راهنمای کیت HTLV RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۳/۰

جهت تشخیص و کمیت سنجی پرو ویروس HTLV-1

به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

Σ 24 (Cat# HTLVRQ24)

Σ 48 (Cat# HTLVRQ48)

Σ 96 (Cat# HTLVRQ96)

NG-WI-ASL-13-300

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..... 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 DNA..... ۸

۱۴. دستورکار PCR و مراحل آزمایش..... ۹

۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها..... ۹

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. محاسبه تیتر ویروس..... ۱۷

۲۲. محدوده خطی..... ۱۸
۲۳. میزان حساسیت..... ۱۸
۲۴. روش امحاء..... ۱۸
۲۵. پشتیبانی فنی..... ۱۸
۲۶. اطلاعات تماس..... ۱۹
۲۷. منابع..... ۱۹
۲۸. توضیحات برچسب..... ۲۰

۱. مقدمه

کیت HTLV-I RQ جهت تشخیص و کمیت سنجی پرو ویروس HTLV-1 به روش Real-Time PCR طراحی شده است. در این روش، DNA ویروس به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین میکس دیگر این کیت حاوی سری ثانویه‌ای از پرایمرها و پروب جهت شناسایی ژن آلبومین 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 HTLV-I RQ امکان بررسی نمونه جهت تشخیص و تعیین تیتر HTLV-1 و نیز تعیین تیتر سلولی نمونه بر اساس ژن آلبومین را به روش Real-Time PCR فراهم می کند. این کیت جهت استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

HTLV-I اولین رتروویروس انسانی است که در سال ۱۹۷۹ میلادی شناسایی شد. دو سال پس از آن HTLV-II نیز شناسایی شد. در حال حاضر بین ۱۵ تا ۲۰ میلیون نفر در سطح جهان به این ویروس ها آلوده هستند. HTLV-I در برخی مناطق شمالی ایران نیز شایع می باشد. انتقال ویروس عمدتا از راه تماس جنسی، شیردهی، انتقال خون، پیوند و سرنگ آلوده می‌باشد. پس از ورود ویروس به بدن، گسترش عفونت تنها از طریق تماس سلولی و سیناپس های ویروسی صورت می‌گیرد و به همین دلیل پیشرفت بسیار کندی داشته و نشانه های بالینی و

عوارض عفونت حدود ۲۰ تا ۵۰ سال پس از آلودگی اولیه ظاهر میشود. HTLV-I عمدتاً موجب لوسمی یا لنفوم و میلوپاتی (myelopahty) و HTLV-II بیشتر باعث عوارض ملایمی در سیستم عصبی و یا عفونت مزمن ریوی می‌شود. پیشرفت بیماری و آسیب های حاصله تا حدی وابسته به تیتر ویروس می‌باشد، لذا تعیین تیتر ویروس می تواند در مدیریت بیماری موثر باشد.

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، عامل عفونی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می‌شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب‌های فلورسنت قابل تشخیص می‌گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می‌توان وجود عامل عفونی را در نمونه تشخیص داد، بدون آنکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول واکنش با روش‌هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

۵. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
HTLV Mix	میکس آماده برای*HTLV1	۴۸۰ میکرولیتر
Albumin Mix	میکس آماده برای *Albumin	۴۸۰ میکرولیتر
HTLV-Alb S1	استاندارد ۱: صد هزار کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
HTLV-Alb S2	استاندارد ۲: ده هزار کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر

HTLV-Alb S3	استاندارد ۳: هزار کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
HTLV-Alb S4	استاندارد ۴: یکصد کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
HTLV-Alb S5	استاندارد ۵: ده کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

*۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ یا 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 می‌شود.

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 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، محتویات کیت را روی یخ خرد شده نگه دارید تا کاملا ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن آنها اطمینان حاصل نمایید. سپس برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ‌های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته و از گذاشتن آنها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش، 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 سانتیگراد نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. هنگام دریافت نمونه در آزمایشگاه باید آن را به حجم های کوچکتر تقسیم نمود و یکی را برای CBC در نظر گرفت (به بخش ۲۱ رجوع کنید) و بقیه را می‌توان برای چند روز در یخچال و یا برای مدت طولانی

در فریزر و در دمای بیست درجه زیر صفر نگهداری نمود. نمونه در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیتر ویروس در آن ثابت می ماند.

توجه: نمونه CBC را در فریزر نگهداری نکنید!

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. استخراج DNA

DNA مناسب برای آزمایش را می‌توان از نمونه های زیر جدا نمود:

- جدا کردن PBMC خون بیمار با استفاده از فایکول (Ficol) و سپس استخراج DNA از PBMC
- استخراج DNA از خون کامل

برای استخراج DNA از روش ها و کیت های مختلفی را می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می‌کنیم:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat# 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۱۴. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی لوله های کیت را روی یخ خرد شده قرار دهید تا به طور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از یکنواخت شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

تعداد مورد نیاز لوله PCR را روی بلوک سرد بگذارید. لوله ها را به دو گروه مجزا تفکیک کنید. در هر گروه علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، ۵ لوله برای استانداردها و یک لوله برای شاهد منفی نیز در نظر بگیرید.

در گروه اول به هر لوله ۲۰ میکرولیتر از **HTLV Mix** اضافه کنید. سپس ۵ میکرولیتر از **DNA** استخراج شده و یا **استانداردها (HTLV-Alb S1-S5)** یا **شاهد** به هر لوله اضافه کنید و درپوش لوله ها را بسته و شماره گذاری کنید.

در سری دوم به هر لوله ۲۰ میکرولیتر از **Albumin Mix** اضافه کنید. سپس ۵ میکرولیتر از **DNA** استخراج شده و یا **استانداردها (HTLV-Alb S1-S5)** یا **شاهد** به هر لوله اضافه کنید و درپوش لوله ها را بسته شماره گذاری کنید.

لوله 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 Rotor-Gene، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۵.دستگاه ها و نرم افزارها

کیت HTLV 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!

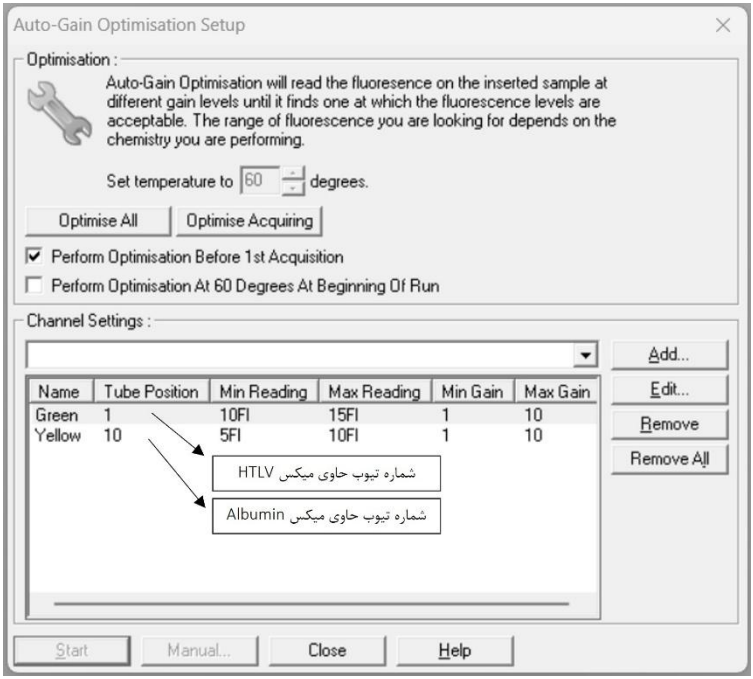
دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق بزنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

فایل تمپلیت HTLV را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل HTLV 0.2 یا HTLV 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.

دقت داشته باشید Tube Position را برای کانال سبز روی شماره تیوبی تنظیم کنید که حاوی میکس HTLV است و برای کانال زرد شماره تیوبی را ثبت نمایید که حاوی میکس Albumin می‌باشد.

سپس 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 پس از ذخیره فایل آزمایش در محل مورد نظر، دستگاه شروع به کار می کند.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. دقت کنید که دو صفحه جداگانه با نام های HTLV و Albumin تعریف شده اند و لوله های حاوی HTLV Mix فقط در صفحه HTLV و لوله های حاوی Albumin Mix فقط در صفحه Albumin باید نامگذاری شوند. در ستون "Type" نوع هر نمونه را نیز مشخص کنید یعنی نمونه بیمار را با unknown، استانداردها را با standard و شاهد منفی را با NTC یا Negative Control تعریف کنید. غلظت استانداردها را نیز در ستون مربوطه وارد 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 دکمهAssign Targets and Samples را انتخاب کنید. شاهد مثبت و شاهد منفی به همراه استانداردها و تعدادی نمونه از پیش تعریف شده اند. استانداردها، شاهدهای مثبت و منفی و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای این کار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می‌توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می‌توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز اضافه کنید و نام نمونه ها را نیز مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۸. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های Real-Time PCR استفاده می‌کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم 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 رنگ های FAM و VIC تنظیم شود. PCR Mix موجود در کیت حاوی ROX می‌باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

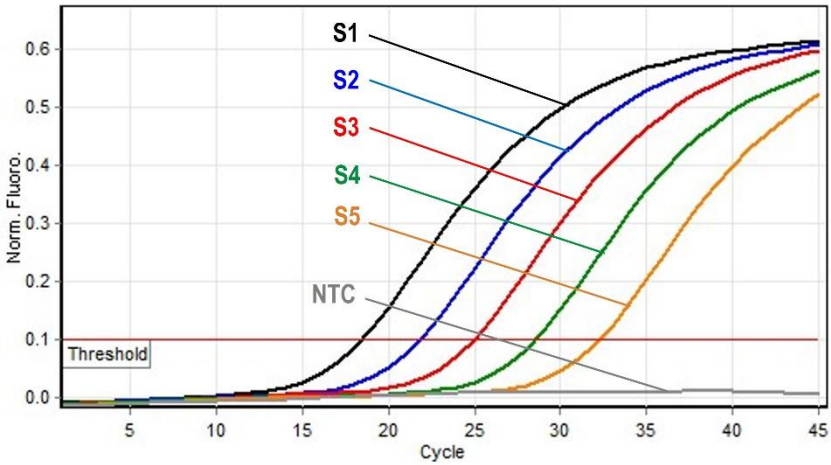
۱۹. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به طور خلاصه برای HTLV-I از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Cycling A. Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold، حداقل را روی ۰/۰۲ یا بالاتر از فلورسانس زمینه قرار داده و دکمه OK را بزنید تا پس از رسم منحنی استاندارد نتایج در جدول پایین صفحه نشان داده شوند. همچنین می‌توانید به طور ساده آستانه (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید. سپس برای تعیین تیتر آلبومین مراحل بالا را برای کانال Yellow تکرار کنید. توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **HTLV-I** و افزایش تابش زرد (Yellow) مربوط به آلبومین می‌باشد.

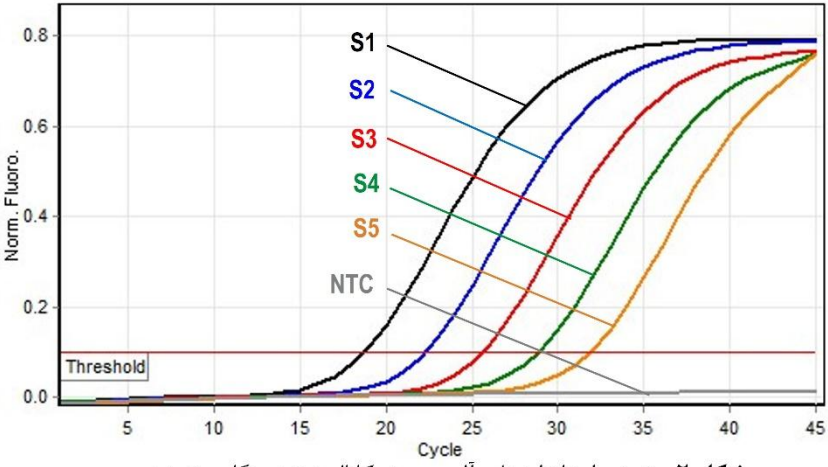
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می باشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال سبز و همچنین در کانال زرد مثبت و دارای CT کمتر از ۴۰ باشد، می‌توان آن را **مثبت** تلقی نمود و مطابق قسمت ۲۱، تیتر آن را محاسبه نمود.
- در صورتی که نمونه ای در کانال سبز منفی باشد اما در کانال زرد مثبت بوده و CT آن در محدوده استانداردهای کیت باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که نمونه ای در کانال زرد منفی باشد، آزمایش باید **تکرار** شود. استخراج نامناسب یا خطا در تنظیم آزمایش می‌تواند دلیل چنین نتیجه ای باشد.



شکل ۱. منحنی استانداردهای HTLV-1 در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. منحنی استانداردهای آلبومین در کانال زرد دستگاه روتورژن

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

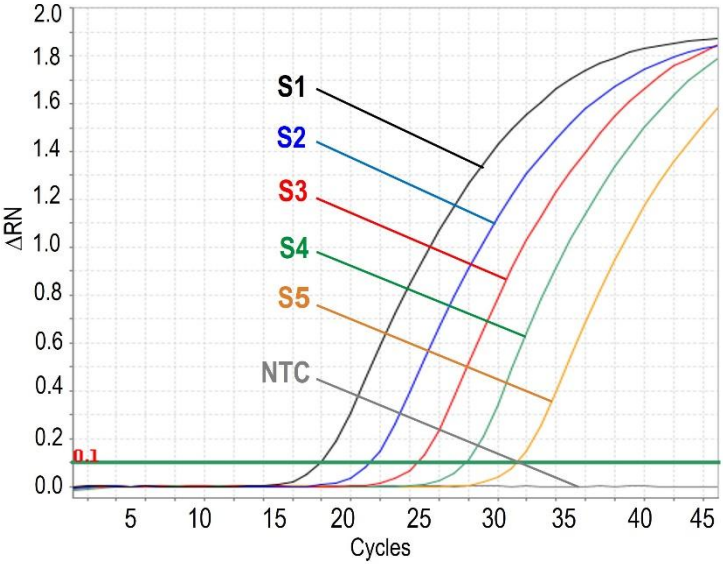
	Green/FAM	Yellow/VIC	Result
1	+	+ (CT 28-40)	HTLV Pos
2	-	+ (CT 28-34)	HTLV Neg
3	-	+ (CT>34)	Invalid
4	-	-	Invalid

۲۰. آنالیز نتایج StepOne

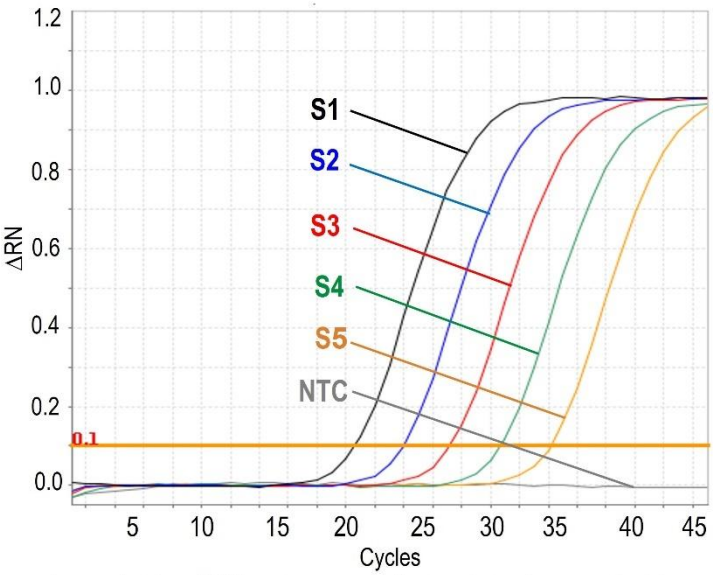
برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای HTLV/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید. فرایند فوق را برای کانال Albumin/VIC نیز تکرار کنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. توجه داشته باشید که افزایش **تابش HTLV/FAM** مربوط به **HTLV** و افزایش **تابش Albumin/VIC** حاصل از **Albumin** می باشد.

برای مشاهده نمودار مورد انتظار برای استانداردهای HTLV و Albumin و شاهد منفی در دستگاه StepOne، تصاویر ۳ و ۴ را ملاحظه فرمایید.

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 ۳. منحنی استانداردهای HTLV-1 در کانال FAM دستگاه استپ وان



شکل ۴. منحنی استانداردهای آلبومین در کانال VIC دستگاه استپ وان

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه هم در کانال FAM و هم در کانال VIC مثبت و دارای CT کمتر از ۴۰ باشد، می‌توان آن را مثبت تلقی نمود و مطابق قسمت ۲۱، تیتر آن را محاسبه نمود.
- در صورتی که نمونه ای در کانال FAM منفی باشد اما در کانال VIC مثبت و CT آن در محدوده استانداردهای کیت باشد، نمونه منفی در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که نمونه ای در کانال VIC منفی باشد، آزمایش باید تکرار شود. علت ان می‌تواند ناشی از استخراج نامناسب یا خطا در تنظیم آزمایش باشد.

۲۱. محاسبه تیتر ویروس

از آن جا که هر کیت حاوی یک سری استاندارد با غلظت مشخص می‌باشد، با استفاده از آنها دو منحنی استاندارد رسم شده و نسبت ویروس به سلول ها در نمونه بیمار معین می شود. این استانداردها برای تعیین تیتر HTLV provirus و تعیین تیتر ژن آلبومین و تعیین تعداد سلول نمونه می‌باشند.

برای تعیین proviral load در PBMC (مجموع مونوسیت ها و لنفوسیت ها) (Peripheral Blood Mononuclear Cells) بیمار، در صورتی که استخراج DNA از PBMC انجام شده باشد، دو برابر تیتر HTLV باید به تیتر آلبومین نمونه تقسیم شود تا proviral load در هر PBMC تعیین شود.

در صورتی که استخراج DNA از خون کامل صورت گرفته باشد، با توجه به درصد لنفوسیت ها و مونوسیت های خون که در گزارش CBC ذکر می‌شود، proviral load در هر PBMC با استفاده از فرمول زیر تعیین می شود:

$$\textbf{Proviral Load} = \frac{\textbf{HTLV titre} \times 2 \times 100\%}{\textbf{Albumin titre} \times (\textbf{Lymphocyte}\ \% + \textbf{Monocyte}\ \%)}$$

۲۲. محدوده خطی

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

۲۳. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس و یا آلبومین بررسی شده است و معادل دو کپی در میکرولیتر برای HTLV-I و یک کپی برای ژن آلبومین 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.

۲۴. 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.

۲۵. پشتیبانی فنی

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

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱
Info@novingene.com

۲۶. 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

۲۷. منابع

- Zhu, T., 2008. Human Retrovirus Protocols. Springer Science & Business Media.
- Kannian, P. and Green, P.L., 2010. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. Viruses, 2(9), pp.2037–2077.
- Umberto Bertazzoni, Ciminale, V. and Maria Grazia Romanelli., 2019. Molecular Pathology of HTLV-1. Frontiers Media SA.
- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212.

۲۸. 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.

HTLV RQ Kit Manual

Winter 2025, Version 3.0

For Real-Time PCR Detection and Quantitation of HTLV-1 provirus
For Research Use Only

24 (Cat# HTLVRQ24)
48 (Cat# HTLVRQ48)
96 (Cat# HTLVRQ96)
NG-WI-ASL-13-300

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 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. DNA Isolation 6
14. PCR Protocol 7
15. Devices and software 7
16. Programming Rotor-Gene 7
17. Programming StepOne 9
18. Programming Other Machines 9
19. Data Analysis: Rotor-Gene 10
20. Data Analysis: StepOne 12
21. Quantitation 14

22. Linear Range 14
23. Sensitivity..... 15
24. Disposal Method 15
25. Technical Support..... 15
26. Contact Information..... 15
27. References 15
28. Symbols..... 16

1. Introduction

HTLV RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR test for detection and quantitation of HTLV-I provirus DNA using Real-Time PCR (based on polymerase chain reaction) with Rotor-Gene or StepOne machines. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit. The other Mix contains a different series of primers and probes for the detection of a house keeping gene as Internal Control to prevent false negative results due to failure in extraction.
This kit is for Research Use Only!

2. Intended Use

HTLV-I RQ kit is intended for the detection and quantitation of HTLV-I provirus and cellular titer (based on Albumin gene). Detection is accomplished by polymerase chain reaction and is applicable with Rotor-Gene, StepOne and MIC machines.

3. Background Information

Human T-cell Lymphotropic Virus I (HTLV-I) is the first human retrovirus discovered (1979). Two years later HTLV-II was also discovered. About 15 to 20 million people are infected with these viruses worldwide. HTLV-I is endemic in North of Iran. Transmission is mostly through sexual contact, breastfeeding, transfusion, transplant, and intravenous drug use. Within the body, infection spreads slowly through virological synapses from cell to cell and takes 20-50 years to develop symptoms. Infection with HTLV-I may lead to leukemia/lymphoma or myelopathy while HTLV-II causes mild neurologic disorders or chronic pulmonary infection. Disease progress and pathogenesis depend partly on proviral load and monitoring that could be beneficial for patient management.

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
HTLV Mix	PCR Master mix*	480 µl
Albumin Mix	PCR Master mix*	480 µl
HTLV-Alb S1	Standard 1: 100,000 copies/µl	250 µl
HTLV-Alb S2	Standard 2: 10,000 copies/µl	250 µl
HTLV-Alb S3	Standard 3: 1,000 copies/µl	250 µl
HTLV-Alb S4	Standard 4: 100 copies/µl	250 µl
HTLV-Alb S5	Standard 5: 10 copies/µl	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 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 block instead.

11. Specimen, Storage and Transport

Proper samples to test for HTLV are peripheral blood, which should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend EDTA or citrate tubes. Whole blood should be shipped at +4°C and aliquoted upon receipt. One aliquot should be examined for CBC (see section 9), while other aliquots will be used for DNA extraction and can be stored at +4°C for a few days or at -20°C for up to a few weeks.

Note: Do not freeze the aliquot specified for CBC!

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. DNA Isolation

DNA can be extracted directly from whole blood. Alternatively, DNA can be extracted from peripheral blood monocytes (PBMC) collected using ficol.

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)

14. PCR Protocol

Each sample should be examined for detection and quantitation of provirus with HTLV-I mix and also with Albumin mix for cell titer. Thaw the reagents on ice completely, followed by a brief mixing and a quick spin. Place required number of tubes on cold block. Consider two series of tubes, one for HTLV1 and the other for Albumin. Each series should include tubes for standards, samples and negative control.

Pipette 20ul of HTLV Mix directly to each tube of series one, followed by adding 5ul of each Standard (HTLV-Alb S1-S5) or sample DNA or control.

Pipette 20ul of Albumin Mix directly to each tube of series two, followed by adding 5ul of each Standard (HTLV-Alb S1-S5) or sample DNA or control.

Cap the tubes and visually inspect to ensure all are caped securely. Place 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.

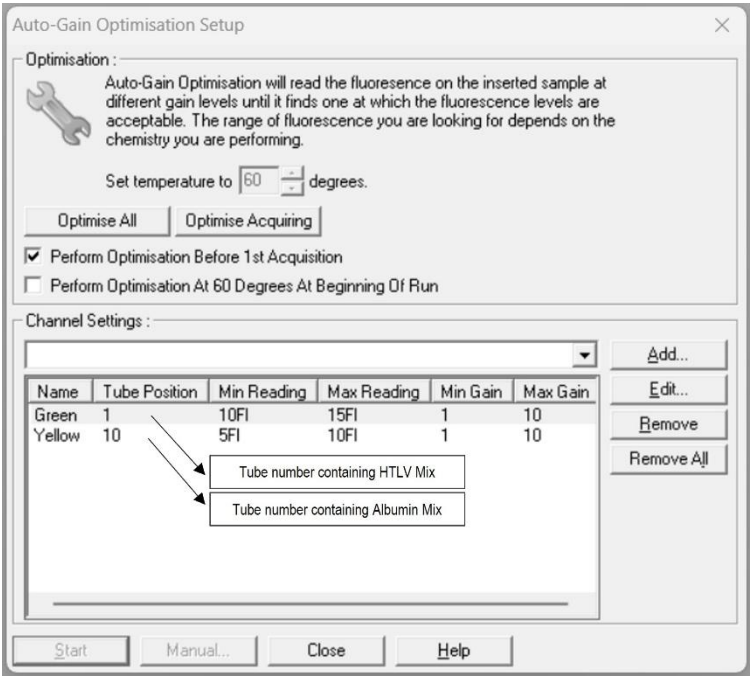
15. Devices and software

HTLV 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 HTLV template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); HTLV 0.1 is for strip tubes and HTLV 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 following image.
Select a tube number containing p190 Mix for the Green channel and tube with Albumin Mix for the Yellow channel.



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.
Edit sample names on both HTLV and ABL pages. Remember that

tubes containing HTLV mix should only be named in HTLV page and tubes containing Albumin Mix should only be named in Albumin page.
Make sure in the “Type” column, all the standards have been defined as “standard” and the relative concentrations have been entered. Patient samples should be defined as "unknown" and no template control as "NTC" respectively.

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, four standards, and a few samples are defined. Click on Plate Setup. One negative control, four standards, and a few samples are defined. You may change plate setup using right-click options (copy, paste, clear). You may also add /remove samples or change the sample name on the “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment to the desired location. The instrument will start shortly.

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 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC dyes. The HTLV and Albumin mixes contain ROX. The final concentration of ROX in reaction is 300nM.

19. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing the results, make sure that in the sample menu all the standards have been defined as “standard” and the relative concentrations have been entered. **Samples should be named in two separate pages.** Tubes with HTLV mix should be named in “HTLV” page, and tubes with Albumin mix should be named in Albumin page. Define standards in each page relatively. Patient samples should be defined as "unknown" and control as Negative Control" on both pages.

Analyze the data according to Rotor-Gene manual. Perform quantitative analysis for the **HTLV-I (Green channel)**, and for the **Albumin/cell titer (Yellow channel)**. Briefly, click on Analysis menu and then, under Quantitation tab double click on “Cycling A. Green”. In the pop up for Automatic Threshold increase the minimum or lower bound until it surpasses the negative control or the NTC fluorescence, and then, click on OK. Repeat the above for the “Cycling A. Yellow”. You may also simply set threshold at 0.1 for both channels.

Figures 1 and 2 represent typical graphs for Rotor-Gene machine.

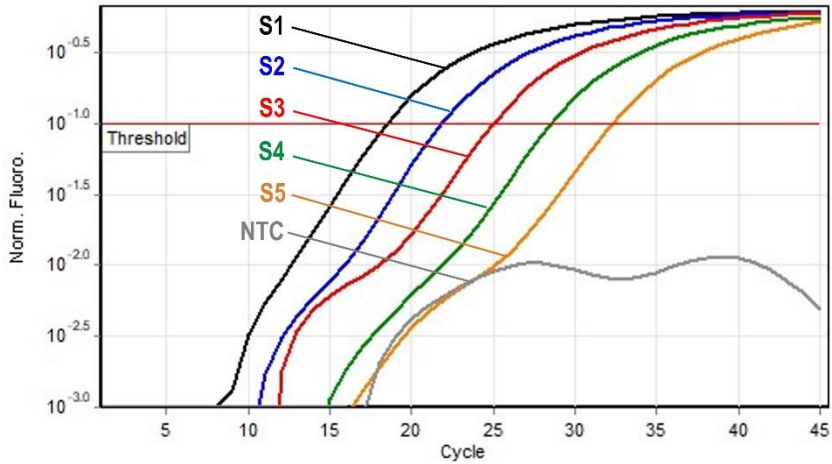


Fig 1. Typical HTLV-1 graph in Green channel for Rotor-Gene

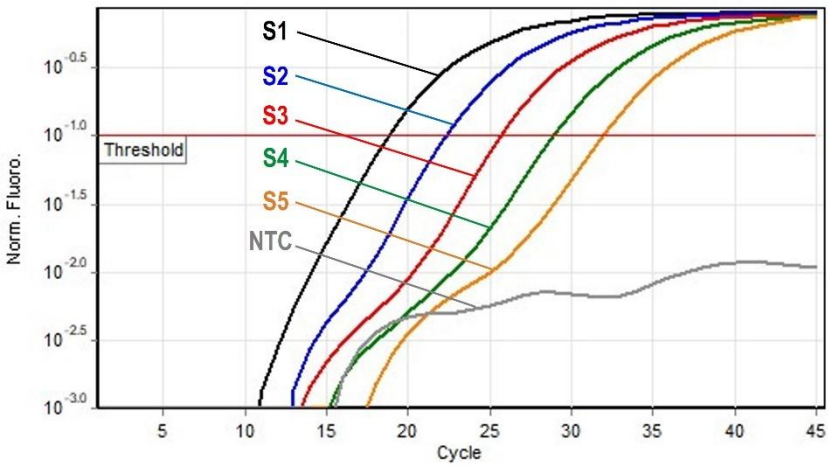


Fig 2. Typical Albumin graph in Yellow channel for Rotor-Gene

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT if present, is not reliable.

Consider following points when analyzing:

- A sample is **positive** if it is positive in both the Green and Yellow channels with CTs less than 40. The proviral load can be determined according to section 21.
- A sample is **negative** if it is negative in the Green channel (for HTLV-I) while it is positive for Albumin in the Yellow channel with a CT within the Albumin standards.
- Results are **inconclusive** if a sample is negative in the Yellow channel (for Albumin) and the test should be repeated. Improper DNA extraction or error in test set up could be the cause of such a result.

The interpretation of the results is summarized in below table.

	Green/FAM	Yellow/VIC	Result
1	+	+ (CT 28-40)	HTLV Pos
2	-	+ (CT 28-34)	HTLV Neg
3	-	+ (CT>34)	Invalid
4	-	-	Invalid

20. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to StepOne manual. Briefly, click on Analyze and set the threshold for the **HTLV/FAM** and **Albumin/VIC** at 0.1. Figures 3 and 4 represent typical graphs for StepOne machine.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT if present, is not reliable.

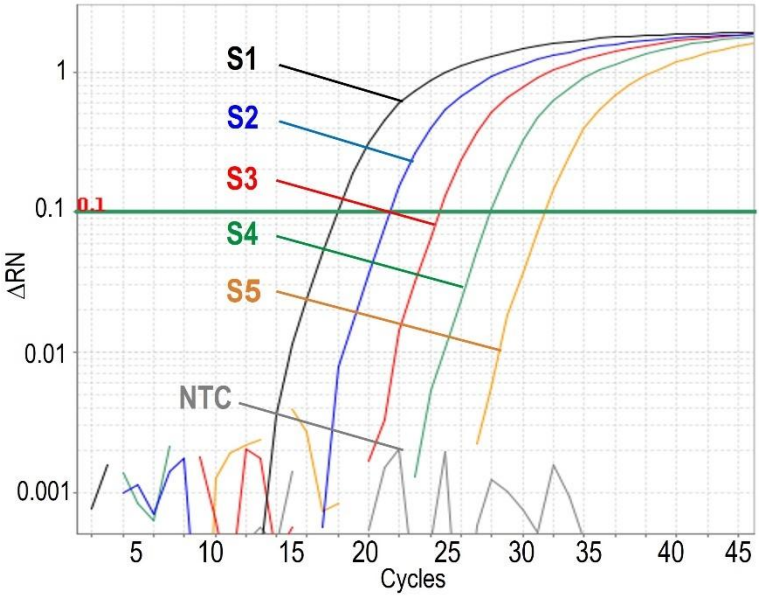


Fig 3. Typical HTLV-1 graph in FAM channel for StepOne

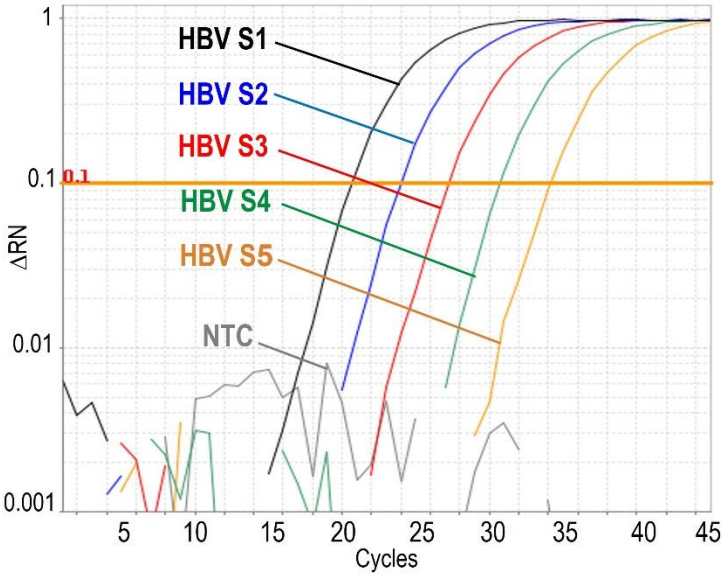


Fig 4. Typical Albumin graph in VIC channel for StepOne

Consider following points when analyzing:

- A sample is **positive** if it is positive in both FAM and VIC channels with CTs less than 40. The proviral load can be determined according to section 15.
- A sample is **negative** if it is negative in FAM channel (for HTLV-I) while it is positive for Albumin in VIC channel with a CT within the Albumin standards.
- Results are **inconclusive** if a sample is negative in VIC channel (for Albumin) and the test should be repeated. Improper DNA extraction or error in test set up could be the cause of such a result.

21. Quantitation

The kit provides one series of quantitation standards with defined titers for estimation of HTLV-I proviral titer and Albumin gene or cell titer.

If DNA has been extracted from PBMC, the HTLV proviral load is twice the ratio of HTLV/Albumin.

If DNA has been extracted from the whole blood, use the equation below to calculate the proviral load:

$$\textbf{Proviral Load} = \frac{\textbf{HTLV titre } \times 2 \ \times 100\%}{\textbf{Albumin titer} \times (\textbf{Lymphocyte } \% + \textbf{Monocyte } \%)}$$

22. Linear Range

The linear range of the kit was assessed with dilution series of the cloned, target and showed to be linear in the range of 1,000,000 copy/µl to 10 copy/µl.

23. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and showed a limit of detection equal to 2 copies/µl for HTLV-I and 1 copy/µl for Albumin.

24. 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.

25. Technical Support

For technical support, contact us via phone +98 993-6223241 at email: info@novingene.com

26. 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

27. References

- Zhu, T., 2008. Human Retrovirus Protocols. Springer Science & Business Media.
- Kannian, P. and Green, P.L., 2010. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. Viruses, 2(9), pp.2037–2077.
- Umberto Bertazzoni, Ciminale, V. and Maria Grazia Romanelli., 2019. Molecular Pathology of HTLV-1. Frontiers Media SA.

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

28. 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	-10°C -30°C	Temperature limit

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