راهنمای کیت

HCV Genotype RG

جهت تعیین ژنوتایپ ویروس هپاتیت C

به روش Real-Time RT-PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene

مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-03-102

ویرایش ۲/۰

شهریور ۱۳۹۶

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱. مقدمه..... ۲

۲. محتویات کیت..... ۳

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت..... ۳

۴. سایر موارد مورد نیاز..... ۴

۵. نکات قابل توجه..... ۴

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن..... ۵

۷. عوامل مزاحم..... ۶

۸. استخراج RNA..... ۶

۹. دستورکار RT-PCR..... ۶

۱۰. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۷

۱۱. آنالیز نتایج..... ۸

۱۲. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۸

۱۳. میزان حساسیت..... ۱۱

کیت **HCV Genotype RG** برای تعیین ژنوتایپ ویروس هپاتیت C تایپ ۱، ۲ و ۳ می باشد. این کیت برای کار با دستگاه Rotor-Gene طراحی شده و مخصوص مصارف تحقیقاتی می باشد.

۱. مقدمه

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

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

بهترین روش تعیین ژنوتایپ ویروس هپاتیت C در حال حاضر تعیین توالی و بررسی های فیلوژنتیک می باشد. به دلیل محدودیتهای فنی استفاده از این روش ها بطور مستمر و روزانه در آزمایشگاههای بالینی ممکن نمی باشد، لذا از روشهای دیگر که عمدتا مبتنی بر PCR می باشند استفاده می شود.

کیت HCV Gen RG امکان بررسی نمونه جهت تعیین ژنوتایپ ویروس هپاتیت C را به روش Real-Time RT-PCR و برای تایپ های ۱، ۲ و ۳ فراهم می کند. در این روش با استفاده از پروب های فلورسنت می توان کیفیت و کمیت محصول واکنش را بررسی نموده و تایپ ویروس را تعیین کرد بدون این که پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. بنابراین در این روش امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene طراحی شده است. این کیت قادر به تشخیص ژنوتایپ های ۴، ۵ و ۶ هپاتیت C نمی باشد.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل دفترچه راهنما، لوح فشرده و مواد زیر می باشد:

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

* یک، دو یا چهار تیوب، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت که در جدول بالا ذکر شده است 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 میکس واکنش بیش از چند بار خودداری کنید چرا که باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن می شود.

٤. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب

- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج RNA
- تیوب ۱/۷ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

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

۵. نکات قابل توجه

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج ، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه RNA به لوله PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.
- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.

- پیش از استفاده از کیت، لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا محتویات آن ها کاملا ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن مواد هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخهای قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- لوله های PCR را روی یخ قرار ندهید و از بلوک سرد استفاده کنید. این بلوک به همراه دستگاه Rotor-Gene در اختیار شما قرار داده شده است.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر یخ خرد شده خودداری کنید

٦. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش هپاتیت C و تعیین ژنوتایپ آن پلاسمای خون محیطی (peripheral blood) می باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می توان تا ۷۲ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. هنگام دریافت نمونه در آزمایشگاه باید پس از سانتریفوژ پلاسمای آن را جدا نموده و در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. نمونه پلاسما در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیتر ویروس در آن ثابت می ماند.
حداقل نمونه توصیه شده برای آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما می باشد که نیازمند نیم میلی لیتر خون کامل می باشد.

۷. عوامل مزاحم

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

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

۸. استخراج RNA

برای استخراج RNA از نمونه پلاسما از روش ها و کیت های مختلفی می توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می کنیم:

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

۹. دستورکار RT-PCR

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 آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

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

RNA استخراج شده و یا شاهد مثبت یا آب به هر لوله اضافه کنید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

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

۱۰. 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.

در لوح فشرده همراه کیت، روی فایل HCV Gen 0.2 یا HCV Gen 0.1 (با توجه به نوع لوله های استفاده شده) دو بار کلیک کنید تا برنامه باز شود. در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظرتان ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود. در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید.

۱۱. تنظیم سایر دستگاه ها

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

Step	Temperature and time	Cycles
1	**50°C x 30 min**	1
2	**95°C x 15 min**	1
3	**95°C x 15 sec**	10
	63°C x 15 sec	
	72°C x 15 sec	
4	**95°C x 15 sec**	50
	62°C x 15 sec	
	72°C x 15 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای 62 درجه و برای رنگ‌های FAM و VIC و Cy5 تنظیم شود. Mix موجود در کیت حاوی ROX می‌باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش30nM می باشد.

۱۲. آنالیز نتایج Rotor-Gene

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

به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold دکمه cancel را

بزنید و threshold را روی ۰/۱ قرار دهید. همین کار را برای کانال زرد و قرمز تکرار کنید. برای کانالهای زرد و قرمز threshold را روی ۰/۲ قرار دهید.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته 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:

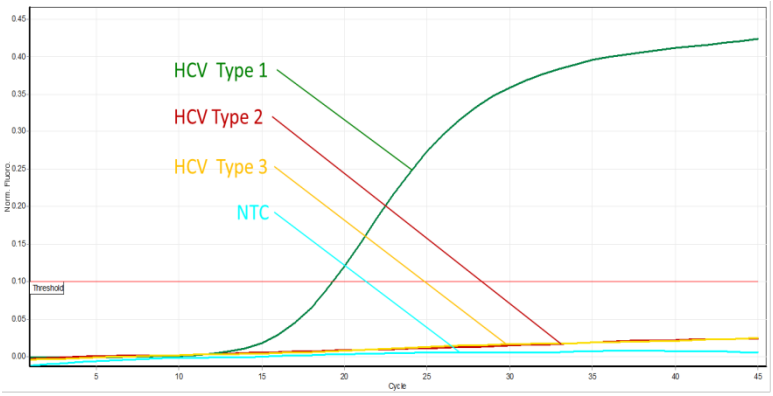
- در صورتی که نمونه در **کانال سبز** مثبت و دارای CT کمتر از ۴۰ باشد، نمونه حاوی **ژنوتایپ ۱** ویروس هپاتیت C می باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال زرد** مثبت و دارای CT کمتر از ۴۰ باشد، نمونه حاوی **ژنوتایپ ۳** ویروس هپاتیت C می باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال قرمز** مثبت و دارای CT کمتر از ۴۰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

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

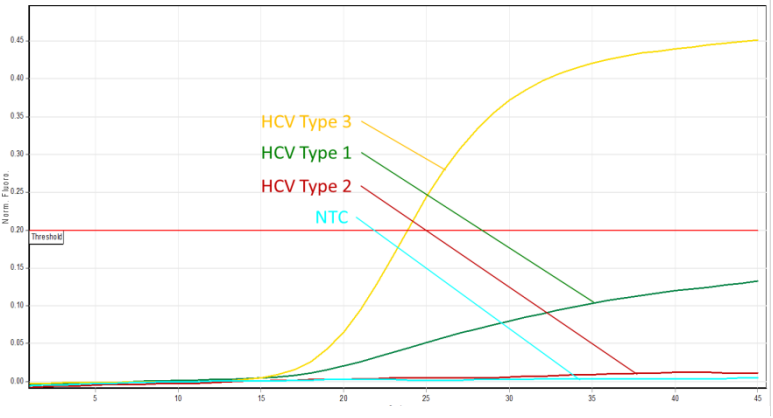
- نمونه از نظر هپاتیت C منفی است.
- نمونه از نظر هپاتیت C تایپ ۱یا ۲ یا ۳ مثبت است اما تیتر آن کمتر از حساسیت کیت می باشد.
- نمونه از نظر هپاتیت C تایپ ۴ یا ۵ یا ۶ مثبت می باشد.

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

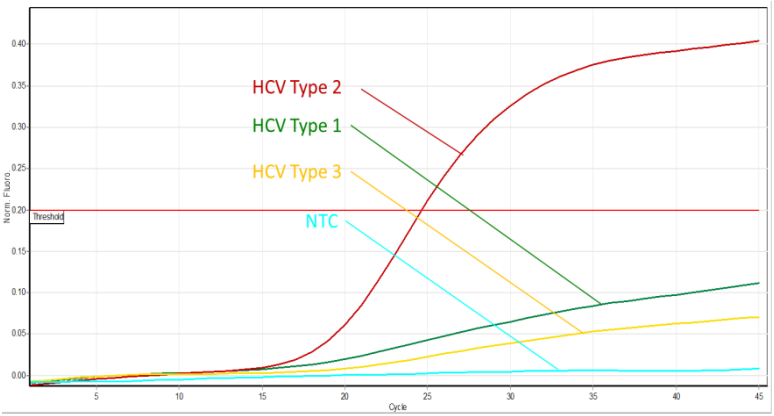
برای مشاهده گراف مورد انتظار شاهدهای مثبت و شاهد منفی، تصاویر یک، دو و سه را ملاحظه فرمایید.



تصویر ۱: نمودار کنترل های HCV در کانال سبز دستگاه Rotor-Gene



تصویر ۲: نمودار کنترل های HCV در کانال زرد دستگاه Rotor-Gene



تصویر ۳: نمودار کنترل های HCV در کانال قرمز دستگاه Rotor-Gene

۱۳. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده تایپ ۱ معادل ۲۵ 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 و ژنوتایپ آن قابل تعیین می باشد. در صورت کاهش تیتر نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص و تعیین تایپ خواهد بود اما با ضریب اطمینانی به مراتب کمتر.

HCV Genotype RG Kit Manual

For Genotyping of Hepatitis C Virus (HCV) with Real-Time RT-PCR

For use with Rotor-Gene or ABI 7500
Research use only

NG-WI-ASL-03-102
Version 2.0
September 2017

Novin Gene

Table of Contents:

1. Introduction 2
2. Kit Contents 3
3. Storage and Stability.....3
4. Additionally Required Materials.....3
5. General Precautions 4
6. Specimen, Storage and Transport.....5
7. Interfering Substances 5
8. RNA Isolation 5
9. RT-PCR Protocol.....6
10. Programming of Rotor-Gene 6
11. Programing Other Machines.....7
12. Data Analysis.....7
13. Sensitivity……..……10

HCV Genotype RG kit is intended for the genotyping of HCV type 1, 2 and 3 using RNA extracted from plasma. This kit is designed for use with Rotor-Gene and for research use only.

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is the major cause of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. So far 6 major genotypes and more than 80 subtypes have been identified.

Based on current clinical trials, pre-treatment viral load and HCV genotype are two best indicators for medication choice as well as patient response to therapy. Therefore, once patient tested positive for HCV, both viral load and genotype should be determined. Moreover since HCV genotypes have significant differences in their global distribution and prevalence, genotyping can be a useful tool for epidemiologic studies.

The gold standard method for HCV genotyping is sequencing and phylogenetic studies. Since this method is not feasible for routine practice in a clinical laboratory, other methods have been used for this purpose which most of them are PCR-based.

HCV Genotype RG kit provides a ready-to-use One-Step Real-Time RT-PCR system for genotyping of HCV types 1, 2 and 3. In this method application of fluorescent probes allows detection of amplified product. Analysis of fluorescent kinetics also leads to quantitation and genotyping of the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product. This kit is

designed for use with Rotor-Gene. HCV Genotype RG does not detect other HCV types including types 4, 5 and 6.

2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with Rotor-Gene template and following reagents:

Label	Content	Quantity
HCV Gen Mix RG	RT-PCR Mix*	300 µl
HCV-1	HCV Type 1 control	150 µl
HCV-2	HCV Type 2 control	150 µl
HCV-3	HCV Type 3 control	150 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

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

3. Storage and Stability

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

4. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Table top microtube centrifuge
- Vortex Mixer

- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- RNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

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

5. General Precautions

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

- Treat all samples as potentially infectious.
- Within the pre-PCR work area assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction; b) Reagent preparation where the HCV Gen Mix is aliquoted into tubes; and c) Reaction preparation area for addition of extracted RNA to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components on crushed ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

6. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend EDTA or citrate plasma for HCV detection and genotyping. Whole blood or plasma should be shipped at +4°C. Upon receipt, plasma should be separated from whole blood, then stored at +4°C for few days or aliquoted and stored at -20°C for up to few weeks.

7. Interfering Substances

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

8. RNA Isolation

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

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

9. RT-PCR Protocol

Thaw kit reagents on crushed ice completely followed by a brief mixing and a quick spin. **Pipette 12.5ul of HCV Gen Mix RG directly to each tube followed by adding 12.5ul of isolated RNA or Positive Ctrl or water.**

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are caped securely. Place tubes in the machine.

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

10. Programming Rotor-Gene

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

Open the CD provided in the kit and double click on "HCV Gen 0.2" or "HCV Gen 0.1" according to the used tubes. Program starts. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save the run file.

11. Programming Other Machines

HCV Gen RG kit is intended for use with RotorGene machine. If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**50°C x 30 min**	1
2	**95°C x 15 min**	1
3	**95°C x 15 sec**	10
	63°C x 15 sec	
	72°C x 15 sec	
4	**95°C x 15 sec**	50
	62°C x 15 sec	
	72°C x 15 sec	

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

12. Data Analysis

Analysis of data is relatively simple and quick. Each of HCV genotypes generates signal in a different channel (**Green channel: Type 1, Yellow channel: Type 3, Red channel: Type 2**).

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

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 sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

Consider following points when analyzing:

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

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

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

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

Figures 1, 2 and 3 represent typical graphs for Rotor-Gene machine.

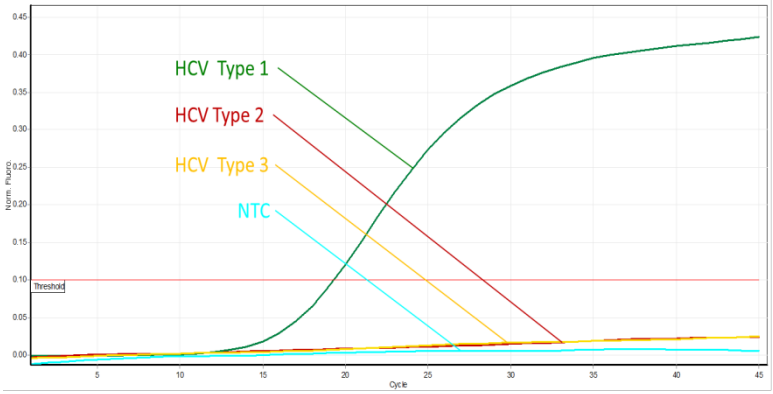


Figure 1: HCV Controls in Green Channel for Rotor-Gene

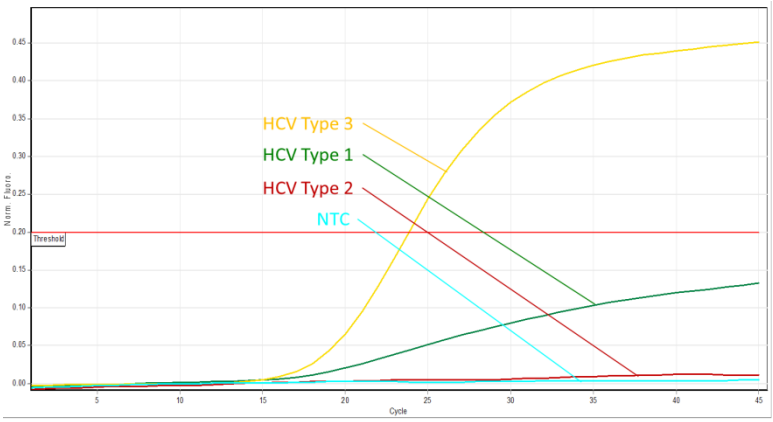


Figure 2: HCV Controls in Yellow Channel for Rotor-Gene

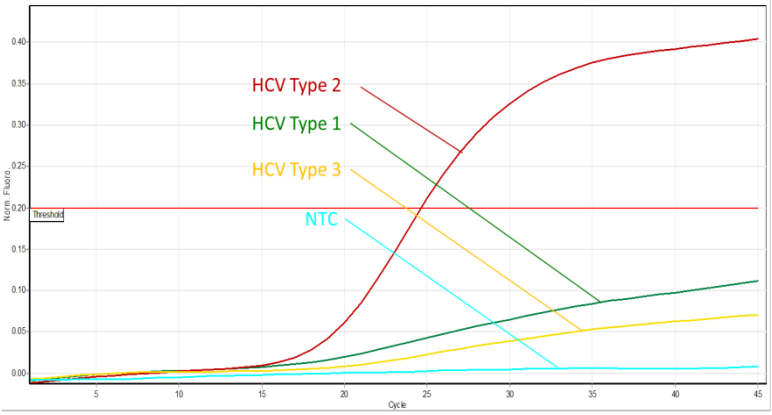


Figure 3: HCV Controls in Red Channel for Rotor-Gene

13. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the cloned HCV genotype 1 sequence and showed a limit of detection equal to 25 copy/µl.