

# راهنمای کیت HCV Genotype TM

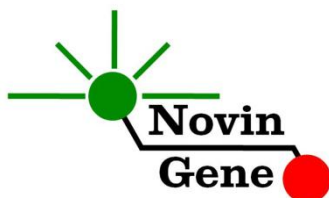
جهت تعیین ژنوتایپ ویروس هپاتیت C  
به روش Real-Time RT-PCR

جهت کار با دستگاه StepOne  
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-04-200

ویرایش ۲/۰

اسفند ۱۳۹۵



## 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 PCR ..... ۷
۱۰. تنظیم دستگاه SetepOne ..... ۷
۱۱. تنظیم سایر دستگاه ها ..... ۸
۱۲. آنالیز نتایج StepOne ..... ۹
۱۳. میزان حساسیت ..... ۱۲

کیت HCV Gen TM جهت تعیین ژنوتایپ ویروس هپاتیت C تایپ ۱، ۲ و ۳ و برای کار با دستگاه StepOne طراحی شده است. این کیت مخصوص مصارف تحقیقاتی می باشد.

## ۱. مقدمه

ویروس هپاتیت C (Hepatitis C Virus, HCV) مهم ترین عامل سیروز و سرطان کبد می باشد. تا کنون شش ژنوتایپ مختلف این ویروس شناخته شده است.

بر اساس مطالعات بالینی، تیترو ویروس در خون بیمار قبل از شروع درمان و همچنین ژنوتایپ ویروس مجموعاً مهمترین عواملی هستند که در انتخاب رژیم درمانی و پیش بینی نتیجه درمان موثر می باشند. به همین دلیل پس از تشخیص، تعیین تیترو و همچنین تشخیص ژنوتایپ ویروس اهمیت ویژه ای دارد. به علاوه از آنجا که ژنوتایپ های این ویروس 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 مطالعات فیلوژنتیک می باشد. به دلیل محدودیت های فنی، استفاده از این روش به طور مستمر و روزانه در آزمایشگاه های بالینی ممکن نمی باشد. بنابراین از روش های دیگر که عمدتاً مبتنی بر PCR می باشند استفاده می شود.

کیت حاضر 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 را

بررسی نمود بدون این که پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. لذا، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت. این کیت برای استفاده با دستگاه StepOne طراحی شده است. این کیت قادر به تشخیص سایر ژنوتایپ های هپاتیت C شامل تایپ ۴، ۵ و ۶ نمی باشد.

## ۲. محتویات کیت

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

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

\* یک، دو یا چهار تیوب، 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 میکس واکنش بیش از چند بار خودداری کنید چرا که باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن 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 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 واکنش حاوی مواد لازم برای سنتز *cdNA* و *PCR* میباشد.

#### 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 وسایل مخصوص به خود را، به ویژه سمپلر، باید 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 آنها 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 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 هپاتیت C با این کیت، پلاسمای خون محیطی (peripheral blood plasma) 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 پلاسمای در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیترو و ویروس در آن ثابت می ماند.

حداقل نمونه توصیه شده برای آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما می باشد که نیازمند نیم 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 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 Viral RNA Mini Kit (Cat. no. 52904, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAamp UltraSens<sup>®</sup> Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAamp MiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

## ۹. دستور کار PCR

ابتدا تمامی لوله های کیت 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 نیازی لوله را روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، چهار لوله برای شاهد های مثبت و منفی نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله ۱۲/۵ میکرولیتر از **HCV Gen Mix TM** 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: در صورت استفاده از دستگاه **StepOne** لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

### ۱۰. 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 (**HCV Gen**). از منوی سمت چپ **Plate Setup** و سپس دکمه **Assign Targets and Samples** را انتخاب کنید. سه شاهد مثبت برای تایپ های ۱ تا ۳، یک شاهد منفی و تعدادی نمونه از پیش تعریف شده اند. شاهد ها 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 اضافه کرده و نام نمونه ها را نیز مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید و دکمه Start Run را کلیک کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

### 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 مرحله چهارم (یعنی ۵۰ سیکل نهایی) و در دمای ۶۲ درجه و برای رنگ های FAM، VIC و ROX انجام شود.

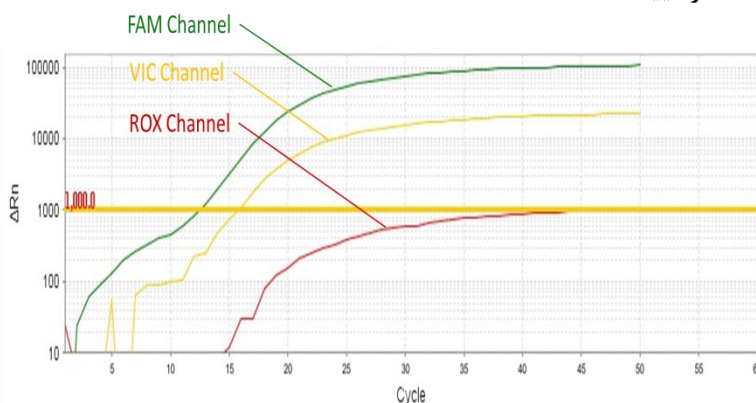
توجه داشته باشید که در این آزمایش ROX نباید به عنوان رنگ مرجع (Passive Reference Dye) انتخاب شود.

## ۱۲. آنالیز نتایج StepOne

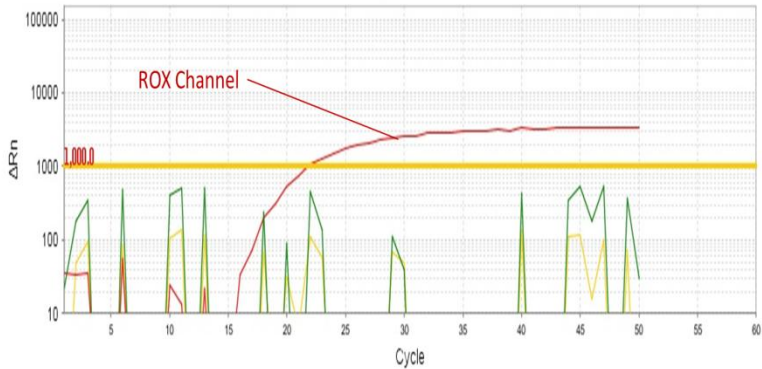
برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای هر سه کانال FAM, VIC و ROX آستانه (threshold) را روی ۱۰۰۰ قرار دهید.

برای تفسیر سریع و آسان نتایج، در منوی آنالیز، خانه مربوط به نمونه مورد نظر را انتخاب کنید تا نمودار آن نمایش داده شود. در قسمت Graph Type گزینه log، در قسمت Plot Color گزینه target و در منوی زیر نمودار در قسمت Target گزینه all را انتخاب کنید. گرافی که از خط آستانه عبور کرده و دارای کمترین CT می باشد، تعیین کننده ژنوتایپ نمونه می باشد. توجه داشته باشید که افزایش تابش FAM مربوط به تایپ ۱، افزایش تابش VIC مربوط به تایپ ۲ و افزایش تابش ROX مربوط به تایپ ۳ می باشد.

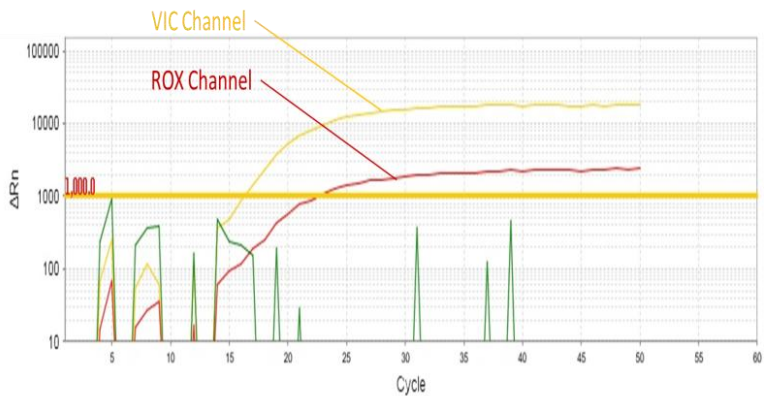
برای مشاهده نمودار مورد انتظار برای شاهد های مثبت، تصاویر ۱، ۲ و ۳ را ملاحظه فرمایید.



تصویر ۱: نمودار شاهد تایپ ۱ در کانال های FAM, VIC و ROX



تصویر ۲: نمودار شاهد تایپ ۲ در کانال های VIC, FAM و ROX



تصویر ۳: نمودار شاهد تایپ ۳ در کانال های VIC, FAM و ROX

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموئیدی 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 بر اساس نکات زیر نیز می توانید تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال **FAM** مثبت و دارای CT کمتر از ۴۰ باشد، حاوی **ژنوتایپ ۱** می باشد. این نمونه در کانال **VIC** نیز ممکن است واکنش داشته باشد اما CT آن حداقل دو واحد بزرگتر خواهد بود.
- در صورتی که نمونه در کانال **VIC** مثبت و دارای CT کمتر از ۴۰ باشد، حاوی **ژنوتایپ ۳** می باشد. این نمونه در کانال **ROX** نیز ممکن است واکنش داشته باشد اما CT آن حداقل شش واحد بزرگتر خواهد بود.
- در صورتی که نمونه در کانال **ROX** مثبت و دارای CT کمتر از ۴۰ باشد، حاوی **ژنوتایپ ۲** می باشد.
- در صورتی که نمونه همزمان در هر دو کانال **FAM** و **VIC** مثبت باشد و CT آن در کانال **VIC** کمتر از دو واحد با CT آن در کانال **FAM** فاصله داشته باشد، **حاوی هر دو ژنوتایپ ۱ و ۳** می باشد.
- در صورتی که نمونه بطور همزمان در هر سه کانال **FAM**، **VIC** و **ROX** منفی باشد، حالات زیر را باید در نظر گرفت:
- نمونه از نظر هپاتیت **C** منفی است.
- نمونه از نظر هپاتیت **C** تایپ ۱ یا ۲ یا ۳ مثبت است اما تیتراژ 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.**

### ۱۳. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس هپاتیت C تایپ ۱ بررسی شده است و معادل شش واحد در میکرولیتر (IU/ $\mu$ l) می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیترو ویروس در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، ژنوتایپ آن توسط این کیت قابل تعیین خواهد بود. در صورت کاهش تیترو نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینانی به مراتب کمتر.

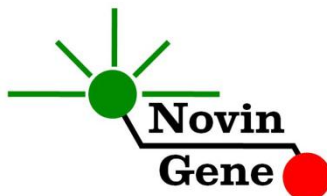
# **HCV Genotype TM**

## **Kit Manual**

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

For use with StepOne  
Research use only

NG-WI-ASL-04-200  
Version 2.0  
March 2017



## 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. RNA Isolation.....	5
9. RT-PCR Protocol.....	5
10. Programming of StepOne.....	6
11. Programming Other Machines.....	6
12. Data Analysis: StepOne.....	7
13. Sensitivity.....	10

**HCV Gen TM** kit is intended for the genotyping of HCV types 1, 2 and 3 using RNA extracted from plasma. It is designed for use with StepOne instrument. This kit is 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 the 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 TM kit provides a ready-to-use One-Step Real-Time RT-PCR system for genotyping of HCV types 1, 2 and 3. This method application of fluorescent probes provides data about reaction kinetics. Analysis of fluorescent kinetics leads to detection and genotyping of the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis therefore, reducing the possibility of contamination with the PCR product. This kit is designed to be used with StepOne instrument. This kit does not detect other HCV types including types 4, 5 and 6.



## 2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with StepOne template and following reagents:

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

\* 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 especially for HCV Gen Mix 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 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 0.2ml PCR tubes on crushed ice. Use cold 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
- RNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves

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

## 6. Specimen, Storage and Transport

We recommend EDTA or citrate plasma for HCV detection and typing. Peripheral blood should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. Whole blood or plasma should be shipped at +4°C. Upon receipt, plasma should be separated from whole blood and can be 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 ( $\leq 4.5$  mg/dl) and lipids ( $\leq 1000$  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 the following:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat. no. 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Cat. no. 52904, 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).

## 9. RT-PCR Protocol

Thaw the reagents on crushed 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 four for positives and negative control.

**Pipette 12.5µl of HCV Gen TM Mix directly to each tube followed by adding 12.5µl of isolated RNA or control.**

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.*

### 10. 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. Three positive controls for HCV types, one negative control and a few samples are defined. You may change plate set up using right click options (copy, past, 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.

*Note! ROX should not be selected as reference dye in this test.*

### 11. Programming Other Machines

**HCV Gen TM** kit is intended for use with StepOne 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	<b>50°C x 30 min</b>	1
2	<b>95°C x 15 min</b>	1
3	<b>95°C x 15 sec</b>	10
	<b>63°C x 15 sec</b>	
	<b>72°C x 15 sec</b>	
4	<b>95°C x 15 sec</b>	50
	<b>62°C x 15 sec</b>	
	<b>72°C x 15 sec</b>	

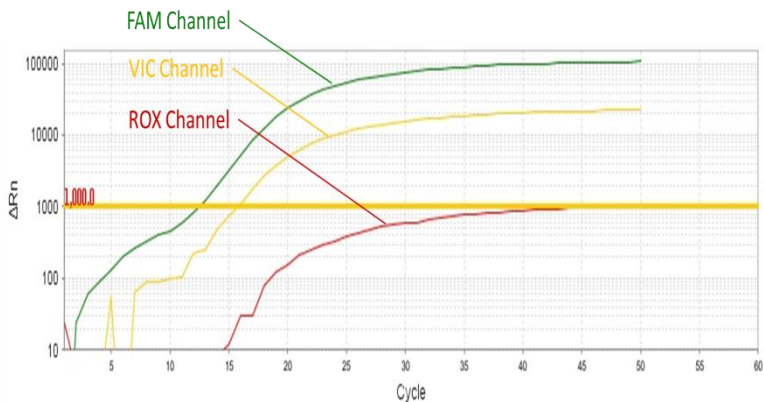
Fluorescence should be collected at 62°C for FAM, VIC and ROX during the final 50 cycles (section 4 of the profile).

*Note! ROX should not be selected as reference dye in this test.*

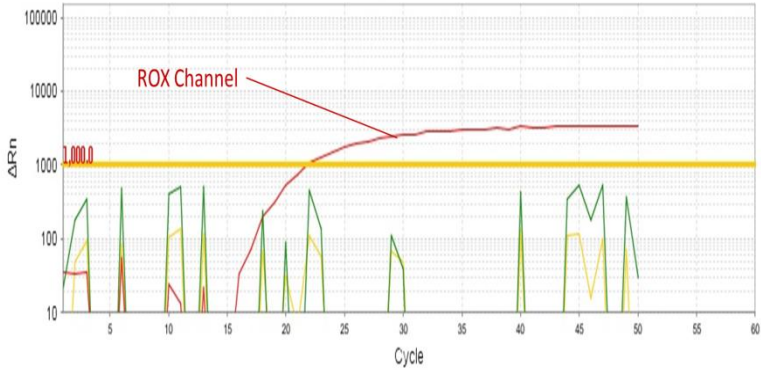
## 12. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly set threshold to 1000 for all three channels of FAM, VIC and ROX.

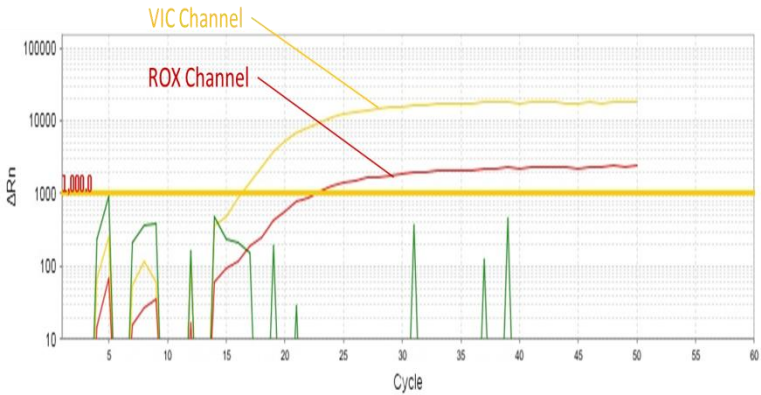
For quick and easy interpretation of results, in analysis menu select the sample to view its graph. In the graph submenu named as “Target”, select the item “all”. Now, the lowest CT shows the sample type. Note that a signal in **FAM channel is due to Type 1**, in **VIC channel due to Type 3** and in **ROX channel due to Type 2**. Figures 1, 2 and 3 represent typical graphs of 3 genotypes for StepOne machine.



**Figure 1:** HCV Type 1 graph in FAM, VIC & ROX Channels



**Figure 2:** HCV Type 2 graph in FAM, VIC & ROX Channels



**Figure 3:** HCV Type 3 graph in FAM, VIC & ROX 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.**

For more details consider the following points:

- Sample contains **HCV Type 1**, if it is positive in **FAM** channel. It may react in **VIC** channel with a CT of about 2 units or more above **FAM** CT.
- Sample contains **HCV Type 3**, if it is positive in **VIC** channel. It may react in **ROX** channel with a CT of about 6 units or more above **VIC** CT.
- Sample contains **HCV Type 2**, if it is positive in **ROX** channel.
- Sample contains both **HCV Type 1** and **HCV Type 3**, if it is positive in both of **FAM** and **VIC** channels while the CT of **VIC** channel is less than 2 units apart from **FAM** CT.

If sample is negative in all three channels of FAM, VIC and ROX, there are following possibilities:

- Sample is negative for HCV.
- Sample is positive for HCV genotypes 1, 2 and 3, but the viral load is lower than the test sensitivity.
- Sample is positive for other HCV genotypes including 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.*

### **13. Sensitivity**

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the cloned target (partial type 1 genome) and showed a limit of detection equal to 6 IU/ $\mu$ l.





