راهنمای کیت Herpes RQ

جهت تشخیص ویروس های CMV, HSV-1, HSV-2, EBV, VZV
به روش Multiplex Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-34-100
ویرایش ۱/۱
خرداد ۱۳۹۹

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱. مقدمه..... ۲

۲. محتویات کیت..... ۳

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت..... ۳

۴. سایر موارد مورد نیاز..... ۳

۵. نکات قابل توجه..... ۴

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

۷. عوامل مزاحم..... ۵

۸. کنترل داخلی..... ۵

۹. استخراج DNA..... ۶

۱۰. دستورکار PCR..... ۶

۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۷

۱۲. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۸

۱۳. تحلیل نتایج..... ۸

۱۴. میزان حساسیت..... ۱۳

کیت **Herpes RQ** جهت کار با دستگاه Rotor-Gene و برای تشخیص DNA ویروسهای سیتومگالو ویروس (Cytomegalovirus, CMV)، ویروس هرپس سیمپلکس تایپ ۱ و ۲ (Herpes Simplex Virus, HSV)، ویروس اپشتین بار(Epstein-Barr virus, EBV) و ویروس واریسلا زوستر (Varicella Zoster Virus, VZV) در نمونه می باشد. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی است.

۱. مقدمه

CMV، HSV-1، HSV-2، EBV و VZV همگی از ویروس های خانواده هرپس ویریده (Herpesviridae) بوده و ژنوم آن ها از DNA دو رشته ای تشکیل شده است. این ویروس ها بسیار شایع می باشند و در گستره ای از بیماری ها نقش دارند. از جمله مهمترین آنها می توان به آنسفالیت و مننژیت اشاره نمود.

کیت حاضر امکان تشخیص و تفکیک همزمان این پنج ویروس را به روش multiplex Real-Time PCR با هدف کاهش هزینه و افزایش سرعت عمل فراهم می‌کند. در این روش با استفاده از پروب های نشاندار شده به رنگ‌های فلورسنت می توان محصول PCR را در خلال آزمایش بررسی نمود. با توجه به این که پس از پایان واکنش، نیازی به بررسی محصول PCR به روش الکتروفورز وجود ندارد، احتمال ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene طراحی شده است. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می‌باشد که از گزارش منفی کاذب حاصل از ناکارآمدی استخراج DNA یا مهار PCR پیشگیری می‌کند.

۲. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
CMV-EBV Mix	میکس PCR برای تشخیص CMV و EBV	۳۶۰ میکرولیتر
HSV-VZV Mix	میکس PCR برای تشخیص HSV-1 و HSV-2 و VZV	۳۶۰ میکرولیتر
HH Pos Ctrl	شاهد مثبت	۱۰۰ میکرولیتر
HH IC	کنترل داخلی	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* ۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و 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 تیوب درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارآیی 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
- ورتکس (Vortex Mixer)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA به همراه تجهیزات و مواد مورد نیاز آن
- 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 میکروتیوب ها) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به میکروتیوب 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 باز کردن درپوش تیوب های درون کیت، آن‌ها را کاملاً ذوب نموده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر تیوب 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.

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش با این کیت، می تواند پلاسمای خون محیطی (peripheral blood) ، مایع مغزی نخاعی یا بافت باشد. نمونه را می توان در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود و در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیتر ویروس در آن ثابت می ماند.

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

۸. کنترل داخلی

برای ارزیابی کیفیت استخراج یا مهار واکنش و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، این کیت حاوی کنترل داخلی می‌باشد.

کنترل داخلی را می باید در مرحله استخراج استفاده نمایید. به این منظور، هنگام استخراج DNA، 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 صورت موفق بودن PCR کنترل داخلی با میکس CMV-EBV منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد و CT بین ۲۸ تا ۳۲ می شود.

۹. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه از روش‌ها و کیت‌های 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 DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAamp UltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAamp MiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۱۰. دستورکار PCR

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

هر نمونه از نظر وجود DNA ویروسی CMV, HSV-1, HSV-2, EBV, VZV باید بررسی شود. به این منظور دو آزمایش PCR در دو سری میکروتیوب های جداگانه انجام می شود. در سری اول برای بررسی CMV و EBV علاوه بر یک میکروتیوب برای هر نمونه بیمار، دو میکروتیوب نیز برای شاهدهای مثبت و منفی (آب) در نظر بگیرید. در سری دوم نیز برای بررسی HSV-1، HSV-2 و VZV علاوه بر یک

میکروتیوب برای هر نمونه بیمار، دو میکروتیوب نیز برای شاهدهای مثبت و منفی (آب) در نظر بگیرید. بر این مبنا به تعداد مورد نیاز، میکروتیوب در دو سری جداگانه روی بلوک سرد بگذارید.

به هر میکروتیوب سری اول، ۱۵ میکرولیتر از میکس CMV-EBV اضافه کنید.

به هر میکروتیوب سری دوم، ۱۵ میکرولیتر از میکس HSV-VZV اضافه نمائید.

سپس ۱۰ میکرولیتر از DNA نمونه و یا شاهدهای مثبت و منفی (آب) به هر میکروتیوب اضافه کنید و درپوش میکروتیوب 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.

۱۱. 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 Herpes 0.2 یا Herpes 0.1 (با توجه به میکروتیوب های استفاده شده) دوبار 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 سپس فایل آزمایش را در پوشه مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید.

۱۲. تنظیم سایر دستگاه ها

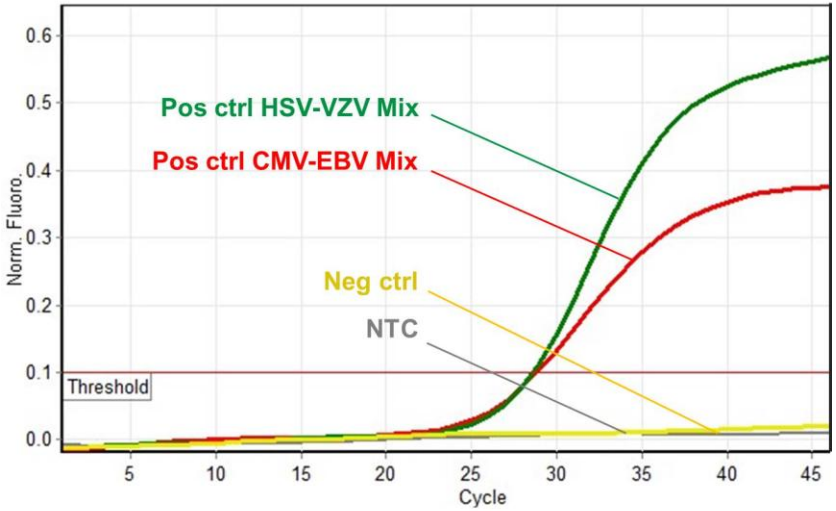
چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های Real-Time PCR استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمائید:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 10 min**	1
2	**95°C x 20 sec**	45
	60°C x 60 sec	

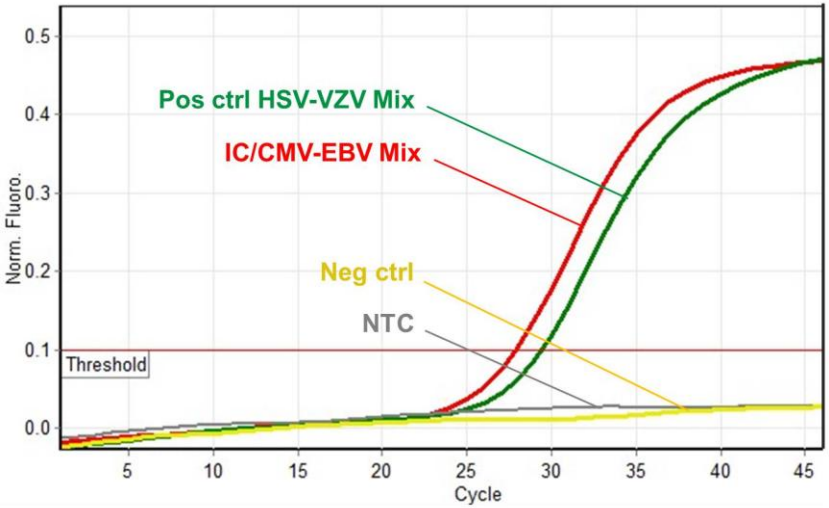
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM، VIC و ROX تنظیم شود.

۱۳. تحلیل نتایج

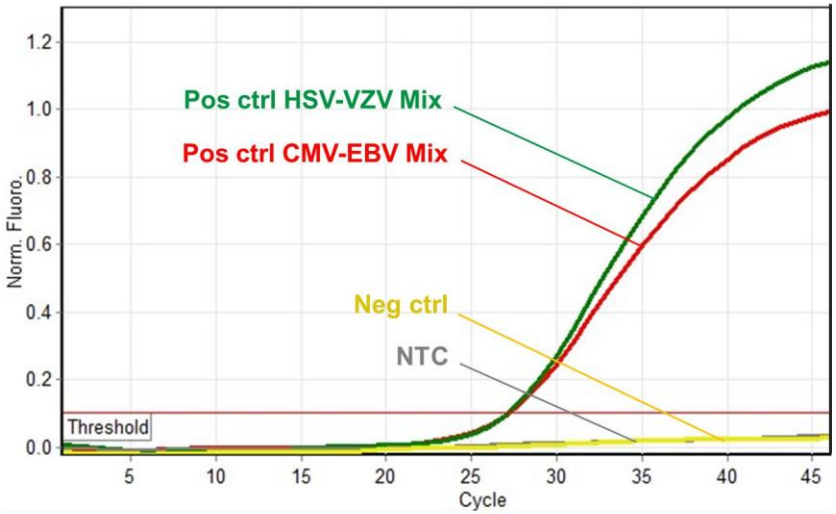
برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. آستانه (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید. همین مراحل را برای کانالهای زرد و نارنجی نیز تکرار کنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدهای مثبت و منفی و کنترل داخلی، تصاویر یک، دو و سه را ملاحظه فرمائید.



شکل ۱. منحنی شاهدها در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. منحنی شاهدها و کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه روتورژن



شکل ۳. منحنی شاهدها در کانال نارنجی دستگاه روتورژن

توجه داشته باشید در میکس **CMV-EBV** افزایش تابش سبز مربوط به **EBV**، افزایش تابش زرد مربوط به کنترل داخلی و افزایش تابش نارنجی مربوط به **CMV** می باشد.

در میکس **HSV-VZV** افزایش تابش سبز مربوط به **HSV-1**، افزایش تابش زرد مربوط به **HSV-2** و افزایش تابش نارنجی مربوط به **VZV** می باشد.

توضیحات فوق به طور خلاصه در جدول یک آمده است.

میکس	کانال سبز	کانال زرد	کانال نارنجی
میکس CMV-EBV	EBV	کنترل داخلی	CMV
میکس HSV-VZV	HSV-1	HSV-2	VZV

جدول۱. ارتباط نتایج به دست آمده با عوامل مورد بررسی در میکس های یک و دو در کانال های سبز، زرد و نارنجی دستگاه روتورژن

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 میشود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می باشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه با میکس CMV-EBV در **کانال سبز** مثبت و CT آن کمتر از ۴۰ باشد، نمونه برای **EBV** مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه با میکس CMV-EBV در **کانال نارنجی** مثبت و CT آن کمتر از ۴۰ باشد، برای **CMV** مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه با میکس HSV-VZV در **کانال سبز** مثبت و CT آن کمتر از ۴۰ باشد، برای **HSV-1** مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه با میکس HSV-VZV در **کانال زرد** مثبت و CT آن کمتر از ۴۰ باشد، برای **HSV-2** مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه با میکس HSV-VZV در **کانال نارنجی** مثبت و CT آن کمتر از ۴۰ باشد، برای**VZV** مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه با میکس CMV-EBV در هر دو کانال سبز و نارنجی منفی باشد و در **کانال زرد** دارای منحنی سیگموئیدی و CT بین ۲۸ تا ۳۲ باشد، نمونه منفی و فاقد ویروس های **CMV** و **EBV** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که نمونه در هر سه کانال **سبز**، **زرد** و **نارنجی** میکس HSV-VZV منفی بوده، و با میکس CMV-EBV در **کانال زرد** مثبت و دارای

CT بین ۲۸ تا ۳۲ باشد، نمونه فاقد ویروس های **HSV-1**، **HSV-2** و **VZV** و منفی در نظر گرفته می شود.

- در صورتی که نمونه در هر سه کانال **سبز**، **زرد** و **نارنجی** در دو میکس منفی باشد، آزمایش، نامعتبر بوده و باید **تکرار** شود.

تفسیر نتایج، در جدول ۲ خلاصه شده است.

Mix	Green	Yellow	Orange	Result
CMV-EBV	+	+/-	-	Pos: EBV
CMV-EBV	-	+/-	+	Pos: CMV
HSV-VZV	+	-	-	Pos: HSV-1
HSV-VZV	-	+	-	Pos: HSV-2
HSV-VZV	-	-	+	Pos: VZV

Mix	Green	Yellow	Orange	Result
CMV-EBV	-	+	-	Negative
HSV-VZV	-	-	-	

Mix	Green	Yellow	Orange	Result
CMV-EBV	-	-	-	Invalid
HSV-VZV	-	-	-	

جدول۲. تفسیر نتایج آزمایش در سه کانال سبز، زرد و نارنجی دستگاه روتورژن.

۱۴. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت برای هر یک از ویروس های مورد مطالعه با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس بررسی شده است. این مقدار حساسیت برای CMV، HSV-1 و HSV-2، ۰/۵ کپی در میکرولیتر، و برای VZV و EBV ، ۱ 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.

Herpes RQ Kit Manual

For Multiplex Real-Time PCR Detection of CMV, HSV-1, HSV-2 , EBV and VZV DNA

For use with Rotor-Gene
Research use only

NG-WI-ASL-34-100
Version 1.1
Spring 2020

Novin Gene

Table of Contents:

1. Introduction 2
2. Kit Contents 2
3. Storage and Stability 3
4. Additionally Required Materials 3
5. General Precautions 4
6. Specimen, storage and transport 4
7. Interfering substances 4
8. Internal control (IC) 5
9. DNA isolation 5
10. PCR Protocol 6
11. Programming of the Rotor-Gene 6
12. Programming other machines 7
13. Data Analysis 7
14. Sensitivity 11

Herpes RQ kit is intended for use with Rotor-Gene and for the detection of Cytomegalovirus (CMV), Herpes Simplex virus-1 (HSV-1), Herpes Simplex virus-2 (HSV-2), Epstein Barr virus (EBV) and Varicella Zoster virus (VZV) DNA. This kit is for research use only.

1. Introduction

CMV, HSV-1, HSV-2, EBV and VZV, are all members of Herpesviridae family and have double-stranded DNA genome. These viruses are among common human pathogens and involved in a wide spectrum of diseases including CNS infections.

Herpes RQ kit, provides a fast, sensitivite and also cost-effective Multiplex Real-Time PCR system for detection of multiple viruses from Herpesviridae family (CMV, HSV-1, HSV-2, EBV and VZV) in variety of samples. In this method application of fluorescent dye labeled probes allows detection of amplified product in the reaction without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product.

This kit is intended for use with Rotor-Gene. This kit also incorporates an Internal Control to identify possible DNA extraction failure or PCR inhibition.

2. Kit Contents

The kit contains a manual or quick guide, a CD with Rotor-Gene templates and following reagents:

Label	Content	Quantity
CMV-EBV Mix	PCR mix* for CMV and EBV	360 µl
HSV-VZV Mix	PCR mix* for HSV-1, HSV-2 and VZV	360 µl
HH Pos Ctrl	Positive control	100 µl
HH IC	Internal control	250 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

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

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
- Vortex Mixer
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit and required equipments/items
- PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

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 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 ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Do not place PCR microtubes on crushed ice. Use cooling blocks instead.

6. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood plasma, CSF or tissue should be collected in sterile condition in proper and sterile containers. Samples can be stored at +4°C for few days or 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. Internal Control (IC)

In order to evaluate the possibility of DNA extraction failure and PCR inhibition and prevent false negative results, Herpes RQ kit contains internal control (IC). IC should be used during extraction process and should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample. Required volume of internal control is 10% of elution buffer. For instance, if extracted DNA is eluted with 100ul, then 10ul of internal control should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample. Please note that internal control should not be added directly to the patient sample (i.e. before addition of lysis buffer) as it loses its efficiency.

In a successful DNA extraction and PCR test, IC should generate a CT of 28-32 in Yellow channel with CMV-EBV Mix.

9. 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)
- QIAamp UltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAamp MiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

10. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely followed by a brief mixing and a quick spin.

Each sample should be evaluated for DNA of CMV, HSV-1, HSV-2, EBV and VZV, in two different series of microtubes. In first series, examining CMV and EBV DNA, consider one tube for each sample plus one for each controls. In second series, examining HSV-1, HSV-2 and VZV DNA, consider one tube for each sample plus one for each controls. Place required number of tubes on cold block.

In first series of microtubes, pipette 15µl of CMV-EBV Mix to each PCR microtube.

In second series of microtubes, pipette 15µl of HSV-VZV Mix to each PCR microtube

Then add 10ul of extracted DNA, positive or negative controls to each tube.

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

Note: In Rotor-Gene machine, attach the locking ring.

11. 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 Herpes 0.2 or Herpes 0.1 according to the tubes used. Program starts. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save program on desired location.

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
2	**95°C x 20 sec**	45
	60°C x 60 sec	

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

13. Data Analysis

Analyze data according to manufacturer recommendations. 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 Yellow and Orange channels and manually put threshold on 0.1. Figures 1, 2 and 3 represent typical graphs for Rotor-Gene.

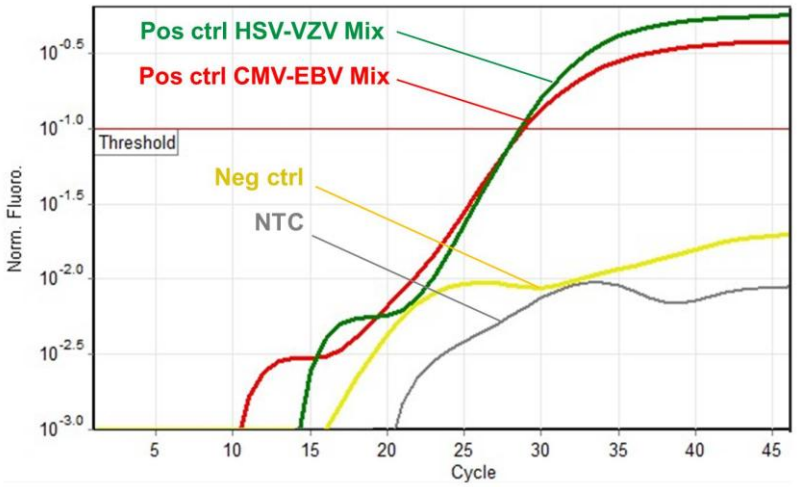


Fig 1. Typical Controls graph in Green channel for Rotor-Gene

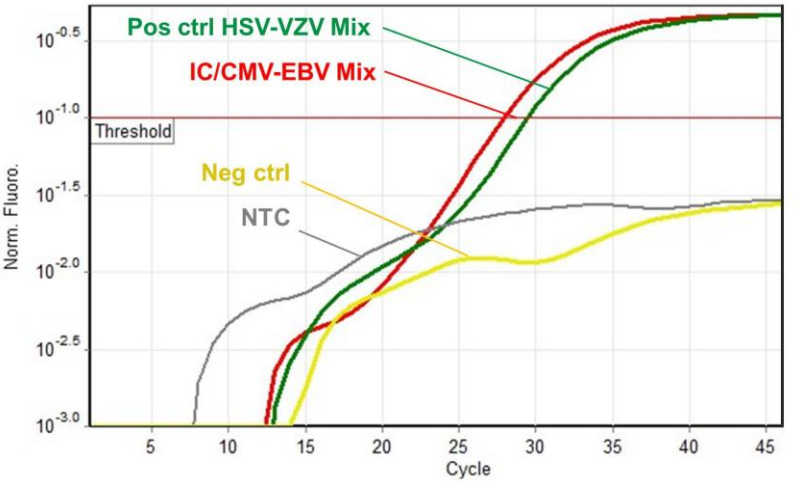


Fig 2. Typical Controls graph in Yellow channel for Rotor-Gene

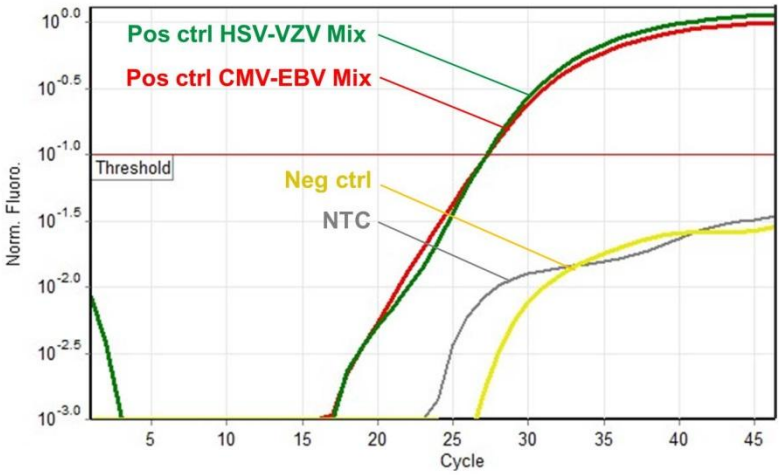


Fig 3. Typical Controls graph in Orange channel for Rotor-Gene

To interpret the results, please note that:

- In **CMV-EBV Mix**, a signal in **Green channel** is due to **EBV**, in **Yellow channel** due to **IC** and in **Orange channel** due to **CMV**.
- In **HSV-VZV Mix**, a signal in **Green channel** is due to **HSV-1**, in **Yellow channel** due to **HSV-2** and in **Orange channel** due to **VZV**.

Table 1 summarizes the above explanation.

Mix	Green Channel	Yellow Channel	Orange Channel
CMV-EBV	EBV	IC	CMV
HSV-VZV	HSV-1	HSV-2	VZV

Table 1: Association of obtained results with evaluated pathogens in two mixes and Green, Yellow and Orange channels of 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 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 EBV,** if it is positive in Green channel with CMV-EBV Mix and a CT of less than 40.
- A sample is **Positive for CMV,** if it is positive in Orange channel with CMV-EBV Mix and a CT of less than 40.
- A sample is **Positive for HSV-1** if it is positive in Green channel with HSV-VZV Mix and a CT of less than 40.
- A sample is **Positive for HSV-2** if it is positive in Yellow channel with HSV-VZV Mix and a CT of less than 40.
- A sample is **Positive for VZV** if it is positive in Orange channel with HSV-VZV Mix and a CT of less than 40.
- A sample is **Negative for CMV and EBV**, if it is negative in Green and Orange channels while it is positive in Yellow channel with a sigmoid graph and a CT of 28-32.
- A sample is **Negative for HSV-1, HSV-2 and VZV**, if it is negative in Green, Yellow and Orange channels while it is positive in Yellow channel of CMV-EBV Mix with a sigmoid graph and CT of 28-32.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in all three channels of Green, Yellow and Orange and the Yellow channel of CMV-EBV Mix.

Interpretation of results is summarized in table 2.

Mix	Green	Yellow	Orange	Result
CMV-EBV	+	+/-	-	Pos: EBV
CMV-EBV	-	+/-	+	Pos: CMV
HSV-VZV	+	-	-	Pos: HSV-1
HSV-VZV	-	+	-	Pos: HSV-2
HSV-VZV	-	-	+	Pos: VZV

Mix	Green	Yellow	Orange	Result
CMV-EBV	-	+	-	Negative
HSV-VZV	-	-	-	

Mix	Green	Yellow	Orange	Result
CMV-EBV	-	-	-	Invalid
HSV-VZV	-	-	-	

Table 2. Interpretation of results in Green, Yellow and Orange channels of Rotor-Gene

14. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit for each target was assessed with dilution series of the cloned DNA and showed a sensitivity of 0.5 copy/µl for CMV, HSV-1 and HSV-2; and 1 copy/µl for EBV and VZV.