

# راهنمای کیت VZV RQ

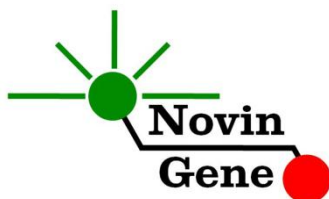
جهت تشخیص و کمیت سنجی ویروس واریسلا زوستر به روش  
Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne  
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-41

ویرایش ۱/۰

بهار ۱۴۰۰



## 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.....                           | ۷  |
| ۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene.....                | ۷  |
| ۱۲. تنظیم دستگاه StepOne.....                   | ۸  |
| ۱۳. تنظیم سایر دستگاه ها.....                   | ۹  |
| ۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene.....                | ۹  |
| ۱۵. آنالیز نتایج StepOne.....                   | ۱۲ |
| ۱۶. محاسبه تیترو ویروس.....                     | ۱۴ |
| ۱۷. محدوده خطی.....                             | ۱۵ |
| ۱۸. میزان حساسیت.....                           | ۱۵ |

کیت **VZV RQ** جهت کار با دستگاه Real-Time PCR و به منظور تشخیص و کمیت سنجی DNA ویروس واریسلا زوستر (Varicella Zoster Virus, VZV) در نمونه می باشد. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی است.

## ۱. مقدمه

ویروس واریسلا زوستر از ویروس های خانواده هرپس ویریده (Herpesviridae) است و ژنوم آن از DNA دو رشته ای به طول حدود ۱۲۵ هزار باز تشکیل شده است. عفونت با این ویروس در دوران کودکی منجر به بیماری آبله مرغان (واریسلا، varicella) می شود. به دنبال عفونت اولیه ویروس در عقده های عصبی به صورت نهفته و غیرفعال باقی می ماند. در بزرگسالان عوامل مختلفی از جمله ضعف سیستم ایمنی باعث فعال شدن ویروس و ایجاد بیماری زونا (zoster) می شود. همچنین عفونت در دوران بارداری می تواند به جنین آسیب جدی برساند و باعث نقایص مختلفی شود.

کیت حاضر امکان بررسی نمونه جهت تشخیص و تعیین تیتراژ ویروس را به روش Real-Time PCR فراهم می کند. این روش در مقایسه با سایر روش های ارزیابی میزان ویروس، دارای بیشترین حساسیت و وسیع ترین دامنه اندازه گیری می باشد. در این روش با استفاده از پروب های نشاندار شده به رنگ های فلورسنت می توان محصول PCR 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 اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول PCR وجود ندارد، احتمال ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت. این کیت برای استفاده با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می باشد که از گزارش منفی کاذب حاصل از استخراج نامناسب نمونه و یا مهار PCR پیشگیری می کند.

## ۲. محتویات کیت

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

| برچسب   | محتوا                                 | حجم           |
|---------|---------------------------------------|---------------|
| VZV Mix | میکس آماده برای PCR*                  | ۳۶۰ میکرولیتر |
| VZV S1  | استاندارد ۱: ده هزار کپی در میکرولیتر | ۱۵۰ میکرولیتر |
| VZV S2  | استاندارد ۲: یک هزار کپی در میکرولیتر | ۱۵۰ میکرولیتر |
| VZV S3  | استاندارد ۳: یک صد کپی در میکرولیتر   | ۱۵۰ میکرولیتر |
| VZV S4  | استاندارد ۴: ده کپی در میکرولیتر      | ۱۵۰ میکرولیتر |
| VZV 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 لوله 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 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 ها) 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 باز کردن درپوش لوله های درون کیت، آن ها را کاملاً ذوب نموده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات 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 یخ های 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)، سواب زخم، 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 تیترو 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 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 بیلروبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰ میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمی کند.

## ۸. کنترل داخلی

برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار واکنش و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، این کیت حاوی کنترل داخلی می باشد.

کنترل داخلی را می توانید در مرحله استخراج استفاده نموده یا صرفاً در مرحله PCR آن را به VZV Mix اضافه نمایید. در حالت اول، کنترل داخلی علاوه بر

بررسی مهار واکنش، نشانگر کیفیت استخراج نیز می باشد. برای استفاده در مرحله استخراج، کنترل داخلی را پس از افزودن بافر lysis به نمونه، اضافه کنید. میزان مورد نیاز از کنترل داخلی ده درصد حجم حلال نهایی (elution buffer) می باشد. یعنی در صورتی که DNA را نهایتاً در ۱۰۰ میکرولیتر بافر حل می کنید، 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 کارایی خود را از دست خواهد داد.

در صورتی که کنترل داخلی را به VZV Mix اضافه می نمایید، تنها می توانید مهار واکنش PCR را بررسی کنید. به این منظور به ازای هر واکنش PCR، یک میکرولیتر از کنترل داخلی را به VZV Mix اضافه نمایید. به طور مثال برای ۱۰ واکنش به ۱۵۰ میکرولیتر از میکس، ۱۰ میکرولیتر کنترل داخلی اضافه کنید و مخلوط حاصل را مطابق توضیحات قسمت ۱۰ استفاده نمایید.

در صورت موفق بودن استخراج و واکنش PCR، کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۸ تا ۳۲ در دستگاه Rotor-Gene و ۲۸ تا ۳۴ در دستگاه StepOne می شود.

## ۹. استخراج DNA

برای استخراج DNA 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 DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampUltraSens® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

- QIAampMiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

## ۱۰. دستور کار PCR

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید. تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، ۴ لوله برای استانداردها و یک لوله برای کنترل منفی نیز در نظر بگیرید.

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

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به **VZV Mix** اضافه نمایید، مطابق توضیحات قسمت ۸ کنترل داخلی را به میکس افزوده و ۱۵ میکرولیتر از مخلوط حاصل را به هر لوله منتقل کنید.

در پایان ۱۰ میکرولیتر از **DNA** استخراج شده، **استاندارد** 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: 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 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. تنظیمات دستگاه را میتوانید مطابق جدول بخش ۱۳ انجام دهید و یا اینکه در لوح فشرده همراه کیت روی فایل VZV 0.2 یا VZV 0.1 (با توجه به لوله 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 مور نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند. در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای استانداردها standard را انتخاب کنید. سپس غلظت استانداردها را در ستون سمت راست با عنوان given concentration وارد کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

## ۱۲. تنظیم دستگاه StepOne

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

از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. یک کنترل منفی به همراه چهار استاندارد و سه نمونه از پیش تعریف شده اند. استانداردها، کنترل منفی و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای اینکار 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.

### ۱۳. تنظیم سایر دستگاهها

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

| Step | Temperature and time | Cycles |
|------|----------------------|--------|
| 1    | <b>95°C x 10 min</b> | 1      |
| 2    | <b>95°C x 15 sec</b> | 45     |
|      | <b>60°C x 60 sec</b> |        |

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگهای FAM و VIC تنظیم شود. VZV Mix موجود در کیت حاوی ROX می باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می باشد.

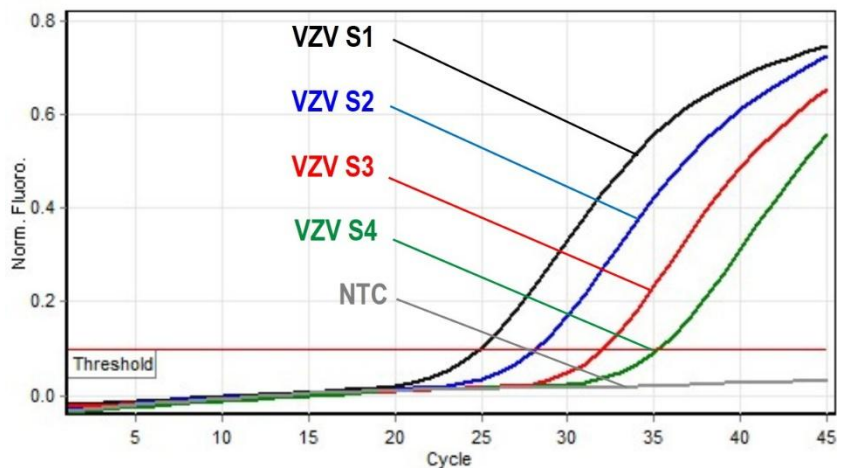
### ۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Quantitation Analysis را انتخاب کرده و روی 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 در منوی Analysis مجدداً Quantitation و سپس Yellow را کلیک کنید. در پنجره autofind threshold دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید.

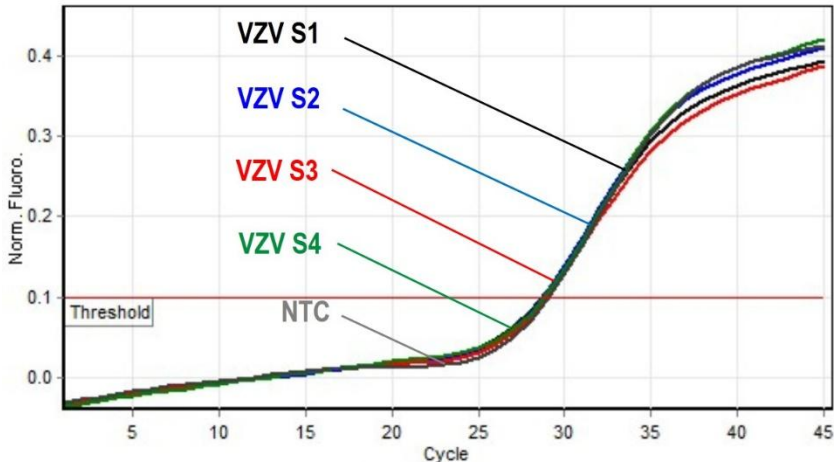
برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید.

توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **VZV** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **کنترل داخلی** 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.



شکل ۱. منحنی استانداردهای VZV در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه روتورژن

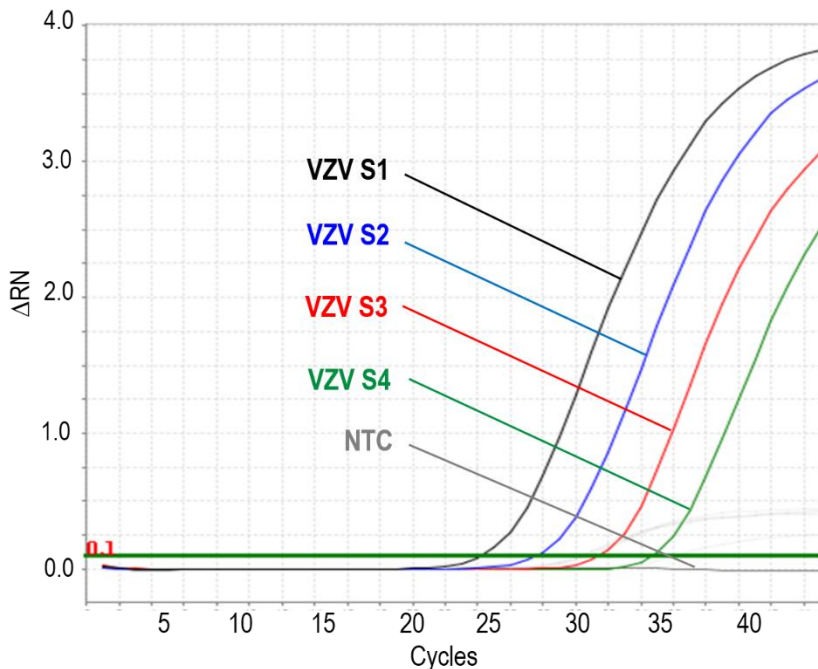
نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال سبز مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد می‌توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیترا محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال سبز منفی باشد ولی در کانال زرد مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۲ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال سبز و زرد منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

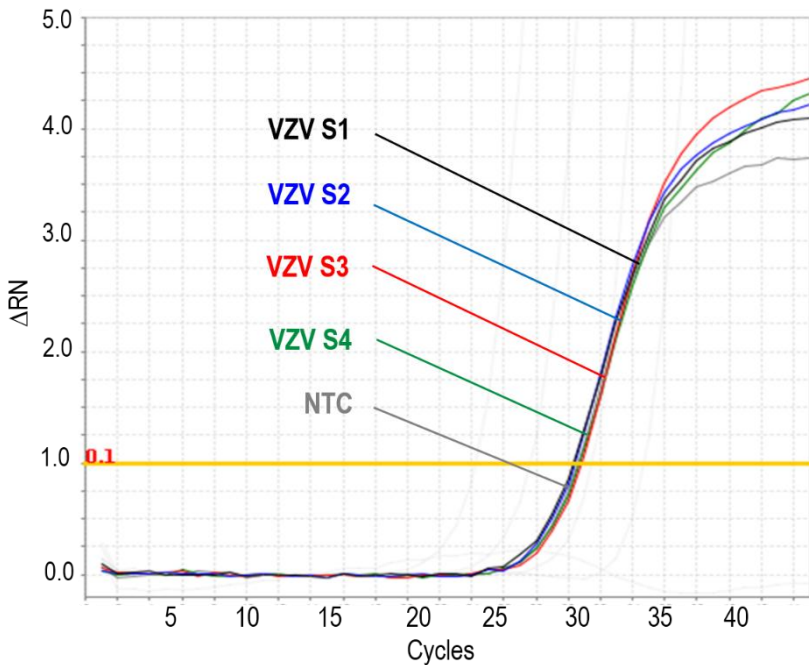
## ۱۵. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. آستانه (threshold) را برای VZV/FAM و برای IC/VIC روی ۰/۱ قرار دهید.

برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.



شکل ۳. منحنی استانداردهای VZV در کانال FAM دستگاه استپ وان



شکل ۴. منحنی کنترل داخلی در کانال VIC دستگاه استپ وان

توجه داشته باشید که افزایش **تابش VZV/FAM** مربوط به **VZV** و افزایش **تابش IC/VIC** حاصل از کنترل داخلی 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 میشود و **CT** آن در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال VZV/FAM مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال IC/VIC می‌توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیترا محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال VZV/FAM منفی باشد ولی در کانال IC/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۴ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال VZV/FAM و IC/VIC منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

## ۱۶. محاسبه تیترا ویروس

هر کیت حاوی ۴ استاندارد کمی با غلظت مشخص می‌باشد که با استفاده از آن‌ها منحنی استاندارد رسم شده و میزان ویروس در نمونه بیمار معین می‌شود. استانداردهای کیت با واحد کپی در میکرولیتر (copy/μl) مشخص شده‌اند. برای تبدیل نتایج به صورت کپی در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Result(copy/ml)} = \frac{\text{Result (copy/}\mu\text{l)} \times \text{elution volume (}\mu\text{l)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

به طور مثال چنانچه ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما استخراج و DNA حاصل در ۵۰ میکرولیتر بافر حل شود، نتایج باید در عدد ۲۵۰ ضرب شوند تا به کپی در میلی لیتر (copy/ml) تبدیل شوند.

## ۱۷. محدوده خطی

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

## ۱۸. میزان حساسیت

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



# **VZV RQ Kit Manual**

**For Real-Time PCR Detection and  
Quantitation of Varicella Zoster virus  
(VZV) DNA**

For use with Rotor-Gene or StepOne  
Research use only

NG-WI-ASL-41  
Version 1.0  
Spring 2021



## Table of Contents:

|                                          |    |
|------------------------------------------|----|
| 1. Introduction .....                    | 2  |
| 2. Kit Contents .....                    | 2  |
| 3. Storage and Stability .....           | 3  |
| 4. General Precautions.....              | 3  |
| 5. Additionally Required Materials ..... | 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 of StepOne(/Plus) .....  | 7  |
| 13. Programming other machines .....     | 7  |
| 14. Data Analysis: Rotor-Gene.....       | 8  |
| 15. Data Analysis: StepOne .....         | 10 |
| 16. Quantitation.....                    | 12 |
| 17. Linear Range.....                    | 13 |
| 18. Sensitivity.....                     | 13 |

**VZV RQ kit** is intended for use with Real-Time PCR machine and for the quantitative detection of Varicella Zoster virus (VZV) DNA. This kit is for research use only.

## 1. Introduction

Varicella Zoster virus (VZV) is a double-stranded 125 kb DNA virus and a member of Herpesviridae family. Varicella (chickenpox) is the result of childhood infection. Following the initial infection virus remains latent in nervous ganglia. Reactivation of the virus in adults results in Zoster (shingles). Infection during pregnancy may also lead to congenital defects.

VZV RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection and quantitation of Varicella Zoster virus with Rotor-Gene or StepOne machines. This method provides the highest sensitivity and widest dynamic range among other available methods. In this method application of fluorescent dye labeled 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.

This kit also incorporates an *Internal Control* (IC) to identify possible extraction failure or PCR inhibition.

## 2. Kit Contents

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

| Label   | Content                    | Quantity |
|---------|----------------------------|----------|
| VZV Mix | PCR Master mix*            | 360 µl   |
| VZV S1  | Standard 1: 10,000 copy/µl | 150 µl   |
| VZV S2  | Standard 2: 1,000 copy/µl  | 150 µl   |
| VZV S3  | Standard 3: 100 copy/µl    | 150 µl   |
| VZV S4  | Standard 4: 10 copy/µl     | 150 µl   |
| VZV 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. 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 tubes on crushed ice. Use cooling blocks 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 pipettors and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves

## 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. The minimum sample volume recommended for testing is 200µl of plasma, which requires 0.5ml of whole blood.

## 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 ( $\leq 4.5$  mg/dl) and lipids ( $\leq 1000$  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, VZV RQ kit contains internal control (IC). IC can be used during extraction process or simply added to VZV Mix. To monitor both DNA extraction and PCR reaction, internal control 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.**

If IC is added to VZV Mix, only PCR inhibition can be monitored. For this purpose, 1ul of IC reagent should be added to each reaction. For example, for 10 PCR reactions, 15ul of internal control should be added to 150ul of VZV Mix before it is added to the tubes. In a successful DNA extraction and PCR test, Internal control should generate a CT of 28-32 in Yellow Channel on Rotor-Gene and a CT of 28-34 in VIC channel on StepOne.

## 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)
- QIAampUltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampMiniElute 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. Place required number of tubes on cold block. Consider one tube for each sample plus one for each standard and one for the negative control.

**If IC is introduced during extraction process, pipette 15µl of VZV Mix to each PCR tube.**

**If IC is added to the VZV Mix, add 15ul of the prepared mix (as described in section 8) to each PCR tube.**

**Then add 10ul of extracted DNA, standard or water to each tube.**

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are capped 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.*

## 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 VZV Template 0.1 or VZV 0.2 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 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. One negative control, 4 standards and 10 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 names on “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment on desired location. Instrument will start shortly.

## 13. 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    | <b>95°C x 10 min</b> | 1      |
| 2    | <b>95°C x 15 sec</b> | 45     |
|      | <b>60°C x 60 sec</b> |        |



Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC dyes. The VZV Mix contains ROX. Final concentration of ROX in reaction is 300nM.

#### 14. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure in the sample menu all the standards have been defined as "standard" and the relative concentrations have been entered. Patient samples should be defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively.

Analyze data according to manufacturer recommendations. Perform quantitative analysis for **VZV (Green channel)** and qualitative analysis for **Internal Control (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 but cancel the Automatic Threshold and manually put threshold on 0.1. Figures 1 and 2 represent typical graphs for Rotor-Gene machine.

**Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of 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 Green channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results in the Cycling A. Green are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in Green channel while it is positive in Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 28-32.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of Green and Yellow channels.

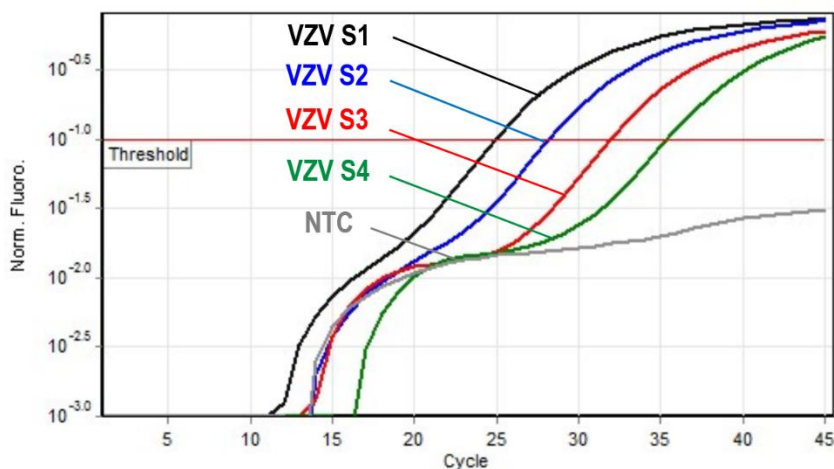


Fig 1. Typical VZV graph in Green channel for Rotor-Gene

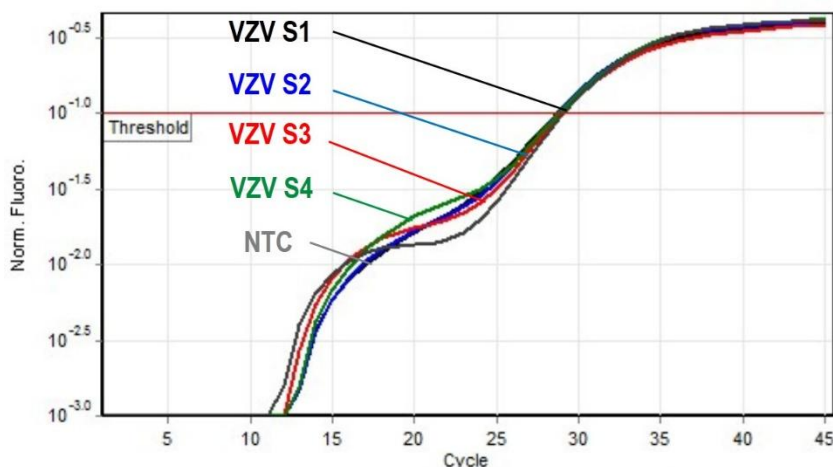


Fig 2. Typical IC graph in Yellow channel for Rotor-Gene

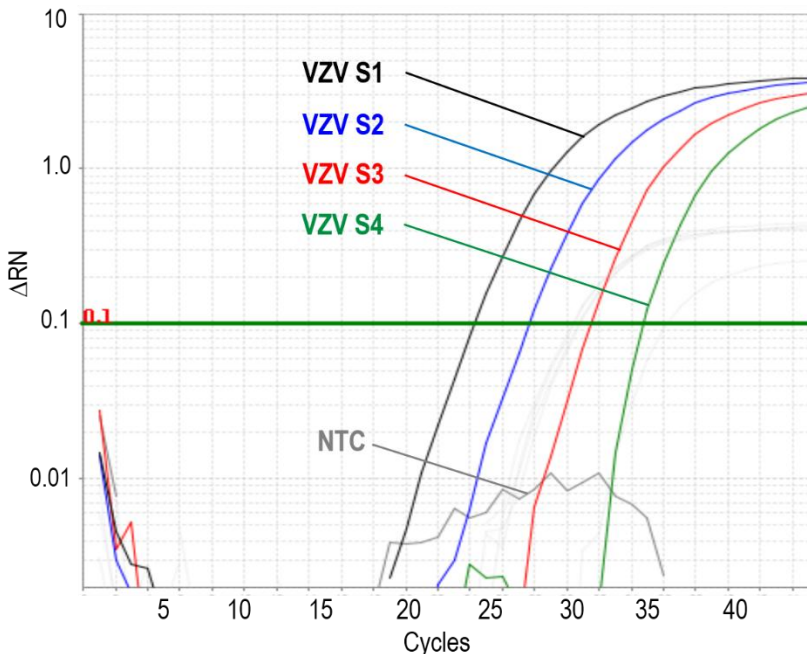
## 15. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on Analyze and set the threshold for VZV/FAM and IC/VIC at 0.1. Figures 3 and 4 represent typical graphs for StepOne machine.

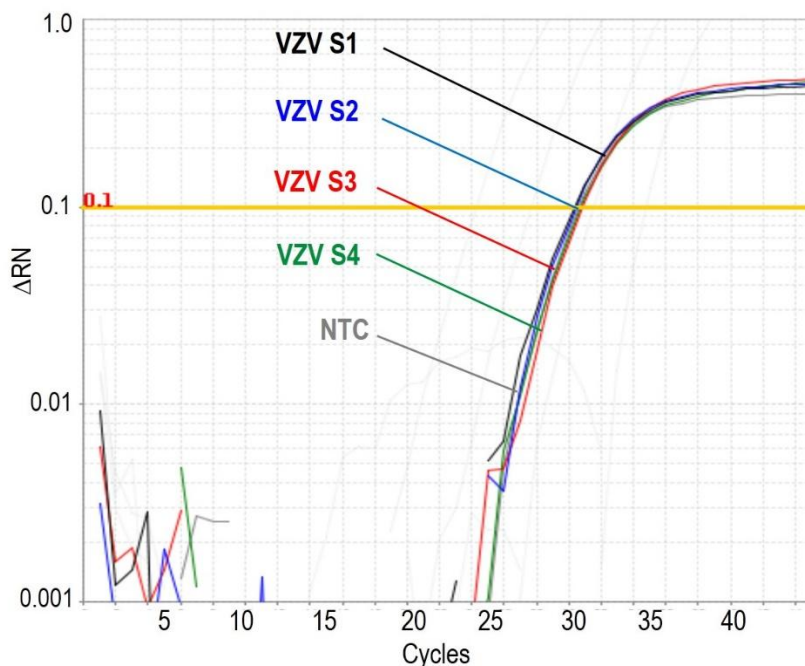
**Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.**

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in FAM/VZV channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in FAM/VZV channel while it is positive in VIC/IC channel with a sigmoid graph and CT of 28-34.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated
- if a sample is negative in both of FAM/VZV and VIC/IC channels.



**Fig 3.** Typical VZV graph in FAM channel for StepOne



**Fig 4.** Typical IC graph in VIC channel for StepOne

## 16. Quantitation

The kit provides 4 quantitation standards with defined titers to generate a standard curve for quantification of samples viral load. Working with Rotor-Gene machine, the standard curve from a previous run can also be imported for quantification of samples to the recent run. To do so, at least one standard must be used in the current run. Apparently using all five standards in each run will lead to more accurate results.

Quantitation standards are defined as copy/ $\mu$ l. To convert the result to copy/ml following equation should be used:

$$\text{Result (copy/ml)} = \frac{\text{Result(copy/}\mu\text{l)} \times \text{elution volume (}\mu\text{l)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

“Sample volume” is the plasma volume used for DNA isolation and  
“Elution volume” is the volume of buffer or water used to elute or  
dissolve isolated DNA.

## **17. 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 100,000,000 copies/ $\mu\text{l}$  to 10 copy/ $\mu\text{l}$ .

## **18. 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 4 copy/ $\mu\text{l}$ .