

راهنمای کیت

Aspergillus RQ4

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۱/۱

جهت تشخیص DNA کپک قارچی Aspergillus به روش Real-Time PCR
جهت کار با دستگاه Rotor-Gene چهار کاناله و بالاتر
مخصوص تحقیقات

Σ 24 (Cat# Aspergillus4RQ24)

Σ 48 (Cat# Aspergillus4RQ48)

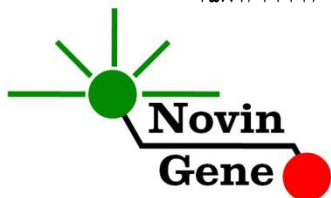
Σ 96 (Cat# Aspergillus4RQ96)

HB NG-WI-ASL-57-101

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶



فهرست مندرجات:

۱. مقدمه.....	۳
۲. حیطه کاربرد.....	۳
۳. اطلاعات زمینه ای.....	۳
۴. اساس آزمایش.....	۴
۵. محتویات کیت.....	۴
۶. مدل های بسته بندی.....	۵
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت.....	۵
۸. محدودیت کاربرد.....	۵
۹. سایر موارد مورد نیاز.....	۶
۱۰. احتیاط و اقدامات لازم.....	۶
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن.....	۷
۱۲. عوامل مزاحم.....	۷
۱۳. کنترل داخلی.....	۸
۱۴. استخراج DNA.....	۹
۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش.....	۹
۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها.....	۱۰
۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene.....	۱۰
۱۸. تنظیم سایر دستگاه ها.....	۱۲
۱۹. آنالیز نتایج Rotor-Gene.....	۱۲
۲۰. میزان حساسیت.....	۱۶
۲۱. روش امحاء.....	۱۶

۲۲.	پشتیبانی فنی.....	۱۶
۲۳.	اطلاعات تماس.....	۱۷
۲۴.	منابع.....	۱۷
۲۵.	توضیحات برچسب.....	۱۸

۱. مقدمه

کیت Aspergillus RQ4 جهت تشخیص DNA کپک قارچی آسپرژیلوس به روش Real-time PCR طراحی شده است. در این روش، DNA به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین میکس این کیت حاوی سری ثانویه ای از پرایمرها و پروب جهت شناسایی یک توالی سنتتیک به عنوان کنترل داخلی می‌باشد. کنترل داخلی از گزارش منفی کاذب ناشی از استخراج نامناسب و یا مهار PCR جلوگیری می‌کند. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

۲. حیطه کاربرد

کیت Aspergillus RQ4 امکان بررسی نمونه بیمار را جهت تشخیص ۴ نوع از گونه‌های آسپرژیلوس شامل گونه‌ی فامیگاتوس (*A. fumigatus*)، فلاووس (*A. flavus*)، ترئوس (*A. terreus*) و نیگر (*A. niger*) با روش Real-Time PCR با تشخیص ناحیه ITS قارچ فراهم می‌کند. بدون تفکیک دو گونه ی نیگر و ترئوس از یکدیگر. این کیت جهت استفاده با دستگاه Rotor-Gene 4plex و مدل های بالاتر طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

آسپرژیلوس (*Aspergillus*) نوعی کپک قارچی فرصت طلب است که در خاک و محیط اطراف به فراوانی یافت می‌شود. تا کنون بیش از چند صد گونه آسپرژیلوس شناسایی شده اند که حدود چهل گونه آنها برای انسان بیماری زا هستند. در این بین فامیگاتوس (*A. fumigatus*)، فلاووس (*A. flavus*)، ترئوس (*A. terreus*) و نیگر (*A. niger*) شیوع بیشتری دارند. این قارچ عمدتاً در بیماران دارای سیستم ایمنی تضعیف شده منجر به عفونت در سیستم تنفسی و گاهی اندام های دیگر

می‌شود. عفونت می‌تواند به صورت تظاهرات آلرژیک بروز پیدا کند گرچه یکی از علل مهم مرگ در میان این بیماران نیز می‌باشد. در چنین مواردی تشخیص زودهنگام عامل عفونت در کنترل و مدیریت بیماری حائز اهمیت بالایی است.

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی عامل عفونی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز Polymerase Chain Reaction/PCR انجام می‌شود. طی این واکنش ماده ژنتیکی عامل عفونی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می‌شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب‌های فلورسنت قابل تشخیص می‌گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می‌توان وجود عامل عفونی را در نمونه تشخیص داد، بدون آنکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول واکنش با روش‌هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی با محصول PCR نیز برطرف می‌گردد.

۵. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک فلش کارت و مواد زیر می‌باشد:

برچسب	محتوا	حجم
ASPG 4C Mix	میکس آماده برای PCR *	۳۶۰ میکرولیتر
A.fum Pos	شاهد مثبت برای گونه فامیگاتوس	۱۰۰ میکرولیتر
A.fla Pos	شاهد مثبت برای گونه فلاووس	۱۰۰ میکرولیتر
A.ter Pos	شاهد مثبت برای گونه ترئوس	۱۰۰ میکرولیتر
A.nig Pos	شاهد مثبت برای گونه نیگر	۱۰۰ میکرولیتر
Internal Ctrl	کنترل داخلی *	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* ۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیت‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست و چهار، چهل و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می باشد.

۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل 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 جعبه کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند. از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید، زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آنها می شود. همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه ای و آموزش دیده طراحی شده است.
- تمامی مراحل کار بایستی مطابق دفترچه راهنمای کامل کیت انجام شود و هرگونه تغییری در آن منجر به بروز خطا در نتایج می گردد.
- از محتویات کیت نباید پس از گذشت تاریخ انقضای درج شده روی کیت استفاده نمود.
- در صورت تغییر رنگ لیبل حرارتی (به صورتی یا قرمز) حتی به صورت جزئی کیت نباید مورد استفاده قرار گیرد.
- این کیت تنها برای مصارف تحقیقاتی طراحی شده و برای تشخیص طبی مورد تایید نمی باشد.

۹. 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 ۱/۵ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۱۰. احتیاط و نکات لازم

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 PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.
- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.

- پیش از باز کردن درپوش لوله های درون کیت، آنها را کاملاً ذوب نموده و با چند تکان ملایم، از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله 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 روی یخ خرد شده خودداری کنید.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش اسپرژیلوس با این کیت، نمونه خون کامل می‌باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می‌تواند EDTA یا سیترات باشد. همچنین از نمونه هایی مانند پلاسما، مایع مغزی نخاعی و مایع لاواژ برونکو الوئولا (bronchoalveolar lavage, BAL) نیز می‌توان استفاده کرد. نمونه در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد برای چند ساعت قابل نگهداری است و برای زمان های طولانی تر می باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر یا پائین تر نگهداری شود. در چنین شرایطی نمونه تا چندین روز پایدار می‌ماند.

۱۲. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می‌شود. 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 نمی‌باشد.

مقادیر بالای بیلی روبین (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 نمی‌کند.

۱۳. کنترل داخلی

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

کنترل داخلی را می‌توانید در مرحله استخراج استفاده نموده یا آن را صرفاً در مرحله PCR به ASPG 4C Mix اضافه نمایید. در حالت اول، کنترل داخلی علاوه بر بررسی مهار واکنش، نشانگر کیفیت استخراج نیز می‌باشد. 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) 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 کارایی خود را از دست خواهد داد.

در صورتی که کنترل داخلی را به ASPG 4C Mix اضافه می‌نمایید، تنها می‌توانید مهار واکنش PCR را بررسی کنید. به این منظور به ازای هر واکنش PCR، یک میکرولیتر از کنترل داخلی را به ASPG 4C 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 بخش ۱۵ استفاده نمایید. در صورت موفق بودن واکنش، کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۷ تا ۳۲ می‌شود.

۱۴. استخراج DNA

جهت استخراج بایستی از کیت‌های مخصوص استخراج DNA قارچ استفاده نمود. برای استخراج از نمونه خون استفاده از کیت زیر توصیه می‌شود:

- QIAamp® UCP PurePathogen Blood Kit (Cat. no. 50112, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی لوله‌ها 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 نمونه‌های مورد آزمایش، یک لوله برای کنترل مثبت 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 **ASPG 4C Mix** اضافه کنید.

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به **ASPG 4C Mix** اضافه نمایید،

مطابق توضیحات بخش ۱۳، 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، **شاهد** یا آب به هر لوله

اضافه کنید و درپوش لوله‌ها را ببندید. سپس آن‌ها را مطابق شماره‌ها داخل

دستگاه قرار دهید.

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

۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت Aspergillus RQ4 جهت کار با دستگاه MIC و Rotor-Gene 4plex چهارکاناله و یا مدل های بالاتر طراحی شده است.

۱۷. 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 وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.


فایل تمپلیت Aspergillus RQ4 را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل Aspergillus RQ4 0.1 یا Aspergillus RQ4 0.2 را با توجه به نوع لوله استفاده شده انتخاب کنید.

نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منوی نرم افزار، گزینه View، سپس Gain Optimisation را انتخاب کنید. در پنجره باز شده در Auto-Gain Optimisation Setup ابتدا گزینه Optimise Acquiring را بزنید. تنظیمات را دقیقاً مطابق تصویر صفحه بعد برای هر چهار کانال انجام دهید. Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس ASPG 4C باشد).

گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را فعال کنید و پنجره را ببندید.

Auto-Gain Optimisation Setup

Optimisation :

 Auto-Gain Optimisation will read the fluorescence on the inserted sample at different gain levels until it finds one at which the fluorescence levels are acceptable. The range of fluorescence you are looking for depends on the chemistry you are performing.

Set temperature to degrees.

☒ Perform Optimisation Before 1st Acquisition
☐ Perform Optimisation At 60 Degrees At Beginning Of Run

Channel Settings :

Name	Tube Position	Min Reading	Max Reading	Min Gain	Max Gain
Green	1	2FI	5FI	1	10
Orange	1	2FI	4FI	1	10
Red	1	2FI	5FI	1	10
Yellow	1	2FI	5FI	1	10

در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای کنترل مثبت Positive Control را انتخاب کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۸. تنظیم سایر دستگاه ها

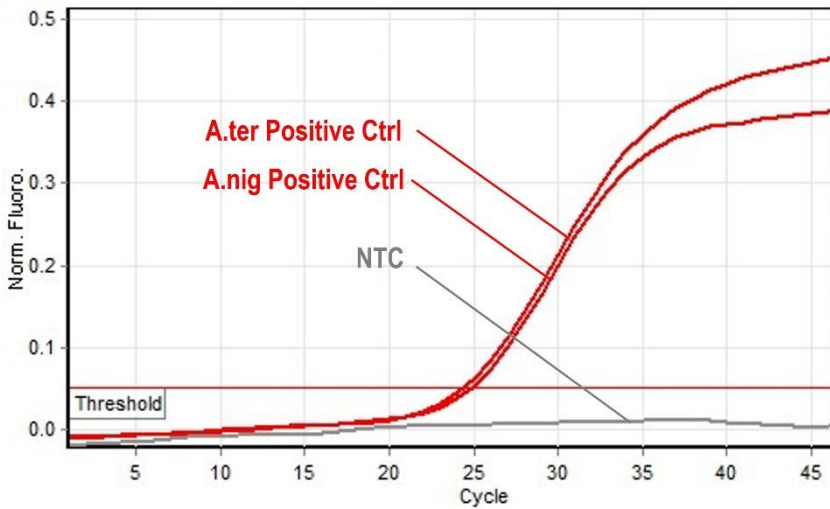
چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های Real-Time PCR استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 3 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

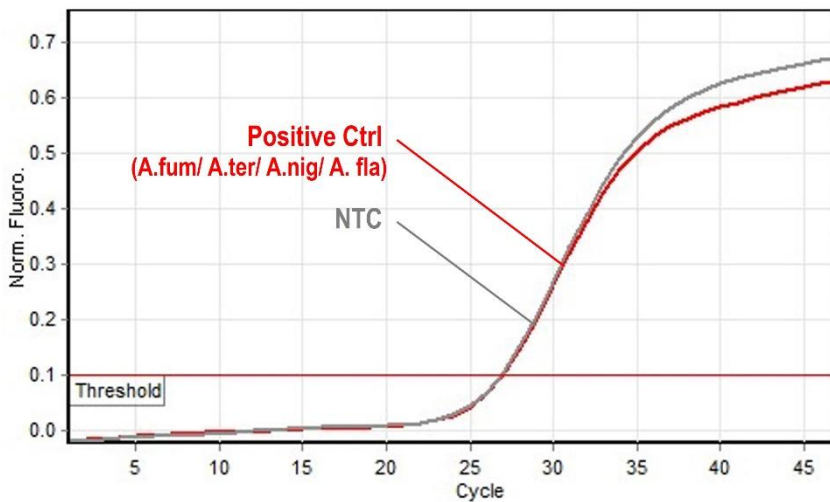
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های Green ، Yellow، Orange و Red تنظیم شود.

۱۹. آنالیز نتایج Rotor-Gene

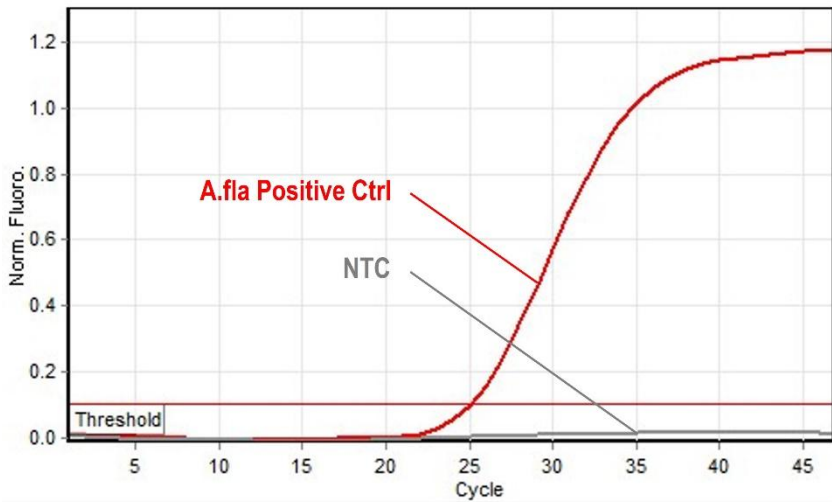
برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Quantitation Analysis را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold حداقل را روی ۰/۰۲ یا بالاتر از فلورسانس زمینه قرار داده و دکمه OK را بزنید تا پس از رسم منحنی استاندارد نتایج در جدول پایین صفحه نشان داده شوند. همچنین می توانید به طور ساده آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید. آستانه را برای کانال های Yellow، Orange و Red روی ۰/۱ تنظیم کنید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهد های مثبت و منفی و کنترل داخلی تصاویر ۱، ۲، ۳ و ۴ را ملاحظه فرمایید. توجه داشته باشید که افزایش تابش سبز (Green) مربوط به گونه های *A. niger* و *A. terreus* می باشد. افزایش تابش زرد (Yellow) حاصل از کنترل داخلی می باشد. همچنین افزایش تابش نارنجی (Orange) مربوط به گونه *A. flavus* و افزایش تابش قرمز (Red) حاصل از گونه *A. fumigatus* می باشد.



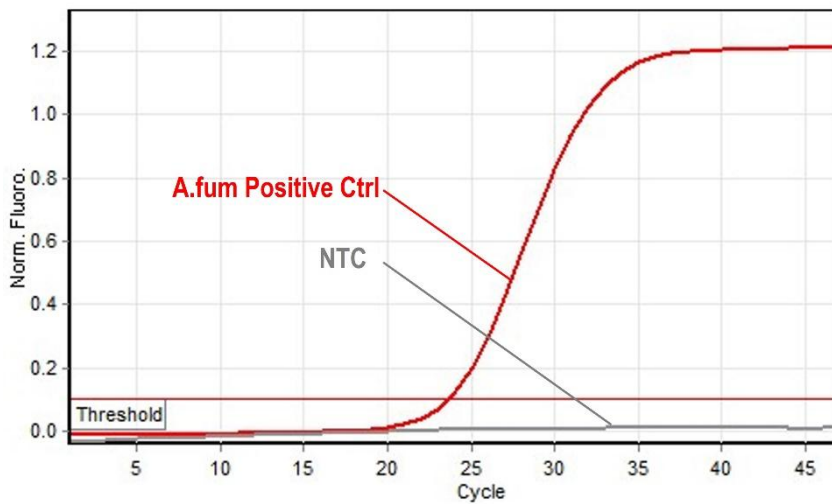
شکل ۱. منحنی شاهد‌ها در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه روتورژن



شکل ۳. منحنی شاهدها در کانال نارنجی دستگاه روتورژن



شکل ۴. منحنی شاهدها در کانال قرمز 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 می شود و CT آن در صورت وجود، فاقد ارزش می باشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** مثبت با CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال **زرد** می توان آن را برای گونه های ترئوس یا نیگر **مثبت** گزارش کرد.
 - در صورتی که نمونه در کانال **نارنجی** مثبت با CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال **زرد** می توان آن را برای گونه ی فلاووس **مثبت** گزارش کرد.
 - در صورتی که نمونه در کانال **قرمز** مثبت با CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال **زرد** می توان آن را برای گونه ی فامیگاتوس **مثبت** گزارش کرد.
 - در صورتی که یک نمونه در کانال **سبز**، **نارنجی** و **قرمز** منفی باشد ولی در کانال **زرد** مثبت و دارای منحنی سیگمویید و CT بین ۲۷ تا ۳۲ باشد، نمونه از نظر آسپرژیلوس **منفی** است.
 - در صورتی که نمونه در هر چهار کانال **سبز**، **زرد**، **نارنجی** و **قرمز** منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.
- خلاصه تفسیر نتایج آزمایش را می توانید در جدول صفحه ۱۶ مشاهده نمایید.

Green	Yellow	Orange	Red	Result
+	+/-			Pos for <i>A. niger</i> or <i>A. terreus</i>
	+/-	+		Pos for <i>A. flavus</i>
	+/-		+	Pos for <i>A. fumigatus</i>
-	+	-	-	Negative
-	-	-	-	Inconclusive

۲۰. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم آسپرژیلوس بررسی شده است و برای گونه های ترئوس و نیگر معادل ۲ کپی در میکرولیتر، برای فامیگاتوس معادل ۷ کپی در میکرولیتر و برای فلاووس معادل ۹ کپی در میکرولیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتراژ آسپرژیلوس در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیتراژ نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

۲۱. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی یا شیمیایی بوده و می توان آنها را مستقیماً به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه های عفونی آزمایشگاه را در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت حداقل یک شبانه روز قرار دهید و سپس آنها را به سطل زباله منتقل کنید.

۲۲. پشتیبانی فنی

برای ارتباط با بخش پشتیبانی فنی می توانید با شماره تلفن یا ادرس ایمیل زیر

تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

۲۳. اطلاعات تماس

شرکت نوین ژن پارس ویرا

آدرس: تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶
تلفن تماس:

۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com

وبسایت: www.novingene.com

۲۴. منابع

- Fosses Vuong, M., Hollingshead, C.M. and Waymack, J.R., 2023. Aspergillosis.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212
- Samson, R.A. and Varga, J., 2009. What is a species in Aspergillus? Medical Mycology, 47(s1), pp.S13–S20.
- Van, H., Geert Cauwenbergh and Donald., 2013. Aspergillus and Aspergillosis. Springer Science & Business Media.

۲۵. توضیحات برچسب

 دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید	 تولید کننده	 جهت مصارف پژوهشی RUO
 تاریخ انقضاء	 تعداد <n> آزمون کافی	 کدبهر (شماره بچ) LOT
 محدوده دمایی -30°C	 شماره سریال SN	 شماره کاتالوگ REF

برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.ir مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.


Aspergillus RQ4 Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.1

For Real-Time PCR Detection of Aspergillus DNA
For use with Rotor-Gene 4 plex or higher
For Research use only

 24 (Cat# Aspergillus4RQ24)

 48 (Cat# Aspergillus4RQ48)

 96 (Cat# Aspergillus4RQ96)

 NG-WI-ASL-57-101

RUO



NovinGene ParsVira

No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

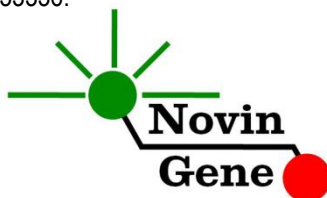


Table of Contents

1. Introduction	3
2. Intended Use	3
3. Background Information	3
4. Test Principle	4
5. Kit Contents	4
6. Packaging models	4
7. Storage and Stability	5
8. Product Use Limitations	5
9. Additionally Required Materials	5
10. General Precautions	6
11. Specimen, Storage and Transport	6
12. Interfering Substances	6
13. Internal Control (IC)	7
14. DNA Isolation	7
15. PCR Protocol	8
16. Devices and software	8
17. Programming Rotor-Gene	8
18. Programming Other Machines	9
19. Data Analysis: Rotor-Gene	10

20. Sensitivity.....	13
21. Disposal Method	14
22. Technical Support.....	14
23. Contact Information.....	14
24. References	14
25. Symbols	15

1. Introduction

Aspergillus RQ4 kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting Aspergillus DNA. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit. This Mix also contains a different series of primers and probe for detecting a synthetic DNA sequence. The kit supplies this synthetic DNA sequence as an Internal Control (IC). The IC can be used either during DNA extraction or in the PCR reaction to prevent false negative results due to failure in the above steps.

This kit is intended for Research Use Only!

2. Intended Use

Aspergillus RQ4 kit is intended for the detection of four Aspergillus species including *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* and *A. niger* by detecting the ITS region of the fungus (Without differentiation between *A. terreus* and *A. niger*). Detection is accomplished by polymerase chain reaction and is applicable with Rotor-Gene 4-plex and MIC machines.

3. Background Information

Aspergillus is an opportunistic type of fungal mold that exists everywhere. More than a few hundred Aspergillus species have been identified. Among them about 40 could be pathogenic for humans.

While they are not pathogenic for a healthy person, they may cause mild allergic reactions to significant and life-threatening infections in patients with compromised immune system. Most of these infections have been related to *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*

and *A. niger*. Early diagnosis of this disease is crucial for proper patient management.

4. Test Principle

The pathogen is detected using PCR, where primers specific to the target genome amplify its unique sequence. Real-Time PCR facilitates the detection of the amplified product through fluorescent-labeled probes. Therefore, monitoring fluorescence provides a means for detecting the target without requiring post-amplification analysis. This eliminates the possibility of PCR product contamination.

5. Kit Contents

The kit contains a manual, a flash card and the following reagents:

Label	Content	Quantity
ASPG 4C Mix	PCR mix*	360 µl
<i>A.fum</i> Pos	Positive Control for <i>A. fumigatus</i>	100 µl
<i>A.flu</i> Pos	Positive Control for <i>A. flavus</i>	100 µl
<i>A.ter</i> Pos	Positive Control for <i>A. terreus</i>	100 µl
<i>A.nig</i> Pos	Positive Control for <i>A. niger</i>	100 µl
Internal Ctrl	Internal Control*	250 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

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

6. Packaging models

The kit is available in 24, 48, and 96 reactions of 25 microliters.

7. Storage and Stability

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

8. Product Use Limitations

- This kit is intended to be used only by specially instructed and trained personnel.
- The user manual should be strictly followed, and any modification will invalidate the results.
- The kit and its contents should not be used past the expiration date on the package.
- The kit and its contents should not be used if there is any sign of pink or red color on the Warm Mark label.
- This kit is for Research use only and is not validated for in vitro diagnostics.

9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipettors and nuclease-free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease-free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

10. General Precautions

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 PCR 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 cooling blocks instead.

11. Specimen, Storage and Transport

Proper samples to test for Aspergillus include whole blood, which should be collected in sterile tubes. We recommend EDTA or citrate as an anticoagulant. Samples such as plasma, cerebrospinal fluid (CSF) and bronchoalveolar lavage (BAL) can also be used. Samples can be stored at 2-8°C for a few hours or at -20°C or lower for up to a few months.

12. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes and samples of heparinized patients must not be used.

Elevated levels of bilirubin (≤ 4.5 mg/dl) and lipids (≤ 1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

13. Internal Control (IC)

To evaluate the possibility of DNA extraction failure and PCR inhibition and prevent false negative results, the Aspergillus RQ kit contains an internal control (IC). This IC can be used during extraction process or simply added to ASPG 4C Mix. To monitor both DNA extraction and PCR reaction, internal control should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample during extraction. The required volume of internal control is 10% of the elution buffer. For instance, if the 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 the IC should not be added directly to the patient sample (i.e, before the addition of lysis buffer) as it loses its efficiency.

If the IC is added to ASPG 4C Mix, only PCR inhibition can be monitored. For this purpose, 1ul of the IC reagent should be added to each reaction. For example, for 10 PCR reactions, 10ul of the internal control should be added to 150ul of ASPG 4C Mix before it is added to the tubes. In a successful DNA extraction and PCR test, the Internal control should generate a CT of 27-32 in the Yellow/VIC Channel.

14. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different fungal DNA extraction kits. For blood sample we recommend using:

- QIAamp® UCP PurePathogen Blood Kit (Cat. no. 50112, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

15. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely, followed by a brief mixing and a quick spin. Place the required number of tubes on a cold block. Consider one tube for each sample, plus four for Positive control and one for the negative control.

If IC is introduced during the extraction process, pipette 15µl of [ASPG 4C Mix](#) to each PCR tube.

If IC is added to the ASPG 4C Mix, add 15ul of the [prepared mix](#) (as described in section 12) to each PCR tube.

Then add 10ul of isolated DNA, [Pos Ctrl](#), or water to each tube.

Cap the tubes and visually inspect to make ensure all are capped securely. Place the tubes in the machine.

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

16. Devices and software

Aspergillus RQ4 kit is designed to work with Rotor-Gene 4-plex and MIC.

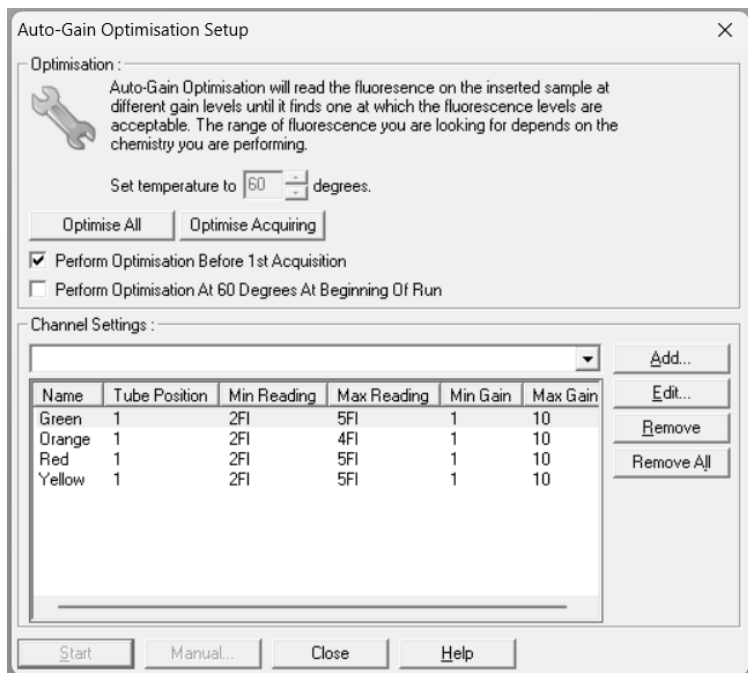
17. Programming Rotor-Gene

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

Open the Aspergillus RQ4 template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); Aspergillus RQ4 0.1 is for strip tubes and Aspergillus RQ4 0.2 is for 0.2ml tubes. Program starts.

Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation. Adjust the setting according to the below image. Make sure to set the Tube Position to number 1 for all channels (note that Tube number 1 should contain ASPG 4C Mix).

Aspergillus RQ4 (V1.1)



Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the program on the desired location.

18. 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 3 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for Green, Yellow, Orange and Red dyes.

19. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure that in the sample menu, Patient samples should be defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively. Analyze the data according to the manufacturer's recommendations.

Signal in the **Green** channels is due to **A. niger** or **A. terreus**. A signal in the **Yellow channel** is due to **IC**. Signal in the **Orange** channels is due to **A. flavus** and Signal in the **Red** channels is due to **A. fumigatus**.

Briefly, click on the Analysis menu and then under the 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 or simply put the threshold on 0.05 for the Green channel.

Repeat the above for Cycling A. Yellow, Orange and Red but, cancel the Automatic Threshold and manually put the threshold on 0.1. Figures 1, 2, 3 and 4 represent typical graphs for the 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 a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.

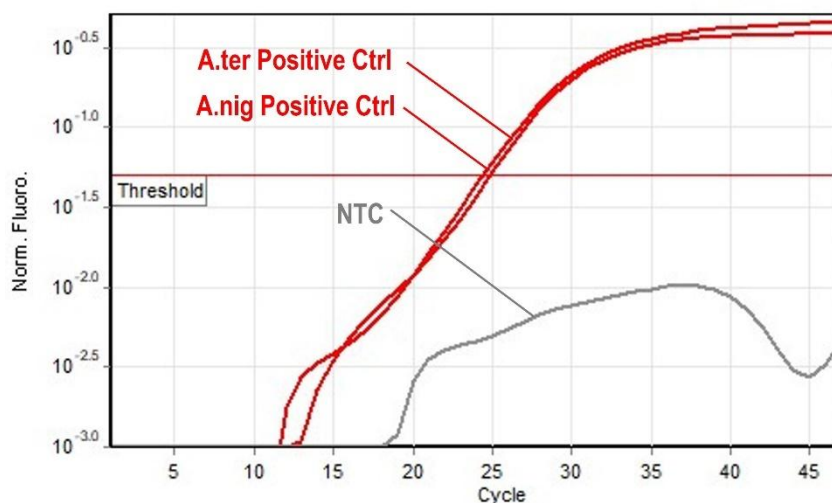


Fig 1. Typical Controls graph in Green channel for Rotor-Gene

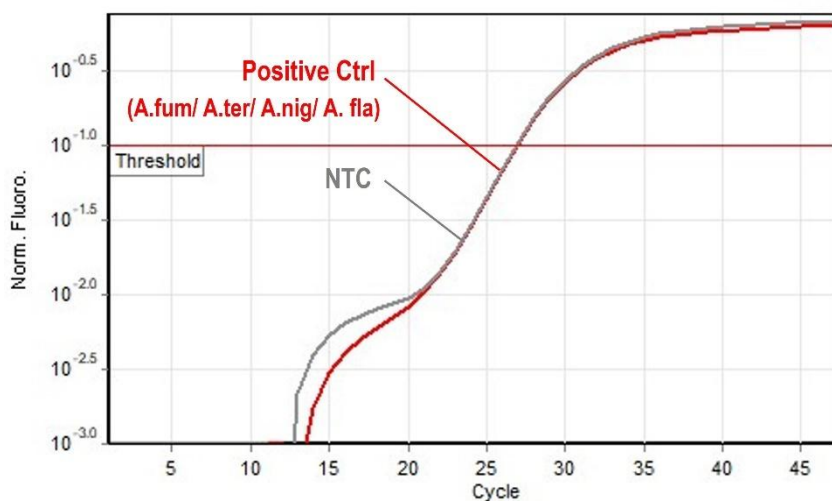


Fig 2. Typical IC graph in Yellow channel for Rotor-Gene

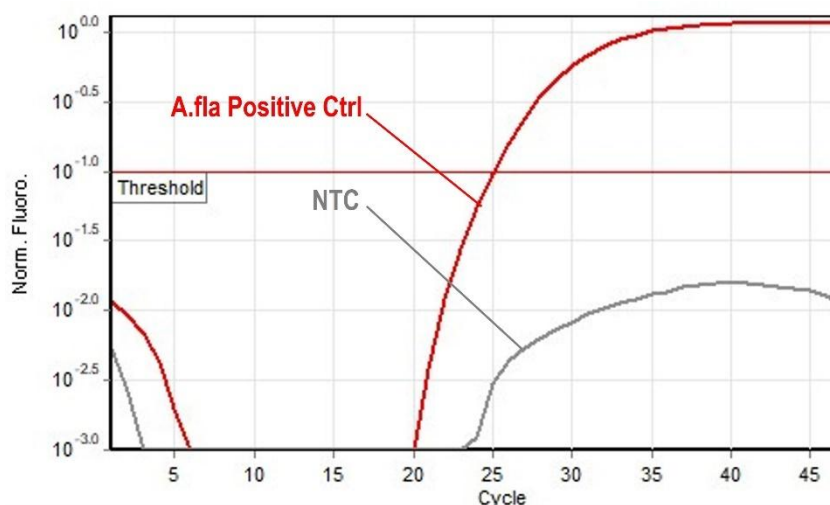


Fig 3. Typical Control graph in Orange channel for Rotor-Gene

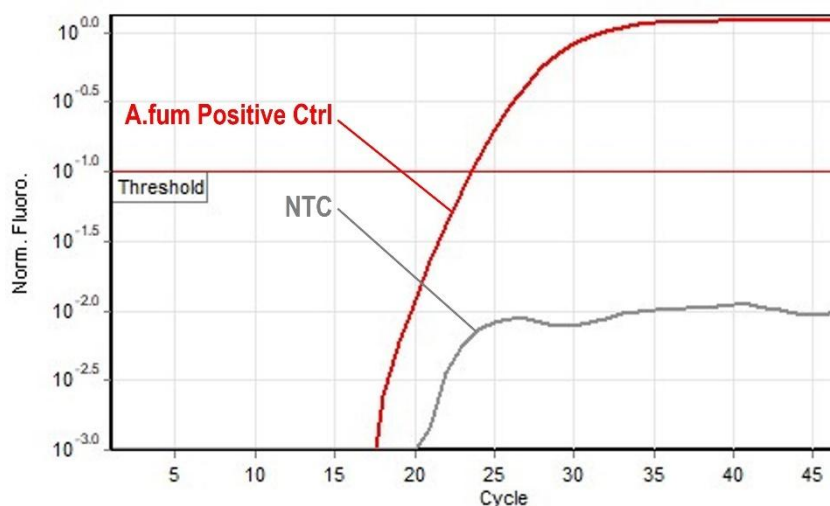


Fig 4. Typical Control graph in Red channel for Rotor-Gene

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** for *A. niger* or *A. terreus* if it is positive in the Green channel with a CT of less than 40.
- A sample is **Positive** for *A. flavus* if it is positive in the Orange channel with a CT of less than 40.
- A sample is **Positive** for *A. fumigatus* if it is positive in the Red channel with a CT of less than 40.
- A sample is **Negative** if it is negative in the Green, Orange and Red channels while it is positive in the Yellow channel with a CT of 27-32.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in the Green, Orange, Red and Yellow channels.

The interpretation of results is summarized in the following Table.

Green	Yellow	Orange	Red	Result
+	+/-	-	-	Pos for <i>A. niger</i> or <i>A. terreus</i>
-	+/-	+	-	Pos for <i>A. flavus</i>
-	+/-	-	+	Pos for <i>A. fumigatus</i>
-	+	-	-	Negative
-	-	-	-	Inconclusive

20. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with cloned target and showed a limit of detection equal 2 copies/μl for *A. terreus* and *A. niger*, 7 copies/μl for *A. flavus* and 9 copies/μl *A. fumigatus*.

21. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special method of disposal and can be directly discarded. But infectious laboratory specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

22. Technical Support

For technical support, contact us via

Phone: +98 993-6223241

Email: info@novingene.com

23. Contact Information

NovinGene ParsVira

Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

Tel: +98 21-88837393

+98 990-1813124










Email: info@novingene.com

Website: www.novingene.com

24. References

- Fosses Vuong, M., Hollingshead, C.M. and Waymack, J.R., 2023. Aspergillosis.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212
- Samson, R.A. and Varga, J., 2009. What is a species in Aspergillus? Medical Mycology, 47(s1), pp.S13–S20.
- Van, H., Geert Cauwenbergh and Donald., 2013. Aspergillus and Aspergillosis. Springer Science & Business Media.

25. Symbols

 RUO Research use only	 Manufacturer	 Consult instructions for use
 LOT Lot number	 Content sufficient for <n> tests	 Use-by date
 REF Catalogue number	 SN Serial number	 Temperature limit

For more information and resources please visit our website; www.novingene.com

