

راهنمای کیت

COVID-19 RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۴/۰

جهت تشخیص SARS-CoV-2 ویروس RNA

به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

 24 (Cat# COVIDRQ24)

 48 (Cat# COVIDRQ48)

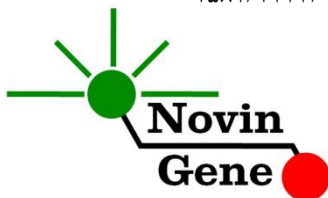
 96 (Cat# COVIDRQ96)

 NG-WI-ASL-35-400

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 نکات لازم.....	۶
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن.....	۷
۱۲. کنترل داخلی.....	۸
۱۳. استخراج RNA.....	۹
۱۴. دستورکار RT-PCR و مراحل آزمایش.....	۹
۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها.....	۱۰
۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene.....	۱۰
۱۷. تنظیم دستگاه StepOne.....	۱۲
۱۸. تنظیم سایر دستگاه ها.....	۱۲
۱۹. آنالیز نتایج Rotor-Gene.....	۱۳

۲۰. آنالیز نتایج StepOne	۱۵
۲۱. میزان حساسیت	۱۸
۲۲. روش امحاء	۱۸
۲۳. پشتیبانی فنی	۱۹
۲۴. اطلاعات تماس	۱۹
۲۵. منابع	۱۹
۲۶. برچسب توضیحات	۲۰

۱. مقدمه

کیت COVID-19 RQ جهت تشخیص RNA ویروس کورونای عامل COVID-19 یا SARS-CoV-2 به روش Real-time RT-PCR طراحی شده است. در این روش، RNA ویروس به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین میکس این کیت حاوی سری ثانویه‌ای 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 COVID-19 RQ امکان تشخیص RNA ویروس کورونای عامل COVID-19 یا SARS-CoV-2 را به روش One-Step Real-Time RT-PCR فراهم می‌نماید. برای این منظور از یک ناحیه در ژنوم ویروس با عنوان N استفاده شده است.

۳. اطلاعات زمینه‌ای

کورونا ویروس‌ها (Corona viruses) حاوی ژنوم تک رشته‌ای RNA و دارای پوشش لیپیدی می‌باشند. تا سال ۲۰۰۲ میلادی این ویروس‌ها کم‌اهمیت و عامل سرماخوردگی و سایر علایم خفیف تنفسی در نظر گرفته می‌شدند. پس از آن مشخص شد که دو نوع بتا کورونا ویروس موجب علایم شدید تنفسی می‌شوند که شامل کورونا ویروس سندرم تنفسی حاد Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus (SARS-CoV) و کورونا ویروس سندرم تنفسی خاور میانه Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) می‌باشند. میزان مرگ و میر در این دو بیماری به ترتیب در حدود ۱۰٪ و ۳۵٪ می‌باشد. اواخر سال ۲۰۱۹ نوع جدیدی از بتا کورونا ویروس شناسایی شد که

می تواند موجب سندرم حاد تنفسی شود. این ویروس Sever Acute Respiratory Syndrom Coronaviurs 2 یا بطور خلاصه SARS-CoV-2 و بیماری حاصل از آن COVID-19 نامیده می شود.

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی عامل عفونی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز Polymerase Chain Reaction/PCR انجام می شود. طی این واکنش بخشی از ژنوم عامل عفونی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می شود. در روش Real-Time RT-PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب های فلورسنت قابل تشخیص می گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می توان 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 روش هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز برطرف می شود.

۵. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
CoV2 Mix	میکس RT-PCR *	۳۶۰ میکرولیتر
Resp A Pos Ctrl	شاهد مثبت	۱۵۰ میکرولیتر
Internal Ctrl	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

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 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 آن ها 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 (IVD) 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 RNA
- تیوب ۱/۵ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

برای کار با این کیت نیازی به مواد سنتز cDNA ندارید!

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 انتقال 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 باید وسایل مخصوص به خود داشته باشند به ویژه سمپلر. 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 کیت، آن ها را روی یخ خرد شده نگهداری کنید تا کاملاً ذوب شود. سپس 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 سانتریفیوژ 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.
- از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آنها می شود.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش ویروس کورونا، نمونه به دست آمده از بخش فوقانی دستگاه تنفس شامل سواب بینی- حلقی، و در برخی موارد نمونه بخش تحتانی دستگاه تنفسی مانند خلط، نمونه آسپیره بینی- حلقی یا مایع لاواژ برونکو الوئولار (bronchoalveolar lavage, BAL) می باشد.

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 می ماند.

۱۲. کنترل داخلی

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

کنترل داخلی را می توانید در مرحله استخراج استفاده نموده یا آن را صرفاً در مرحله PCR به CoV2 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 RNA 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 صورتی که کنترل داخلی را به CoV2 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 CoV2 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 ۱۴ استفاده نمایید.

در صورت موفق بودن واکنش، کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۷ تا ۳۴ می‌شود.

۱۳. استخراج RNA

برای استخراج RNA از نمونه از روش‌ها و کیت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت‌های زیر را توصیه می‌کنیم:

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

در صورتی که تمایل دارید استخراج RNA از نمونه را با استفاده از کنترل داخلی بررسی نمایید، به توضیحات مربوط در قسمت ۱۲ (کنترل داخلی) مراجعه کنید.

۱۴. دستورکار RT-PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی لوله 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 آن ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفیوژ کنید. به تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های 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 **CoV2 Mix** اضافه کنید.

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به **CoV2 Mix** اضافه نمایید، مطابق توضیحات قسمت ۱۲ کنترل داخلی را به میکس افزوده و ۱۵ میکرولیتر از مخلوط حاصل را به هر لوله منتقل کنید.

در پایان ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده، **کنترل مثبت** یا آب به هر لوله اضافه کنید.

درپوش لوله ها را ببندید. سپس آنها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید. توجه: در صورت استفاده از دستگاه **StepOne** لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفیوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید. توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت COVID-19 RQ جهت کار با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

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

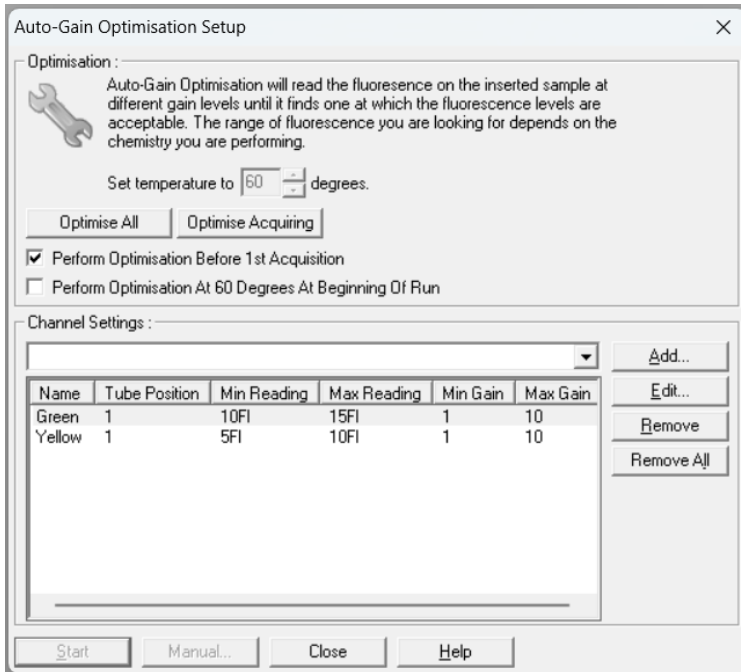
دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق بزنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

فایل تمپلیت COVID-19 را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل CoV2 0.1 یا CoV2 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 زیر برای هر دو کانال انجام دهید.

Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس CoV2 باشد).

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



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 ذخیره کنید (save) 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 و برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۷. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل COVID-19 داخل فلش کارت همراه کیت را انتخاب کنید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه

کیت). از منوی سمت چپ **Plate Setup** و سپس دکمه **Assign Targets and Samples** را انتخاب کنید. یک کنترل مثبت، یک کنترل منفی به همراه تعدادی نمونه از پیش تعریف شده اند. کنترل 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 دکمه **Start Run** را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

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	50°C x 10 min	1
2	95°C x 3 min	1
3	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های **FAM** و **VIC** تنظیم شود. **CoV2 Mix** موجود در کیت حاوی **ROX** می باشد. غلظت نهایی **ROX** در واکنش **300nM** می باشد.

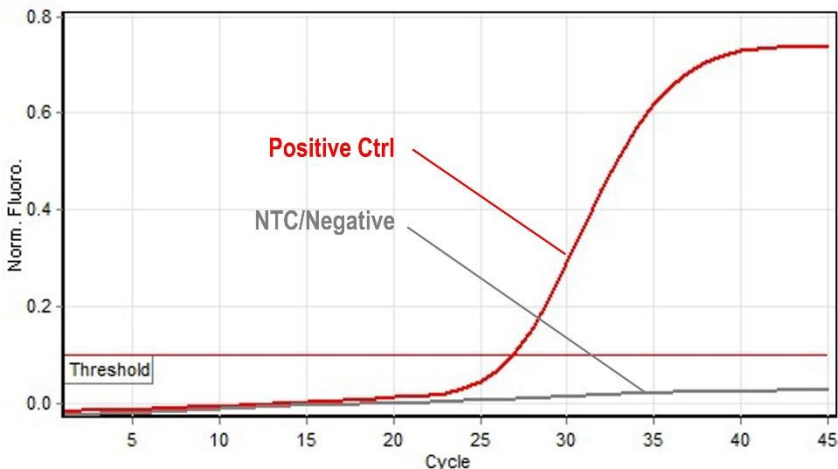
۱۹. آنالیز نتایج Rotor-Gene

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

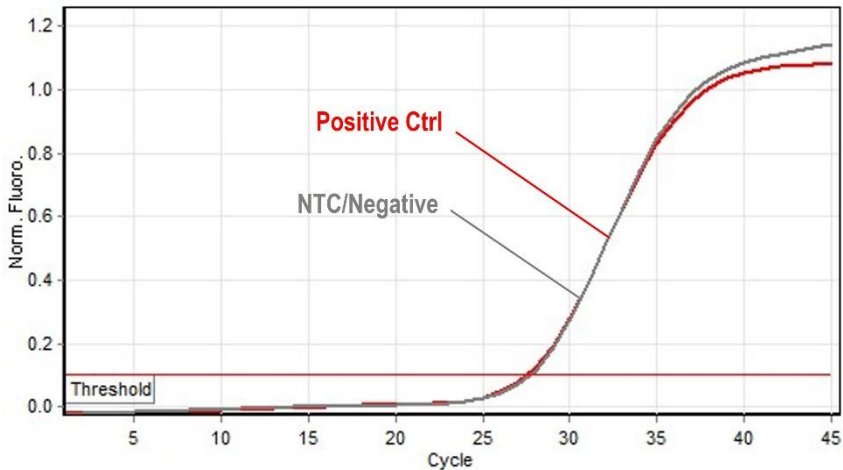
پنجره autofind threshold حداقل را روی ۰/۰۲ یا بالاتر از فلورسانس زمینه قرار داده و دکمه OK را بزنید تا پس از رسم منحنی، نتایج در جدول پایین صفحه نشان داده شوند. همچنین می‌توانید به طور ساده آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. سپس مراحل فوق را برای کانال Yellow نیز تکرار کرده و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده گراف مورد انتظار، کنترل مثبت، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید.

توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **SARS-CoV-2** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **کنترل داخلی** می‌باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می‌شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت **CT معتبر** بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه **منفی محسوب می‌شود و (CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می‌باشد.**



شکل ۱. منحنی‌های شاهد در کانال سبز دستگاه Rotor-Gene



شکل ۲. منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه Rotor-Gene

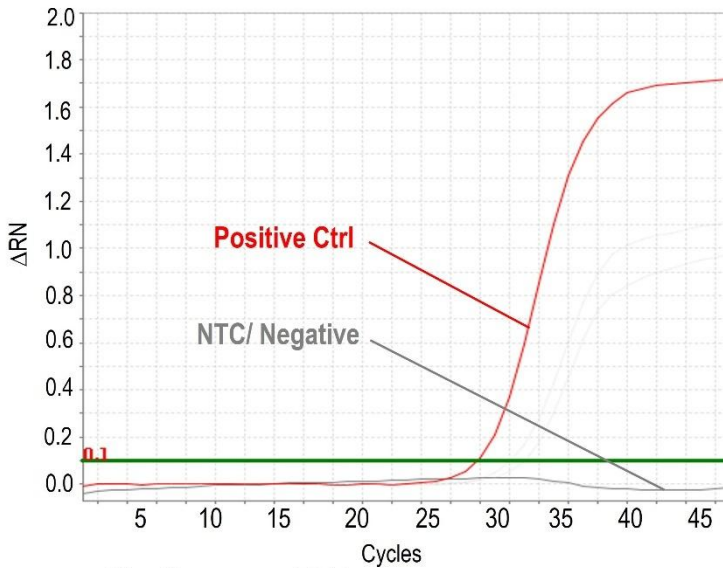
نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال سبز مثبت و دارای نمودار سیگموئید و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد، نمونه از نظر SARS-CoV-2 **مثبت** است.
- در صورتی که یک نمونه در کانال سبز منفی باشد ولی در کانال زرد مثبت و دارای منحنی سیگموئید و CT بین ۲۷ تا ۳۴ باشد، نمونه از نظر SARS-CoV-2 **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال سبز و زرد منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

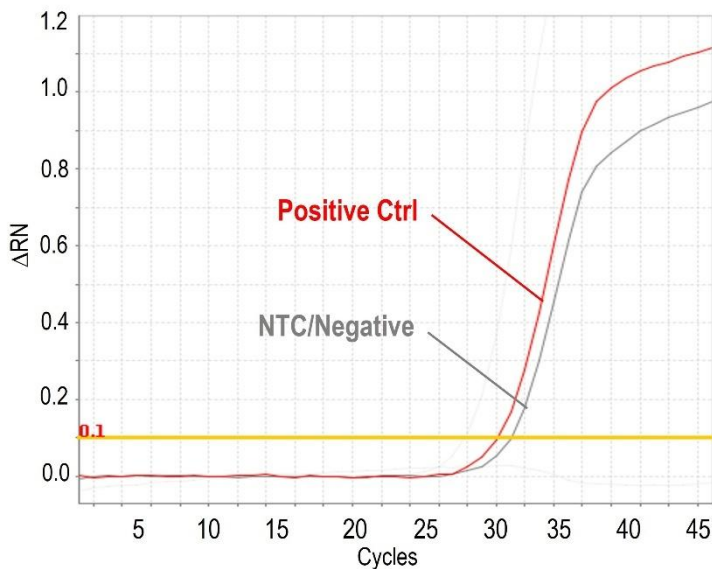
۲۰. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای SARS-CoV-2/FAM آستانه (threshold) و برای IC/VIC آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده گراف های مورد انتظار، کنترل مثبت، منفی و کنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید. توجه داشته باشید که افزایش تابش FAM مربوط به SARS-CoV-2 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 می شود و (CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.



شکل ۳. منحنی شاهد‌ها در کانال FAM دستگاه StepOne



شکل ۴. منحنی کنترل داخلی در کانال VIC دستگاه StepOne

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال SARS-CoV-2/FAM مثبت و دارای منحنی سیگموئید و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال IC/VIC از نظر SARS-CoV-2 **مثبت** است.
 - در صورتی که یک نمونه در کانال SARS-CoV-2/FAM منفی باشد ولی در کانال IC/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموئید و CT بین ۲۷ تا ۳۴ باشد، نمونه از نظر SARS-CoV-2 **منفی** در نظر گرفته می شود.
 - در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال SARS-CoV-2/FAM و IC/VIC منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.
- تفسیر نتایج به صورت خلاصه در جدول زیر آمده است.

Green	Yellow	Result
+	+/-	Positive
-	+	Negative
-	-	Inconclusive

۲۱. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم SARS CoV-2 بررسی شده است و معادل ۱۷ 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.

۲۲. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیماً به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه‌های 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.

۲۳. پشتیبانی فنی

برای ارتباط با بخش پشتیبانی فنی می‌توانید با شماره تلفن یا آدرس ایمیل زیر تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

۲۴. 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

۲۵. منابع

- Hu, B., Guo, H., Zhou, P. and Shi, Z.L., 2021. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. Nature reviews microbiology, 19(3), pp.141-154.

- Ji, T., Liu, Z., Wang, G., Guo, X., Lai, C., Chen, H., Huang, S., Xia, S., Chen, B., Jia, H. and Chen, Y., 2020. Detection of COVID-19: A review of the current literature and future perspectives. Biosensors and Bioelectronics, 166, p.112455.
- Lamers, M.M. and Haagmans, B.L., 2022. SARS-CoV-2 pathogenesis. Nature reviews microbiology, 20(5), pp.270-284.
- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212.

۲۶. 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 / -10°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

COVID-19 RQ Kit Manual

Autumn 2025, Version 4.0

For Real-Time PCR Detection of SARS CoV-2 RNA
For Research Use Only

 24 (Cat# COVIDRQ24)

 48 (Cat# COVIDRQ48)

 96 (Cat# COVIDRQ96)

 NG-WI-ASL-35-400

RUO



NovinGene ParsVira

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

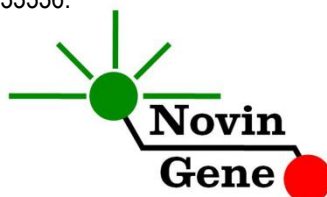


Table of Contents

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	4
8. Product Use Limitations	4
9. Additionally Required Materials	5
10. General Precautions	5
11. Specimen, Storage and Transport	6
12. Internal Control (IC)	6
13. RNA Isolation	7
14. RT-PCR Protocol	7
15. Devices and software	8
16. Programming of the Rotor-Gene	8
17. Programming of StepOne	9
18. Programming Other Machines	10
19. Data Analysis: Rotor-Gene	10

20. Data Analysis: StepOne	12
21. Sensitivity.....	14
22. Disposal Method	14
23. Technical Support.....	14
24. Contact Information.....	15
25. References	15
26. Symbols.....	15

1. Introduction

COVID-19 RQ kit provides a ready-to-use Real-Time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) test designed for detecting SARS-CoV-2 RNA. 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

COVID-19 RQ kit is intended for detecting SARS-CoV-2 RNA. Assay is based on detection of N genes. Detection is achieved using One-Step Real-Time RT-PCR.

3. Background Information

Coronaviruses are enveloped viruses with single stranded RNA genome. Up to 2002 they were considered mostly as causes of common cold. However, with the emergence of SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome by SARS CoV) in 2002, then MERS (Middle East Respiratory Syndrome by MERS CoV), and recently COVID-19 (by SARS-CoV-2), they are considered major health problem issues.

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
CoV2 Mix	RT-PCR mix*	360 μ l
Resp A Pos Ctrl	Positive Control	150 μ l
Internal Ctrl	Internal Control*	250 μ l
Water	PCR Grade Water	200 μ l

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

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 IVD (in vitro diagnostics) applications.

9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

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

This kit does not require cDNA synthesis reagents!

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 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 on ice kit components completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Keep RT-PCR Mix tube at -20°C at all times. Take it out just before use and return it to freezer immediately after.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cold block instead.

11. Specimen, Storage and Transport

We recommend upper respiratory tract samples including nasopharyngeal and oropharyngeal swab or lower respiratory samples including sputum, endotracheal aspirate or bronchoalveolar lavage. Samples can be stored at 2-8°C for few hours or at -20°C or lower for up to few days.

12. Internal Control (IC)

To assess the possibility of RNA extraction failure and PCR inhibition and prevent false negative results, the COVID-19 RQ kit contains an internal control (IC). This IC can be used during the extraction process or added directly to the CoV2 Mix. To monitor both RNA extraction and PCR reaction, the IC should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample. The required volume of IC is 10% of the elution buffer. For instance, if the extracted RNA is eluted with 100ul, then 10ul of IC 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 CoV2 Mix, only PCR inhibition can be monitored. For this purpose, 1ul of the IC should be added to each

reaction. For example, for 10 PCR reactions, 10ul of the IC should be added to 150ul of CoV2 Mix before it is added to the tubes. In a successful RNA extraction and PCR test, the IC should generate a CT of 27-34 in the Yellow/VIC Channel.

13. 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).

To monitor RNA extraction process, internal control should be applied to the extraction process. For more details, please, refer to section 12 of this handbook.

14. RT-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 one for each controls.

If the IC is introduced during the extraction process, pipette 15µl of CoV2 Mix directly to each PCR tube.

If the IC is added to the CoV2 Mix, add 15ul of the prepared mix (as described in section 12) to each PCR tube.

Then add 5ul of extracted RNA, Pos Ctrl, or water to each tube.

Cap the tubes and visually inspect to ensure all are capped securely. Place the 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 too.

15. Devices and software

COVID-19 RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, MIC and StepOne.

16. Programming of the Rotor-Gene

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


Open the COVID-19 template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); Cov2 0.1 is for strip tubes and Cov2 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 next page image.

Make sure to set the Tube Position to number 1 for all channels (note that Tube number 1 should contain CoV2 Mix).

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	10FI	15FI	1	10
Yellow	1	5FI	10FI	1	10

Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the file to start the machine.

17. Programming of StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu, click COVID-19 template file (provided in the flash card, or accessible by kit QR code). Click on Plate Setup. One positive control, and a few samples are defined. You may change plate setup using right-click options (copy, paste, clear). You may also add /remove samples or change the sample name on the "Define Targets and Samples" menu. When finished, click on "Start Run" and save the experiment to the desired location. The instrument will start shortly.

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	50°C x 10 min	1
2	95°C x 3 min	1
3	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC dyes. The CoV2 Mix contains ROX. Final concentration of ROX in the reaction is 300nM.

19. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure that in the sample menu, patient samples are defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively. Analyze the data according to the Rotor-Gene Manual. A signal in the **Green** channel indicates **SARS-CoV-2** and a signal in the **Yellow channel** indicates **IC**.

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 set the threshold on 0.1 for the Green and Yellow channels. Figures 1 and 2 represent typical graphs for the Rotor-Gene machine.

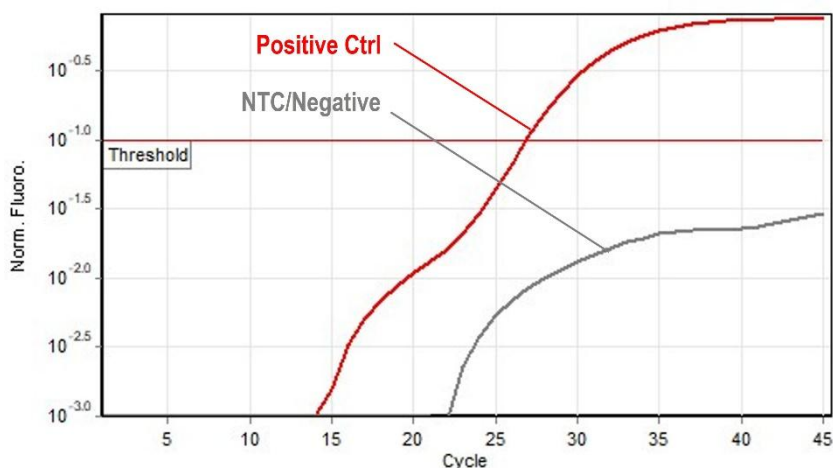


Fig 1. Typical Control graph in Green channel for Rotor-Gene

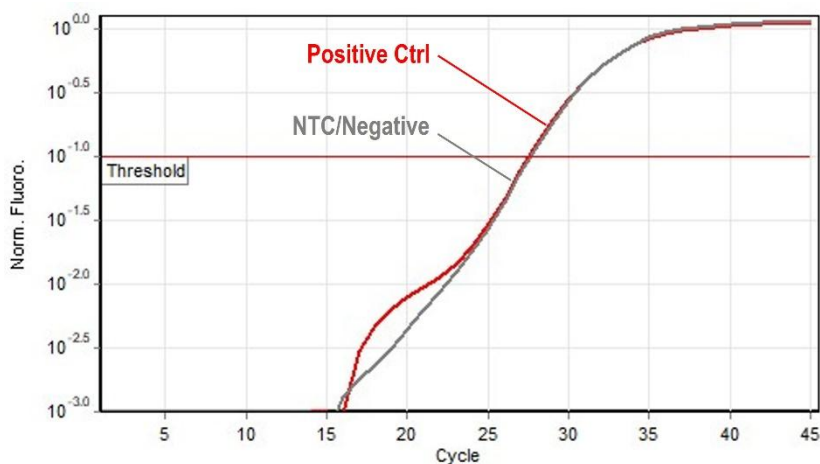


Fig 2. Typical Internal Control graph in Yellow channel for Rotor-Gene

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 a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in the Green/SARS-CoV-2 channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40.
- A sample is **Negative** if it is negative in the Green/SARS-CoV-2 channel while it is positive in the Yellow/IC channel with a sigmoid graph and CT of 27-34.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both the Green/ SARS-CoV-2 and Yellow/IC channels.

The interpretation of results is summarized in the following table.

Green	Yellow	Result
+	+/-	Positive
-	+	Negative
-	-	Inconclusive

20. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to the StepOne Manual. Briefly, click on Analyze and set the threshold for the **SARS-CoV-2/FAM** at 0.1 and at 0.1 for the **IC/VIC**.

Figures 3 and 4 represent typical graphs for the StepOne machine.

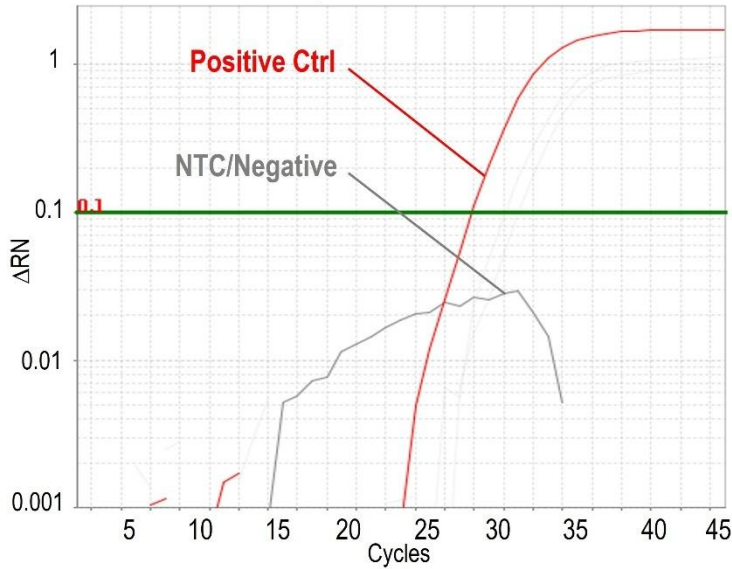


Fig 3. Typical Controls graph in FAM channel for StepOne

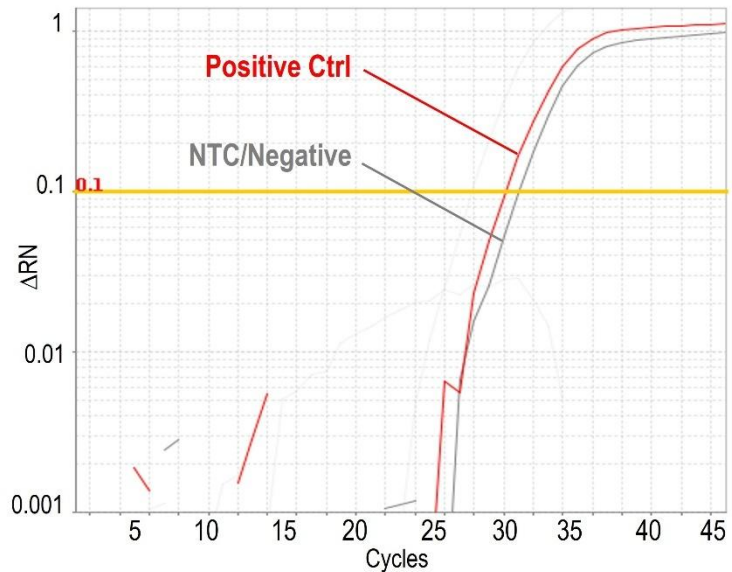


Fig 4. Typical Internal Control graph in VIC channel for StepOne

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.

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in the FAM/SARS-CoV-2 channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40.
- A sample is **Negative** if it is negative in the FAM/SARS-CoV-2 channel while it is positive in the VIC/IC channel with a sigmoid graph and CT of 27-34.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both the FAM/SARS-CoV2 and VIC/IC channels.

The interpretation of results is summarized in the table on page 12.

21. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with cloned target of SARS-CoV-2 genome and showed a limit of detection equal to 17 copy/ μ l.

22. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special treatment before disposal and can be directly discarded. Infectious specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

23. Technical Support

For technical support, contact us via
Phone: +98 993-6223241

email: info@novingene.com

24. Contact Information

NovinGene ParsVira

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

Tel: +98 21-88837393










+98 990-1813124

Website: www.novingene.com

25. References

- Hu, B., Guo, H., Zhou, P. and Shi, Z.L., 2021. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. Nature reviews microbiology, 19(3), pp.141-154.
- Ji, T., Liu, Z., Wang, G., Guo, X., Lai, C., Chen, H., Huang, S., Xia, S., Chen, B., Jia, H. and Chen, Y., 2020. Detection of COVID-19: A review of the current literature and future perspectives. Biosensors and Bioelectronics, 166, p.112455.
- Lamers, M.M. and Haagmans, B.L., 2022. SARS-CoV-2 pathogenesis. Nature reviews microbiology, 20(5), pp.270-284.
- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212.

26. 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

