DNA از نمونه را با استفاده از کنترل داخلی بررسی نمایید، به توضیحات مربوط در قسمت ۱۲ (کنترل داخلی) مراجعه کنید.

۱۴. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا به طور کامل محتویات آن ها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آن ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک آلومینیوم سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، سه لوله برای کنترل های مثبت و منفی نیز در نظر بگیرید.

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

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به HSV Typ Mix اضافه نمایید، مطابق توضیحات قسمت ۱۲ 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، شاهد یا آب به هر لوله اضافه کنید.

درپوش تیوب‌ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه *StepOne* میکروتیوب‌ها 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.

۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها

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

۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

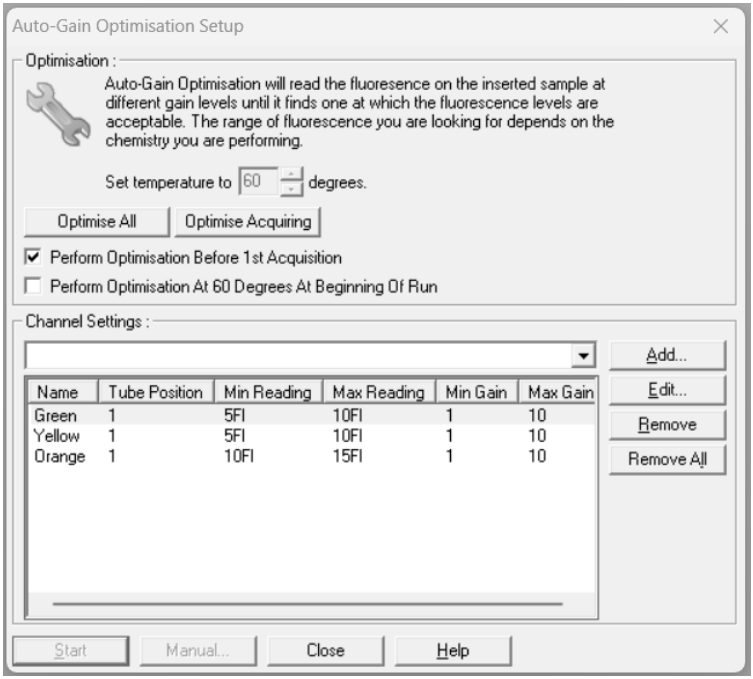
ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

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 HSV Typ را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل HSV Typ 0.2 یا HSV Typ 0.1 را با توجه به نوع لوله استفاده شده انتخاب کنید.

نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منوی نرم افزار، گزینه View، سپس Gain Optimisation را انتخاب کنید. در پنجره باز شده در Auto-Gain

Optimisation Setup ابتدا گزینه Optimise Acquiring را بزنید. تنظیمات را دقیقا مطابق تصویر زیر برای هر سه کانال انجام دهید. Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس HSV Typ باشد). گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را فعال کنید و پنجره را ببندید.



در منوی بالای صفحه، دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را ذخیره کنید (save) تا دستگاه روشن شود.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای شاهدها Positive Control و

برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۷. 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 دکمه AssignTargets and Samples را انتخاب کنید. شاهدهای مثبت و منفی به همراه چند نمونه از پیش تعریف شده اند. آن‌ها را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای این‌کار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می‌توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز می توانید اضافه کنید و نام نمونه ها را 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.

توجه داشته باشید که در این آزمایش *ROX* نباید به عنوان رنگ مرجع *(reference dye)* انتخاب شود.

۱۸. تنظیم سایر دستگاه ها

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

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 40 sec	

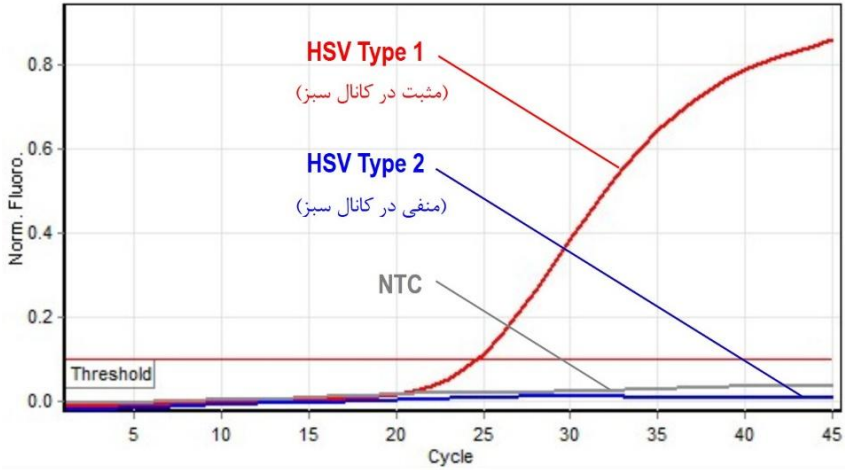
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM، VIC و ROX تنظیم شود.

توجه داشته باشید که در این آزمایش ROX نباید به عنوان رنگ مرجع (reference dye) انتخاب شود.

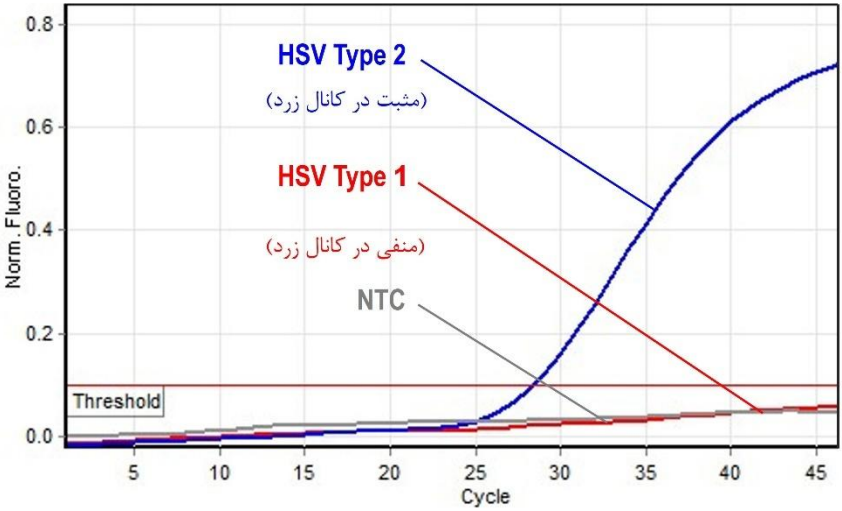
۱۹. آنالیز نتایج Rotor-Gene

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. آستانه (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید. برای کانال‌های Yellow و Orange نیز آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید.

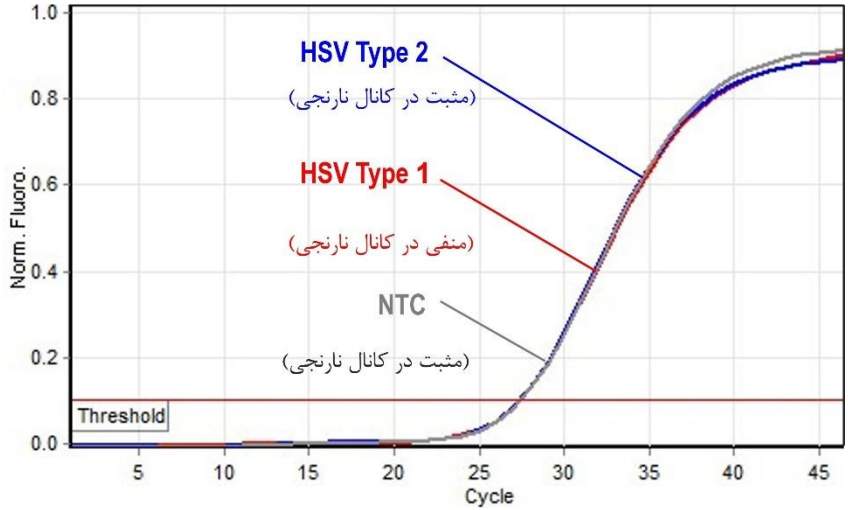
برای مشاهده گراف مورد انتظار شاهدهای مثبت و منفی و کنترل داخلی به تصاویر یک تا سه مراجعه کنید. توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **HSV-1** و **تابش زرد (Yellow)** مربوط به **HSV-2** و **تابش نارنجی (ROX)** حاصل از **کنترل داخلی** می‌باشد.



شکل۱. منحنی کنترل های HSV در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل۲. منحنی کنترل های HSV در کانال زرد دستگاه روتورژن



شکل۳. منحنی کنترل های HSV در کانال نارنجی 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 می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می‌شود 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 CT کمتر از ۴۰ باشد، **مثبت** و دارای **HSV-1** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در کانال زرد مثبت و CT کمتر از ۴۰ باشد، **مثبت** و دارای **HSV-2** می‌باشد.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال سبز و زرد منفی باشد و در کانال نارنجی دارای منحنی سیگموییدو و CT بین ۲۶ تا ۳۴ باشد، نمونه **منفی** و فاقد ویروس **HSV** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر سه کانال سبز، زرد و نارنجی فاقد منحنی سیگموییدو باشد، آزمایش نامعتبر بوده و باید **تکرار** شود.

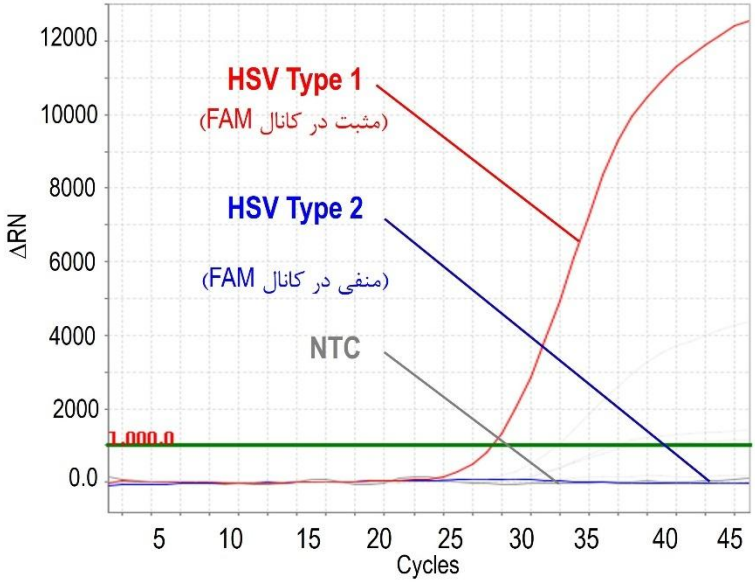
خلاصه تفسیر نتایج در جدول صفحه ۱۸ آمده است.

۲۰. آنالیز نتایج StepOne

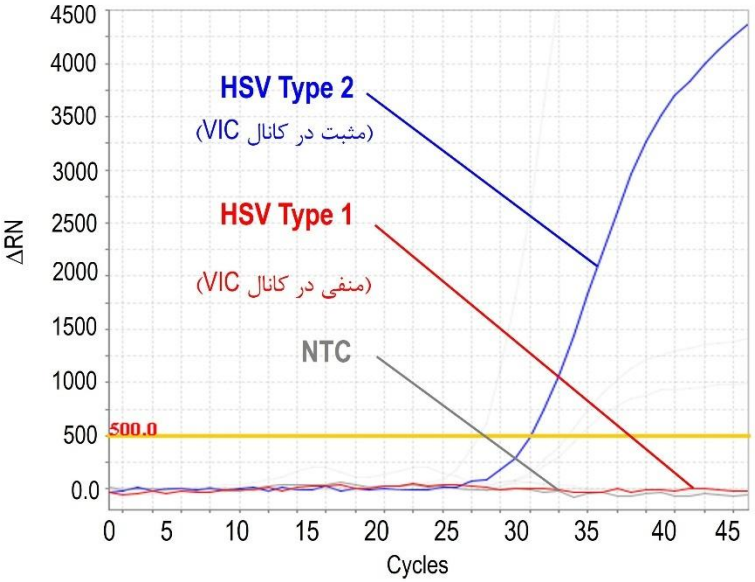
برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای FAM آستانه (threshold) را روی ۱۰۰۰ و برای VIC روی ۵۰۰ و برای ROX آستانه را روی ۲۰۰ قرار دهید.

برای مشاهده گراف مورد انتظار شاهدهای مثبت و منفی و کنترل داخلی به تصاویر چهار تا شش را مراجعه کنید.

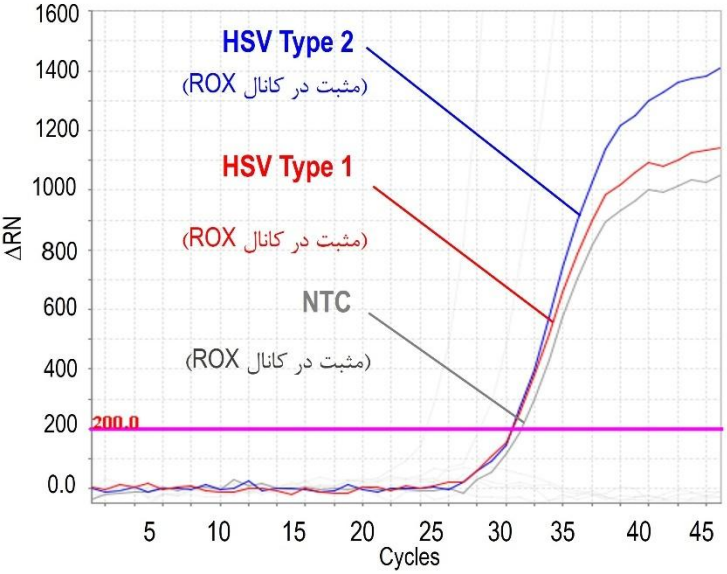
توجه داشته باشید که افزایش **تابش FAM** مربوط به **HSV-1**، **تابش VIC** مربوط به **HSV-2** و تابش **ROX** حاصل از **کنترل داخلی** می‌باشد.



شکل۴. منحنی کنترل های HSV در کانال FAM دستگاه StepOne



شکل۵. منحنی کنترل های HSV در کانال VIC دستگاه StepOne



شکل۶. منحنی کنترل های HSV در کانال ROX دستگاه StepOne

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود 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 FAM مثبت و CT کمتر از ۴۰ باشد، نمونه مثبت و دارای **HSV-1** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در کانال VIC مثبت و CT کمتر از ۴۰ باشد، نمونه مثبت و دارای **HSV-2** می‌باشد.

- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال FAM و VIC منفی باشد و در کانال ROX مثبت و دارای CT بین ۲۶ تا ۳۴ باشد، نمونه منفی و فاقد **HSV** در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر سه کانال FAM، VIC و ROX فاقد منحنی سیگموید باشد، آزمایش نامعتبر بوده و باید **تکرار** شود.

نتایج بالا به طور خلاصه در جدول زیر نشان داده شده است:

Green/FAM	Yellow/VIC	ROX	Result
+ (CT<40)	-	+/-	HSV Typ I
-	+ (CT<40)	+/-	HSV Typ II
-	-	+ (CT 26-34)	HSV Neg
-	-	-	Invalid
-	-	+ (CT>34)	Invalid

۲۱. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از توالی هدف حاوی بخشی از ژنوم ویروس بررسی شده است و معادل نیم کپی در میکرولیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتر ویروس در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیتر نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

۲۲. 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.

۲۳. پشتیبانی فنی

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

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

۲۴. 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

۲۵. منابع

- Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P.S., Roizman, B., Whitley, R. and Yamanishi, K. eds., 2007. Human herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis.
- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3),pp.190-212.
- Thomasini, R.L. ed., 2020. Human Herpesvirus Infection: Biological Features, Transmission, Symptoms, Diagnosis and Treatment. BoD–Books on Demand.

- Whitley, R.J., 2015. Herpes simplex virus infections of the central nervous system. CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology, 21(6), pp.1704-1713.
- Widener, R.W. and Whitley, R.J., 2014. Herpes simplex virus. In Handbook of clinical neurology (Vol. 123, pp. 251-263). Elsevier.

۲۶. 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.

HSV Typ RQ
Kit Manual

Autumn 2025, Version 3.0

For Real-Time PCR Detection and Differentiation of Herpes Simplex Type 1 and 2
For Research Use Only

Σ 24 (Cat# HSVTypRQ24)
Σ 48 (Cat# HSVTypRQ48)
Σ 96 (Cat# HSVTypRQ96)
NG-WI-ASL-07-300

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 5
8. Product Use Limitations 5
9. Additionally Required Materials 5
10. General Precautions 6
11. Specimen, storage and transport 6
12. Internal control 6
13. DNA isolation 7
14. PCR Protocol 7
15. Devices and software 8
16. Programming Rotor-Gene 8
17. Programming StepOne 9
18. Programming Other Machines 10
19. Data Analysis: Rotor-Gene 10

20. Data Analysis: StepOne 12
21. Sensitivity 15
22. Disposal Method 15
23. Technical Support 15
24. Contact Information 15
25. References 16
26. Symbols 16

1. Introduction

HSV Typ RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting and differentiating Herpes Simplex Type 1 and 2 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

HSV Typ RQ kit is intended for the detecting and typing of HSV-1 and HSV-2 DNA. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene, StepOne and MIC machines.

3. Background Information

Human Herpes Virus type 1 and 2 (HHV-1, HHV-2) known as Herpes simplex virus 1 and 2 (HSV-1, HSV-2) are large, enveloped DNA viruses with a genome of about 150 kbp double stranded DNA. HSV is a ubiquitous agent and can cause a variety of infections. Although most HSV infections in adults are usually benign, yet HSV is the most common cause of viral encephalitis and genital herpes is one of the most prevalent sexually transmitted diseases (STDs).
Despite overlapping clinical manifestations, HSV-1 and HSV-2 infections are different regarding the severity and outcome, mortality, frequency of reactivation, response to medication, and drug resistance. Therefore, defining the type is clinically important and routinely recommended.

Classically HSV-1 and HSV-2 infections are associated with oral or genital diseases, respectively. However, the differentiation of HSV-1 from HSV-2 based on anatomical site of infection is far from absolute and both HSV-1 and -2 can be isolated from skin, mucosa, and visceral organs. Also, HSV-1 has become the predominant cause of genital ulcers in some developed countries. Therefore, HSV1 and HSV-2 detection and typing based on clinical symptoms is not reliable and requires laboratory tests.
Also, in case of viral encephalitis, prompt laboratory diagnosis of HSV infection is essential for patient management and possible initiation of antiviral therapy and reducing the mortality rate.

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
HSV Typ Mix	PCR mix*	360 µl
HSV-1 Ctrl	HSV-1 Positive Control	150 µl
HSV-2 Ctrl	HSV-2 Positive Control	150 µl
Internal Control	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 strictly be followed, and any modification will invalidate the results.
- The kit and its contents should not be used past the expiration date on the package.
- The kit and its contents should not be used if there is any sign of pink or red color on the Warm Mark label.
- This kit is for Research use only and is not validated for IVD (in vitro diagnostics) applications.

9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and the accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease-free filtered tips
- 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 master-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 cold blocks instead.

11. Specimen, storage and transport

CSF or swab of the genital lesions should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. Samples should be shipped at +4°C. Upon receipt sample can be stored at +4°C for 48 hours or stored at -20°C for up to a few weeks.

12. Internal control

To assess the possibility of DNA extraction failure and PCR inhibition, and to prevent false negative results, the HSV Type RQ kit contains an internal control (IC). This IC can be used during the extraction process or added directly to the HSV Typ 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 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 HSV Typ 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, HSV Typ Mix before it is added to the tubes. In a successful DNA extraction and PCR test, the IC should generate a CT of 26-34 in the Rox/Orange Channel.

13. 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).

To monitor DNA extraction process, internal control should be applied to the extraction process. For more details, please, refer to section 12 of this handbook.

14. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely, followed by a brief mixing and a quick spin. Place the required number of tubes on a cold block. Consider one tube for each sample plus two for Positive controls and one for the Negative control.

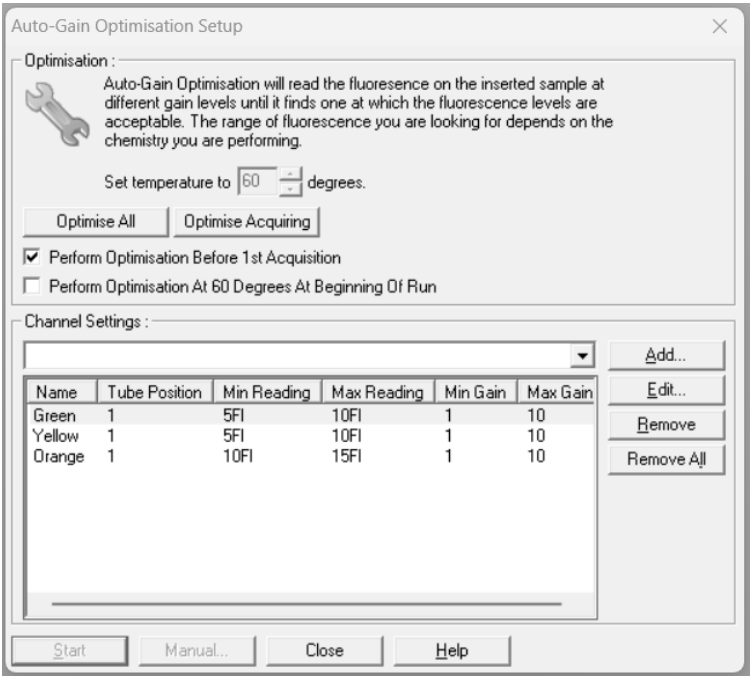
If the IC is introduced during the extraction process, pipette 15µl of HSV Typ Mix to each PCR tube.
If the IC is added to the HSV Type Mix, add 15ul of the prepared mix (as described in section 12) to each PCR tube.
Then add 10ul of extracted DNA, Controls, or water to each tube.
Cap the tubes and visually 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.

15. Devices and software

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

16. Programming Rotor-Gene

Before you start the machine make sure you have attached the locking ring on the rotor!
Open the HSV Typ template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); HSV Typ 0.1 is for strip tubes and HSV Typ 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 HSV Typ 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 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, and two positive controls, 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.

Note! ROX should not be selected as reference dye in this test.

18. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 40 sec	

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

Note! ROX should not be selected as reference dye in this test.

19. Data Analysis: Rotor-Gene

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

Analyze the data according to Rotor-Gene manual. Perform qualitative analysis for **HSV-1** on the **Green channel**, **HSV-2** on the **Yellow channel** and for **Internal Control** on the **Orange channel**. Briefly, click on Analysis menu and then under Quantitation tab double click on Cycling A. Green. Set the threshold at 0.1. Repeat the above for Cycling A. Yellow and Orange. 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.

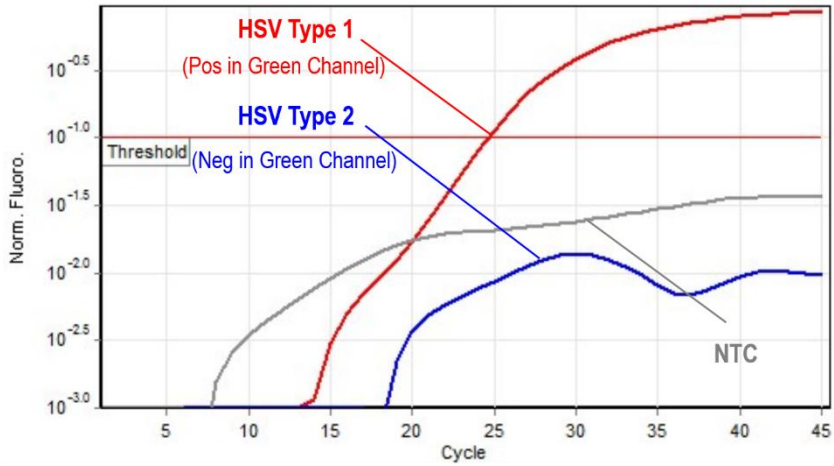


Fig 1. Typical HSV controls graph in Green channel for Rotor-Gene

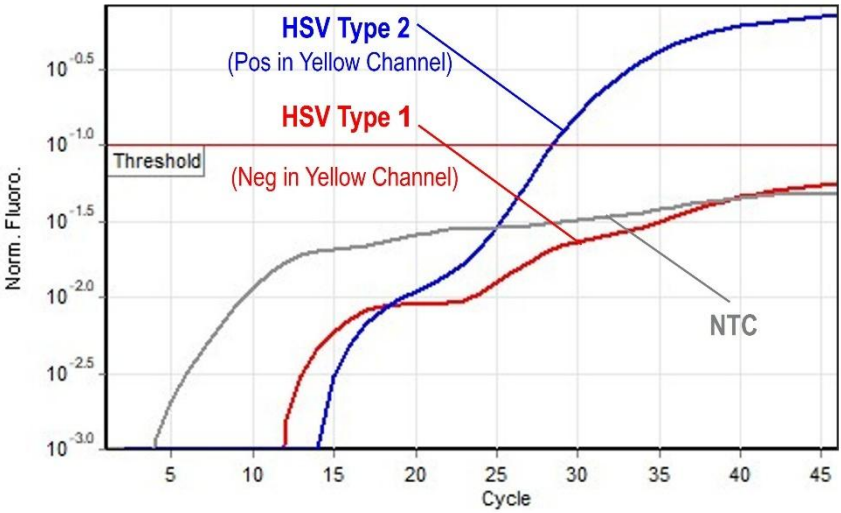


Fig 2. Typical HSV Controls graph in Yellow channel for Rotor-Gene

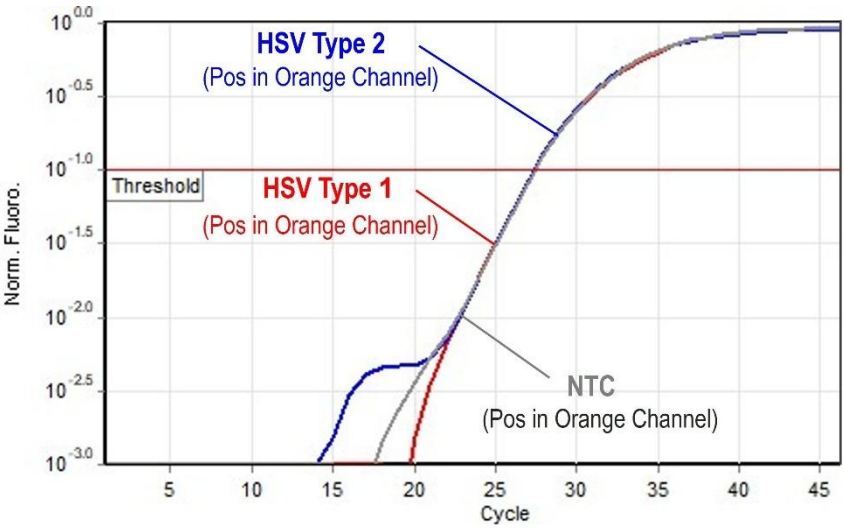


Fig 3. Typical HSV Controls graph in Orange channel for Rotor-Gene

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** for **HSV-1** if it is positive in the Green channel with a CT of less than 40.
- A sample is **Positive** for **HSV-2** if it is positive in the Yellow channel with a CT of less than 40.
- A sample is **Negative** if it is negative in both the Green and Yellow channels while it is positive for IC in the Orange channel with CT of 26-34.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if sample is negative in all three channels of the Green, Yellow and Orange. The interpretation of results is summarized in the table on page 15.

20. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to StepOne manual. Briefly, click on Analyze and set the threshold for **HSV-1/FAM** at 1,000; for **HSV-2/VIC** at 500; and for **IC/ROX** at 200. Figures 4, 5 and 6 represent typical graphs for the StepOne machine.

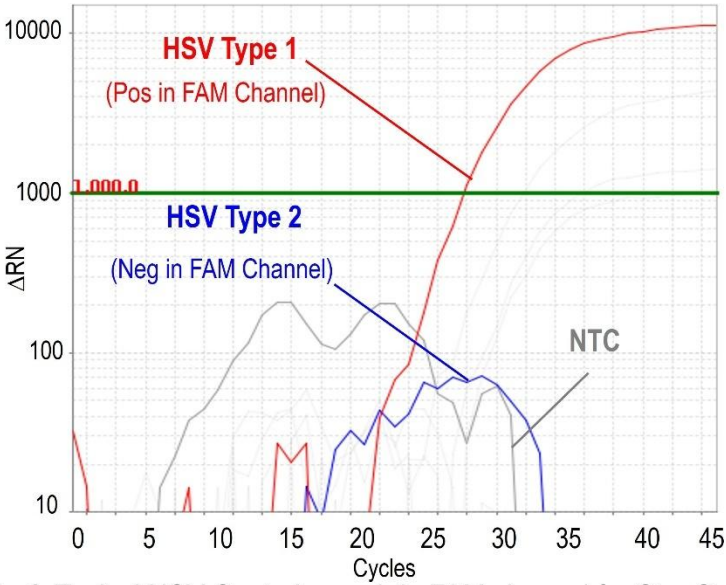


Fig 4. Typical HSV Controls graph in FAM channel for StepOne

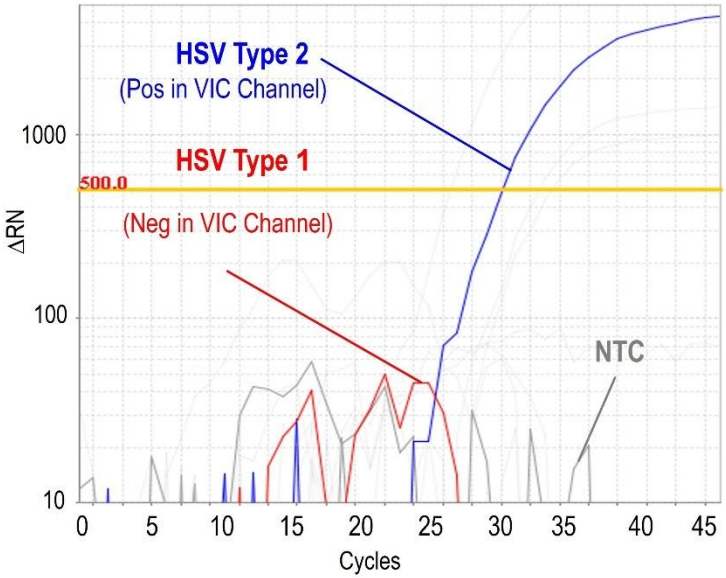


Fig 5. Typical HSV Controls graph in VIC channel for StepOne

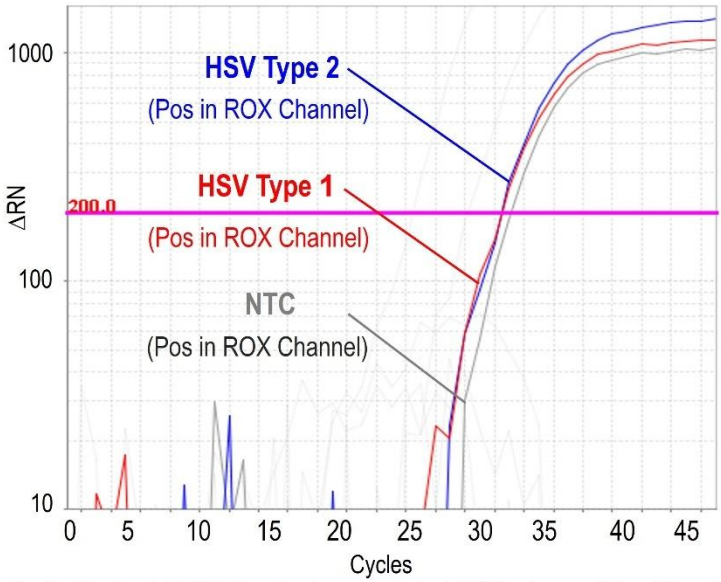


Fig 6. Typical HSV Controls graph in ROX channel for StepOne

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** for **HSV-1** if it is positive in the FAM channel with a CT of less than 40.
- A sample is **Positive** for **HSV-2** if it is positive in the VIC channel with a CT of less than 40.
- A sample is **Negative** if it is negative in both the FAM and VIC channels while it is positive for IC in the ROX channel with CT of 26-34.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if sample is negative in all three channels of the FAM (HSV-1), the VIC (HSV-2) and the ROX channel (IC).

Interpretation of results is summarized in the following table.

Green/FAM	Yellow/VIC	ROX	Result
+ (CT<40)	-	+/-	HSV Typ I
-	+ (CT<40)	+/-	HSV Typ II
-	-	+ (CT 26-34)	HSV Neg
-	-	-	Invalid
-	-	+ (CT>34)	Invalid

21. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the target, sequence and showed a limit of detection equal to 0.5 copy/ul.

22. 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.

23. Technical Support

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

24. 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

25. References

- Arvin, A.M., 2007. Human herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis. Cambridge; New York: Cambridge University Press.
- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212.
- Thomasini, R.L., 2020. Human herpesvirus infection: Biological features, transmission, symptoms, diagnosis and treatment. London, United Kingdom: IntechOpen.
- Whitley, R.J., 2015. Herpes simplex virus infections of the central nervous system. CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology, 21(6), pp.1704-1713.
- Widener, R.W. and Whitley, R.J., 2014. Herpes simplex virus. In Handbook of clinical neurology (Vol. 123, pp. 251-263). Elsevier.

26. 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