راهنمای کیت HTLV RQ

جهت تشخیص و کمیت سنجی پرو ویروس HTLV-1
به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-13-200
ویرایش ۲/۰
فروردین ۱۳۹۷

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱. مقدمه ۲
۲. محتویات کیت ۳
۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت ۴
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 DNA ۶
۹. دستورکار PCR ۷
۱۰. تنظیم دستگاه Rotor-Gene ۷
۱۱. تنظیم دستگاه StepOne ۸
۱۲. تنظیم سایر دستگاه ها ۹
۱۳.آنالیز نتایج Rotor-Gene ۹
۱۴. آنالیز نتایج StepOne ۱۱
۱۵. میزان حساسیت ۱۳
۱۶. محاسبه تیتر ویروس ۱۳
۱۷. میزان حساسیت ۱۴

کیت HTLV-I RQ برای تشخیص و کمیت سنجی HTLV-I provirus DNA می باشد. این کیت برای کار با دستگاه Rotor-Gene یا دستگاه StepOne طراحی شده و مخصوص مصارف تحقیقاتی است.

۱. مقدمه

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 می باشد. پس از ورود ویروس به بدن، گسترش عفونت تنها از طریق تماس سلولی و سیناپس های ویروسی صورت می گیرد 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 می شوند. 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 می شود. پیشرفت بیماری و آسیب های حاصله تا حدی وابسته به تیتر ویروس می باشد، لذا تعیین تیتر ویروس می تواند در مدیریت بیماری موثر باشد.

کیت حاضر امکان بررسی نمونه جهت تشخیص و تعیین تیتر HTLV-I و نیز تعیین تیتر سلولی نمونه بر اساس ژن آلبومین را به روش Real-Time PCR فراهم می کند. ژن آلبومین همچنین کیفیت استخراج نمونه را نشان داده و از گزارش منفی کاذب جلوگیری می کند.

در حال حاضر روش Real-Time PCR در مقایسه با سایر روش های ارزیابی میزان ویروس، دارای بیشترین حساسیت و وسیع ترین دامنه اندازه گیری میباشد. در این روش با استفاده از پروب های فلورسنت می توان محصول واکنش را بررسی

نمود. بر همین اساس می توان تعداد ویروس را در نمونه مورد بررسی تعیین نمود بدون این که پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به این که در این روش نیازی به بررسی محصول PCR وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

۲. محتویات کیت

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

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

۳. شرایط نگهداری و پایداری 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 و بیش از سه بار این مواد خودداری کنید، زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آنها می شود.

۴. 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 ۱/۷ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

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 DNA به لوله ها) 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، 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.

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش، 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 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 ۱۵ رجوع کنید) و بقیه را می توان 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!

۷. عوامل مزاحم

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

DNA مناسب برای آزمایش را می توان 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 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 DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۹. دستورکار PCR

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 دست 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.

۱۰. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

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

روی کامپیوتر جانبی دستگاه Rotor-Gene، از لوح فشرده همراه کیت، فایل HTLV 0.2 V2 و یا HTLV 0.1 V.2 (با توجه به نوع لوله های مورد استفاده) را باز کنید.

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 مرحله بعد، نام هر نمونه را وارد کنید. توجه کنید که نمونه ها باید در دو صفحه جداگانه نامگذاری شوند. یعنی لوله هایی که حاوی میکس HTLV هستند درصفحه "HTLV" و لوله هایی که حاوی میکس آلبومین هستند در صفحه Albumin نام گذاری شوند. در هر صفحه استانداردها را تعریف کرده و تیتر آن ها را نیز وارد کنید. برای نمونه شاهد منفی می توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۱. تنظیم دستگاه StepOne

لوح فشرده همراه کیت را در کامپیوتر مرتبط به دستگاه قرار دهید. نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل لوح فشرده را انتخاب کنید.

از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه Assign 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) می توانید استفاده کنید.

همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می توانید 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.

۱۲. 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	**95°C x 10 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 1 min	

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 می باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می باشد.

۱۳. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. 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 می توانید به طور ساده آستانه (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید.

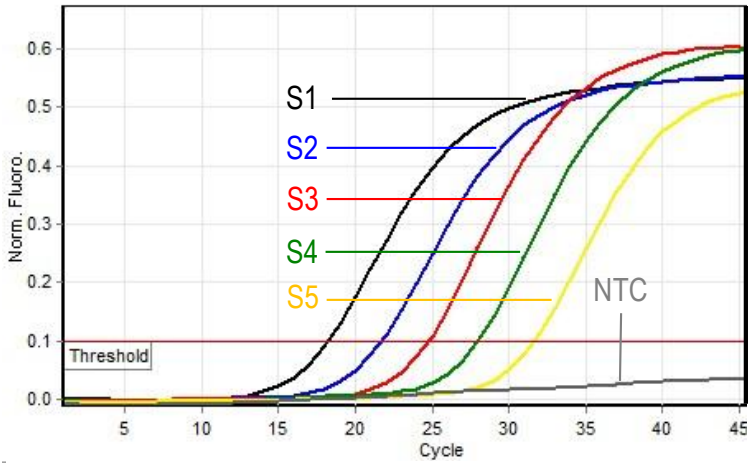
سپس برای تعیین تیتر آلبومین مراحل بالا را برای کانال Yellow تکرار کنید.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

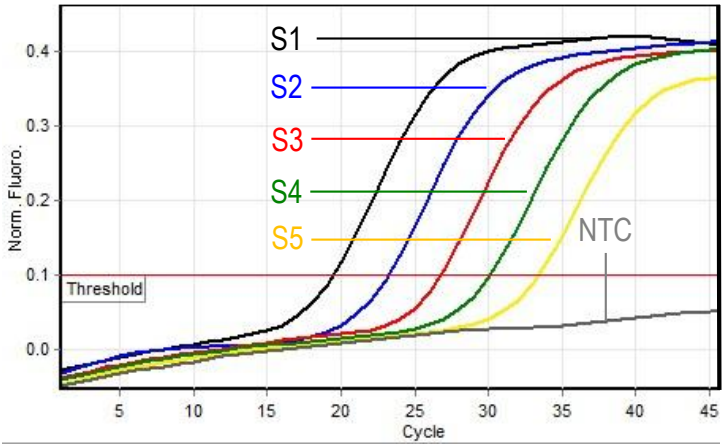
توجه داشته باشید که افزایش تابش سبز (Green) مربوط به HTLV-I و افزایش تابش زرد (Yellow) مربوط به آلبومین می باشد.

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.

- در صورتی که نمونه هم در کانال سبز و هم در کانال زرد مثبت و دارای CT کمتر از ۴۰ باشد، می توان آن را **مثبت** تلقی نمود و مطابق قسمت ۱۵، 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 می شود.
- 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.



تصویر ۱: نمودار تست HTLV در کانال سبز (Green) دستگاه Rotor-Gene

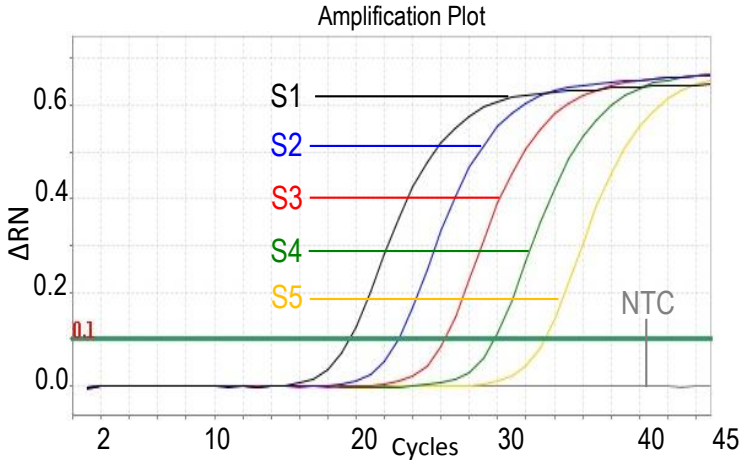


تصویر ۲: نمودار تست Albumin در کانال زرد (Yellow) دستگاه Rotor-Gene

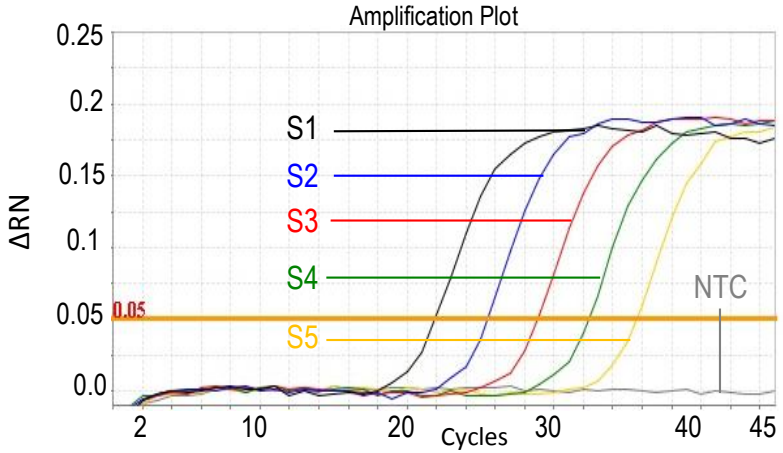
۱۴. آنالیز نتایج StepOne

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 و برای Albumin/VIC آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید.

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



تصویر ۳: نمودار تست HTLV در کانال FAM دستگاه StepOne



تصویر ۴: نمودار تست Albumin در کانال VIC دستگاه StepOne

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

توجه داشته باشید که افزایش تابش HTLV/FAM مربوط به HTLV و افزایش تابش Albumin/VIC حاصل از Albumin می باشد.

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.

- در صورتی که نمونه هم در کانال FAM و هم در کانال VIC مثبت و دارای CT کمتر از ۴۰ باشد، می توان آن را مثبت تلقی نمود و مطابق قسمت ۱۵، 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 می شود.

در صورتی که نمونه ای در کانال VIC منفی باشد، آزمایش باید تکرار شود. استخراج نامناسب یا خطا در تنظیم آزمایش میتواند دلیل چنین نتیجه ای باشد.

۱۵. محاسبه تیتر ویروس

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

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 می شود، proviral load در هر PBMC با استفاده از فرمول زیر تعیین می شود:

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

۱۶. 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 می باشد.

۱۷. 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 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.

HTLV RQ Kit Manual

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

For use with Rotor-Gene or StepOne
Research use only

NG-WI-ASL-13-200
Version 2.0
April 2018

Novin Gene

Table of Contents:

1. Introduction 2
2. Kit Contents 3
3. Storage and Stability 3
4. General Precautions 3
5. Additionally Required Materials 4
6. Specimen, Storage and Transport 4
7. Interfering Substances 5
8. DNA Isolation 5
9. PCR Protocol 5
10. Programming Rotor-Gene 6
11. Programming of StepOne 6
12. Programming Other Machines 7
13. Data Analysis: Rotor-Gene 7
14. Data Analysis: StepOne 9
15. Quantitation 10
16. Linear Range 11
17. Sensitivity 11

HTLV-I RQ kit is intended for the quantitative detection of HTLV-I provirus DNA with Rotor-Gene or StepOne machines. This kit is for research use only.

1. Introduction

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.

HTLV-I RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection and quantitation of HTLV-I provirus and cellular titer (based on Albumin gene) with Rotor-Gene or StepOne machines. The Albumin gene also monitors extraction quality and prevents false negative results.

Currently Real-Time PCR provides the highest sensitivity and widest dynamic range among other methods for detection of HTLV-I and viral load determination. In this method application of fluorescent probes allows detection of amplified product. Analysis of fluorescent kinetics also leads to quantification of the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product.

2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with Rotor-Gene and StepOne templates and 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 copy/µl	250 µl
HTLV-Alb S2	Standard 2: 10,000 copy/µl	250 µl
HTLV-Alb S3	Standard 3: 1,000 copy/µl	250 µl
HTLV-Alb S4	Standard 4: 100 copy/µl	250 µl
HTLV-Alb S5	Standard 5: 10 copy/µl	250 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. 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 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.

5. 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
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

6. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood should be collected in sterile condition in proper 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 few days or at -20°C for up to few weeks.
Note: Do not freeze the aliquot specified for CBC!

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. 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)

9. 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 of 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 make sure 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.

10. Programming Rotor-Gene

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

On the CD provided with the kit open HTLV Template 0.2 or strip according tubes used. Then, click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save program on desired location.

11. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu click on Template and select the file on CD provided with the kit. Click on Plate Setup. Positive and Negative controls, standards and few samples are defined. You may change plate set up using right click options (copy, paste, clear). You may also add /remove samples or change sample name on “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment on desired location. Instrument will start shortly.

12. 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 10 min**	1 cycle
2	**95°C x 15 sec**	45 cycles
	60°C x 1 min	

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.

13. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing the results, make sure 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 manufacturer recommendations. Perform quantitative analysis for **HTLV-I (Green channel)**, and for **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 “Cycling A. Yellow”. You may also simply set threshold at 0.1 for both channels.

Refer to figures at the end of the text for typical graphs.

Consider following points when analyzing:

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.

- A sample is **positive** if it is positive in both Green and Yellow 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 Green channel (for HTLV-I) while it is positive for Albumin in Yellow channel with a CT within the Albumin standards.
- Results are **inconclusive** if a sample is negative in 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.

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

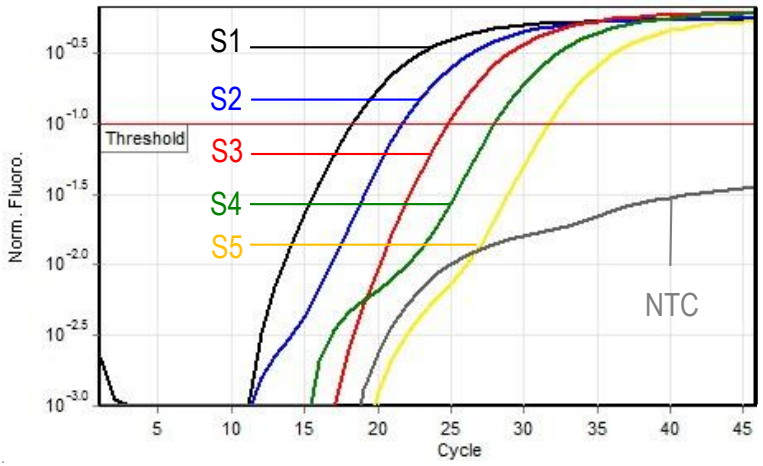


Figure 1: Typical HTLV-I Graph in Green Channel for Rotor-Gene

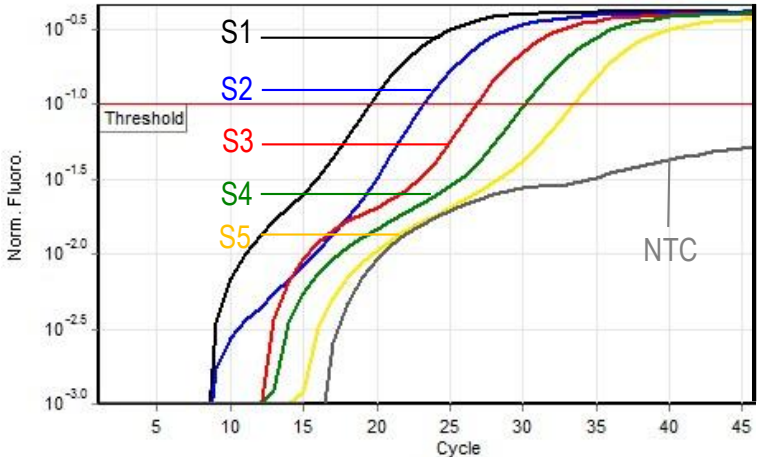


Figure 2: Typical Albumin Graph in Yellow Channel for Rotor-Gene

14. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on Analyze and set the threshold for **HTLV/FAM** at 0.1 and at 0.05 for **Albumin/VIC**.

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** 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.

Figures 3 and 4 represent typical graphs for StepOne machine.

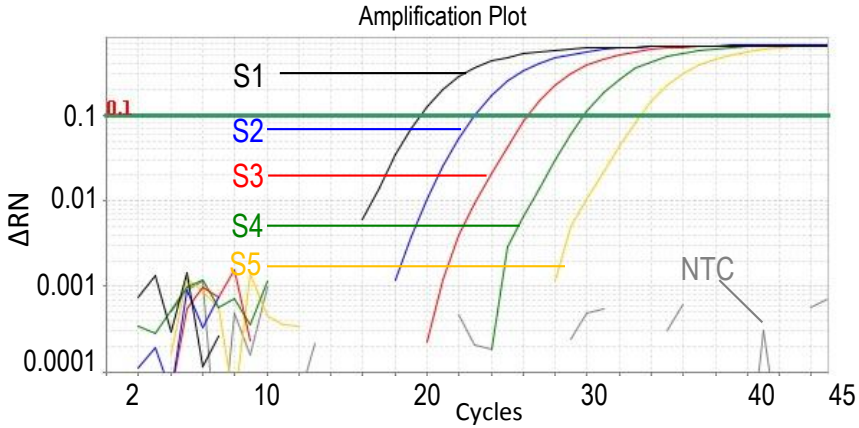


Figure 3: Typical HTLV-I Graph in FAM Channel for StepOne

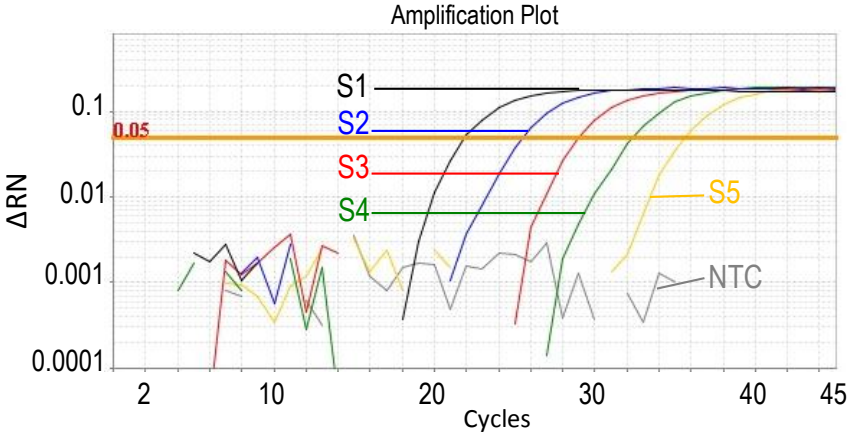


Figure 4: Typical Albumin Graph in VIC Channel for StepOne

15. 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:

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

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.

16. 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 copy/µl for HTLV-I and 1 copy/µl for Albumin.