

راهنمای کیت

COVID-Flu RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۱/۰

جهت تشخیص ویروس های Influenza A/Influenza B, SARS-CoV-2
به روش Multiplex Real-Time RT-PCR
مخصوص تحقیقات

Σ 24 (Cat# COVID-FluRQ24)

Σ 48 (Cat# COVID-FluRQ48)

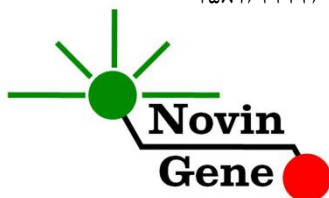
Σ 96 (Cat# COVID-FluRQ96)

 NG-WI-ASL-72-100

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. دستور کار RT-PCR و مراحل آزمایش.....	۹
۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها.....	۱۰
۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene.....	۱۰
۱۷. تنظیم دستگاه StepOne و سایر دستگاه ها.....	۱۲
۱۸. تحلیل نتایج Rotor-Gene.....	۱۳

۱۶تحليل نتايج StepOne
۱۹ميزان حساسيت
۱۹روش امحاء
۱۹پشتيبانى فنى
۱۹اطلاعات تماس
۲۰منابع
۲۱توضيحات برچسب

۱. مقدمه

کیت COVID-Flu RQ جهت تشخیص RNA ویروس‌های SARS-CoV-2، انفلونزا A و انفلونزا B به روش Multiplex 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 حاضر امکان بررسی نمونه بیمار جهت تشخیص ویروس‌های SARS-CoV-2 و انفلونزا A و B (بدون تفکیک دو نوع انفلونزا A و B) را به روش Multiplex Real-Time RT-PCR فراهم می‌کند. این کیت جهت استفاده با دستگاه Rotor-Gene StepOne و MIC طراحی 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 کم اهمیت 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 سندروم تنفسی خاور میانه-Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) می‌باشد.

CoV می‌شوند. 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 شناسائی شد که می‌تواند 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 می‌شود.

ویروس‌های انفلونزا A و انفلونزا B هر دو از خانواده اورتومیکسو ویروس‌ها (Orthomyxoviridae) بوده و حاوی ژنوم تک رشته ای RNA با پوشش لپیدی می‌باشند. هر دو ویروس منجر به همه گیری فصلی انفلونزا می‌شوند، گرچه ویروس انفلونزا A نقش بیشتری دارد و می‌تواند باعث همه گیری جهانی یا پاندمی نیز بشود.

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 بخشی از ژنوم عامل عفونی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می‌شود. در روش Real-Time RT-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 نیز برطرف می‌گردد.

۵. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
CoV-Flu 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، ۴ عدد، به ترتیب برای کیت‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۶. مدل‌های بسته بندی

کیت در قالب‌های بیست و چهار، چهل و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می‌باشد.

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 می‌باشند. از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن‌ها می‌شود. همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه‌ای 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 می‌گردد.

- 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 و تجهیزات و لوازم مورد نیاز آن
 - 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 میکروتیوب های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه RNA به میکروتیوب 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 تیوب 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 تیوب اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین اسپین 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.
- از ذوب و انجماد مکرر این مواد 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، 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 CoV-Flu 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 RNA 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 کارآیی خود را از دست خواهد داد.

در صورتی که کنترل داخلی را به CoV-Flu 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 CoV-Flu 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 (ROX/Orange) و CT بین ۲۷ تا ۳۵ می شود. برای توضیحات بیشتر به بخش تحلیل نتایج رجوع کنید.

۱۳. استخراج RNA

برای استخراج RNA از نمونه 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)
- QIAampUltraSens® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampMiniElute 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 تیوب های کیت 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 آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید. به تعداد مورد نیاز میکروتیوب PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، یک میکروتیوب برای شاهد مثبت و یک میکروتیوب برای کنترل منفی (آب) نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله ۱۵ میکرولیتر از **CoV-Flu Mix** اضافه کنید. سپس ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده، **کنترل مثبت** یا آب به هر لوله اضافه کنید. در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به **CoV-Flu 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.

دروپش میکروتیوب ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.
توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت COVID-Flu RQ جهت کار با دستگاه های 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!

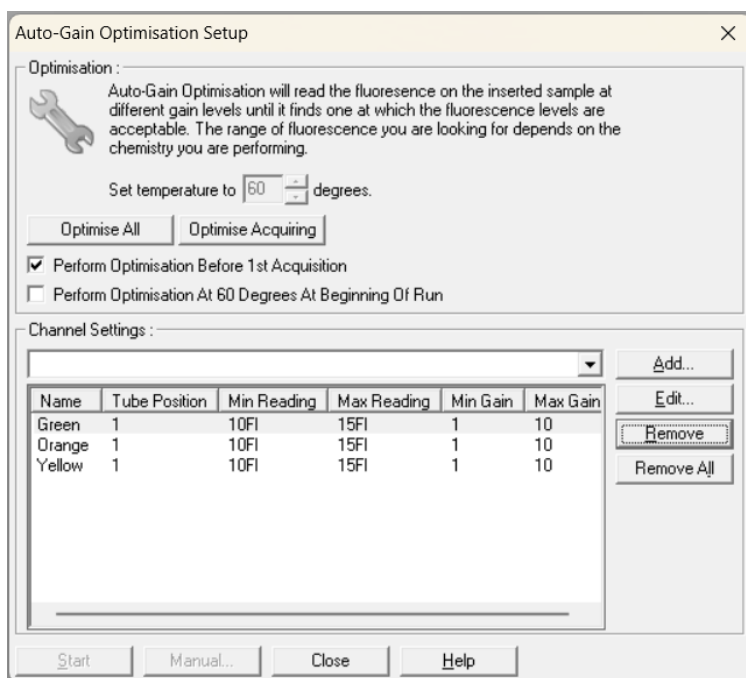
دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

فایل تمپلیت COVID-Flu را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل COVID-Flu 0.1 یا COVID-Flu 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

دقیقا مطابق تصویر صفحه بعد برای هر سه کانال انجام دهید. Tube Position روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس CoV-Flu باشد).

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



سپس 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.

همچنین می‌توانید دستگاه روتورژن را مطابق جدول 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 5 sec	45
	60°C x 30 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای کانال‌های سبز، زرد و نارنجی تنظیم شود.

۱۷. تنظیم دستگاه StepOne و سایر دستگاه‌ها

نرم افزار دستگاه StepOne را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل COVID-Flu 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. کنترل‌ها و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای این کار از گزینه‌های کلیک راست (copy, paste, clear) می‌توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می‌توانید تعداد نمونه‌های مورد بررسی را اضافه کرده و نام نمونه‌ها 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.

چنانچه این کیت را با StepOne یا سایر دستگاه های Real-Time PCR استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه صفحه بعد 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 5 sec	45
	60°C x 40 sec	

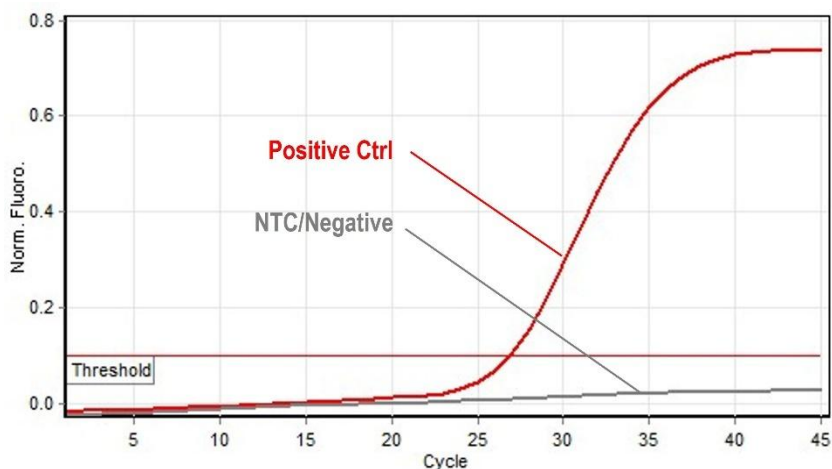
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM، VIC، ROX تنظیم شود.

توجه داشته باشید که میکس CoV-Flu فاقد ROX به عنوان نرمال کننده است. لذا گزینه استفاده از این رنگ به عنوان نرمال کننده (normalizer) باید غیرفعال باشد.

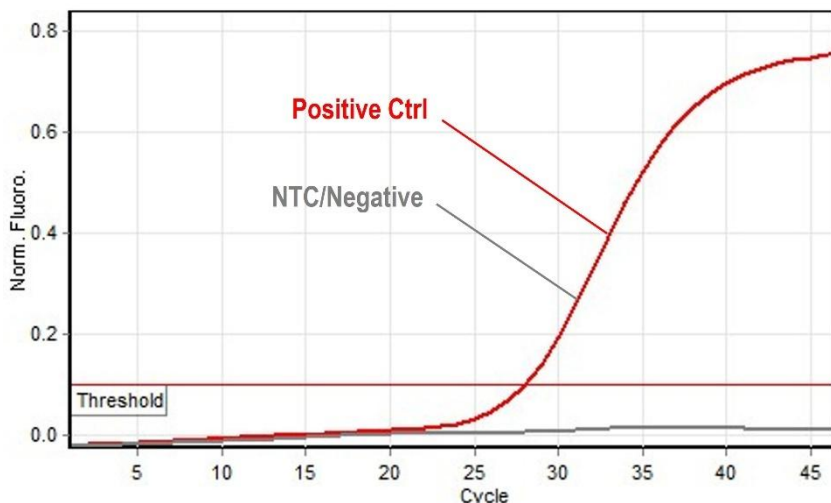
۱۸. تحلیل نتایج Rotor-Gene

برای تحلیل نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Quantitation, Analysis را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. سپس آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. فرایند فوق را برای سایر کانال های Yellow و Orange نیز تکرار کنید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهد های مثبت و منفی و کنترل داخلی تصاویر ۱، ۲ و ۳ را ملاحظه فرمایید.

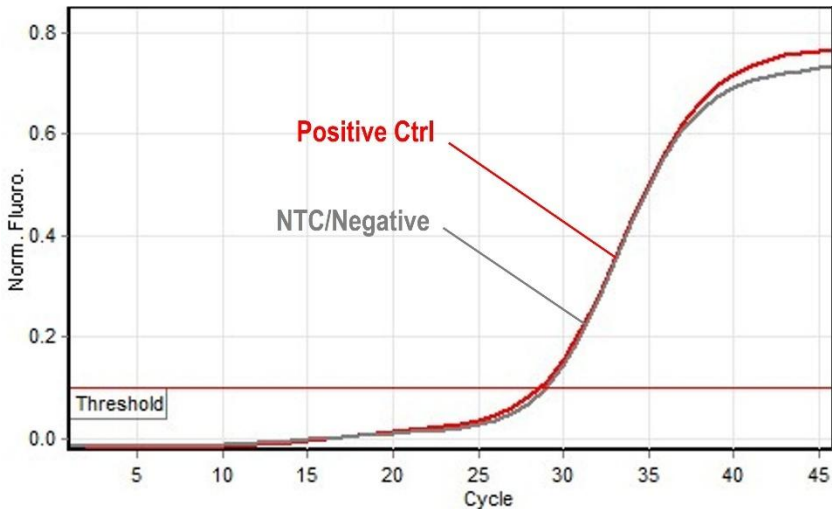
توجه داشته باشید که افزایش تابش سبز (Green) مربوط به SARS-CoV-2 و تابش زرد (Yellow) مربوط به Influenza A/B، و افزایش تابش نارنجی (Orange) حاصل از کنترل داخلی می باشد.



شکل ۱. منحنی شاهدها در کانال سبز دستگاه Rotor-Gene



شکل ۲. منحنی شاهدها در کانال زرد دستگاه Rotor-Gene



شکل ۳. منحنی کنترل داخلی در کانال نارنجی دستگاه Rotor-Gene

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 سیگموئیدی، 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، از نظر SARS-CoV-2 **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **زرد** مثبت با CT کمتر از ۴۰ باشد، از نظر Influenza A یا Influenza B **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** و **زرد** منفی و در کانال **نارنجی** مثبت با CT بین ۲۰ تا ۳۵ باشد، نمونه از نظر SARS-CoV-2 و Influenza A, B منفی است.

- در صورتی که نمونه در هر سه کانال **سبز**، **زرد** و **نارنجی** منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.
خلاصه تفسیر نتایج آزمایش در جدول زیر آمده است.

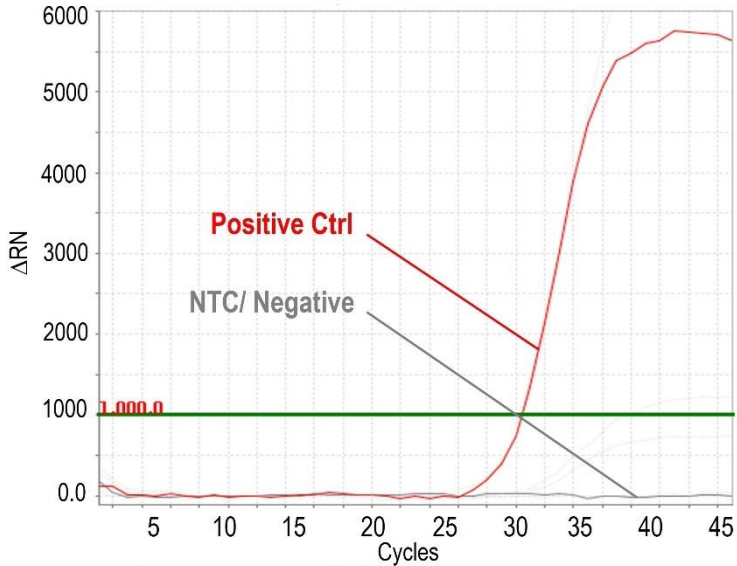
Green	Yellow	Orange	Result
+	-	+/-	Positive for SARS-CoV-2
-	+	+/-	Positive for Flu A/B
-	-	+	Negative
-	-	-	Inconclusive

۱۹. تحلیل نتایج StepOne

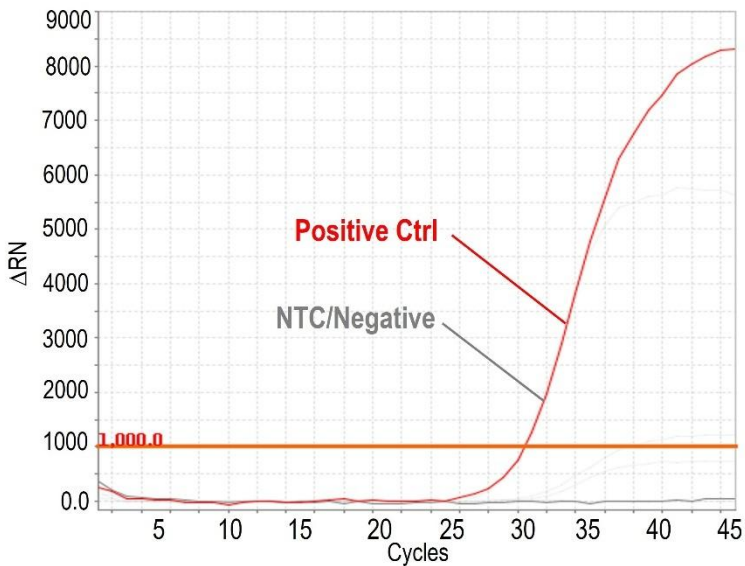
برای تحلیل نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای SARS-CoV-2/FAM آستانه (threshold) و برای Influenza/VIC آستانه را روی ۱۰۰۰ و برای IC/ROX آستانه را روی ۳۰۰ قرار دهید. برای مشاهده گراف های مورد انتظار، کنترل مثبت، منفی و کنترل داخلی تصاویر چهار، پنج و شش را ملاحظه فرمایید.

توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **SARS-CoV-2** و **تابش زرد (Yellow)** مربوط به **Influenza A/B**، و افزایش **تابش نارنجی (Orange)** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد.

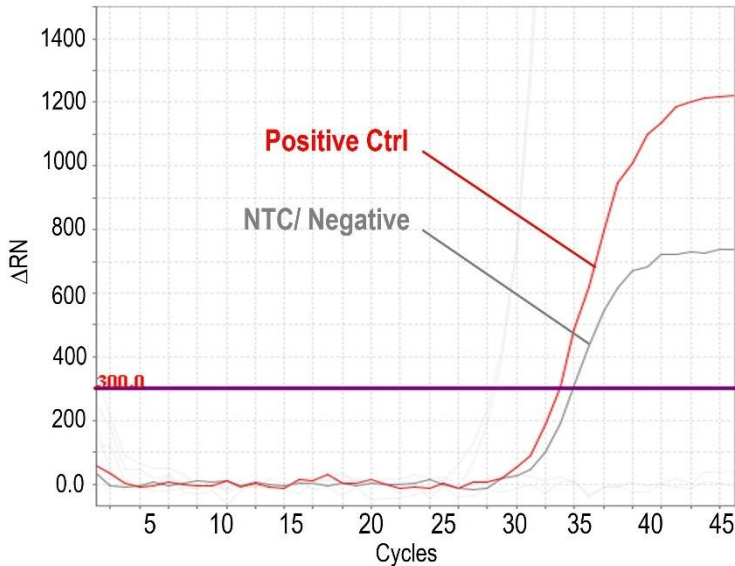
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و (CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.



شکل ۴. منحنی شاهدها در کانال FAM دستگاه StepOne



شکل ۵. منحنی شاهدها در کانال VIC دستگاه StepOne



شکل ۶. منحنی کنترل داخلی در کانال ROX دستگاه StepOne

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال **FAM** مثبت با CT کمتر از ۴۰ باشد، از نظر SARS-CoV-2 **مثبت** است.
 - در صورتی که نمونه در کانال **VIC** مثبت با CT کمتر از ۴۰ باشد، از نظر Influenza A یا Influenza B **مثبت** است.
 - در صورتی که نمونه در کانال **FAM** و **VIC** منفی و در کانال **ROX** مثبت با CT بین ۲۰ تا ۳۵ باشد، نمونه از نظر SARS-CoV-2 و Influenza A یا Influenza B **منفی** است.
 - در صورتی که نمونه در هر سه کانال **FAM**، **VIC** و **ROX** منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.
- خلاصه تفسیر نتایج آزمایش در جدول صفحه ۱۶ آمده است.

۲۰. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس های SARS-CoV-2 و آنفلانزا A, B بررسی شده است و برای SARS-CoV-2 معادل ۱۷ کپی در میکرولیتر و برای آنفلانزا A و B معادل ۱۰ 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.

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 آدرس 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

- 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.
- Lamers, M.M. and Haagmans, B.L., 2022. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature reviews microbiology*, 20(5), pp.270-284.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Palese, P. and Kingsbury, D.W., 2011. *Genetics of Influenza Viruses*. Springer.
- Paules, C. and Subbarao, K., 2017. 'Influenza', *The Lancet*, 390(10095), pp. 697–708.
- Uyeki, T. M., Hui, D. S., Zambon, M., Wentworth, D. E., & Monto, A. S., 2022. Influenza. *Lancet* (London, England), 400(10353), 693–706.

۲۵. توضیحات برچسب

دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید 	تولید کننده 	جهت مصارف پژوهشی <div>RUO</div>
تاریخ انقضاء 	تعداد >n آزمون کافی 	کدبهر (شماره بچ) <div>LOT</div>
محدوده دمایی  -30°C / 10°C	شماره سریال <div>SN</div>	شماره کاتالوگ <div>REF</div>

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

COVID-Flu RQ Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.0

For Real-Time RT-PCR Detection of SARS-CoV-2
and Human Influenza A/B Virus RNA
For Research Use Only

 24 (Cat# COVID-FluRQ24)

 48 (Cat# COVID-FluRQ48)

 96 (Cat# COVID-FluRQ96)

 NG-WI-ASL-72-100

RUO



NovinGene ParsVira

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

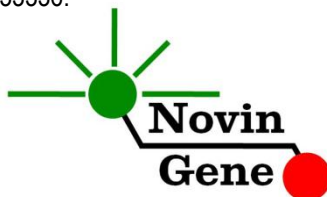


Table of Contents

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 StepOne and Other Machines	9
18. Data Analysis: Rotor-Gene	9
19. Data Analysis: StepOne	12

20. Sensitivity.....	15
21. Disposal Method	15
22. Technical Support.....	15
23. Contact Information.....	15
24. References	15
25. Symbols.....	16

1. Introduction

COVID-Flu RQ kit provides a ready-to-use Real-Time RT-polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting SARS-CoV-2 and Influenza A or Influenza B virus. 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-Flu RQ kit provides a ready-to-use One-Step Multiplex Real-Time RT-PCR system for the detection of SARS-CoV-2 Influenza A virus or Influenza B virus (without differentiation Influenza A and B) with Rotor-Gene, StepOne and MIC.

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 (Sever 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.

Human influenza A and B are enveloped RNA viruses of the Orthomyxoviridae family. While both viruses cause seasonal flu epidemics, Influenza A virus is responsible for the majority of them and may also cause pandemics.

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
CoV-Flu Mix	RT-PCR Mix*	360 µl
Resp A Pos Ctrl	Positive Control	150 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 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 and required equipments/items
- 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 mainly nasopharyngeal swabs and, in some cases, lower respiratory samples including sputum, endotracheal aspirate or bronchoalveolar lavage. Samples can be stored at 2-8°C for a few hours or at -20°C or lower for up to a few days.

12. Internal Control (IC)

To assess the possibility of RNA extraction failure and PCR inhibition and prevent false negative results, the COVID-Flu RQ kit contains an internal control (IC). This IC can be used during the extraction process or added directly to the CoV-Flu 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 CoV-Flu 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 CoV-Flu Mix before it is added to the tubes. In a successful RNA extraction and PCR test, the IC should generate a CT of 27-35 in the ROX/Orange 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)
- QIAampUltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampMiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

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 positive sample and one for the negative control or water.

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

If the IC is added to the CoV-Flu 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 tubes in the machine.

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

15. Devices and software

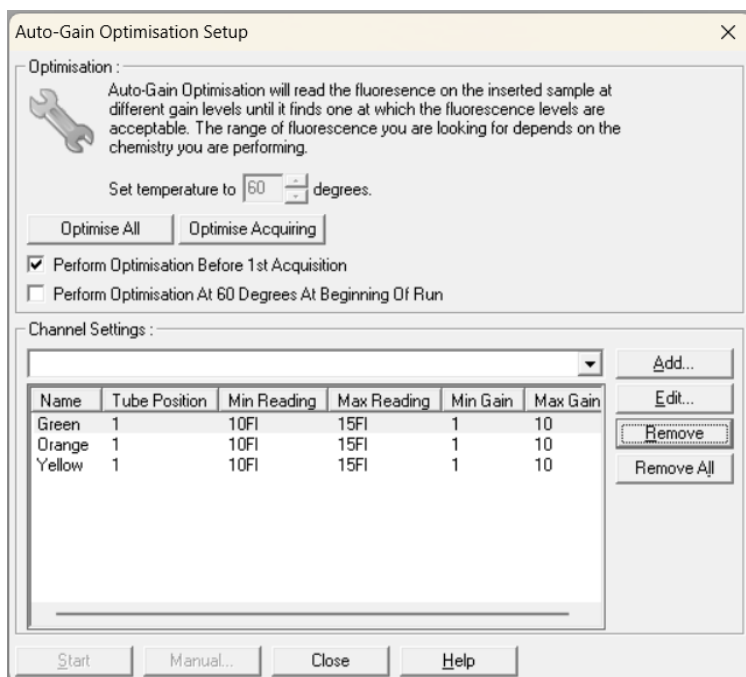
COVID-Flu RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, StepOne and MIC.

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-Flu template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); COVID-Flu 0.1 is for strip tubes and COVID-Flu 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 following image. Make sure to set the Tube Position to number 1 for all channels (note that Tube number 1 should contain CoV-Flu Mix).



Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click start again and save program on desired location. You may also set the machine 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 5 sec	45
	60°C x 30 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C via Green, Yellow, Orange and channels.

17. Programming StepOne and Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table (please note that following program is not applicable to Rotor-Gene):

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 3 min	1
3	95°C x 5 sec	45
	60°C x 40 sec	

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

Please note that CoV-Flu Mix does not contain ROX dye as a normalizer!

18. 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. To analyze data briefly, click on the Analysis menu and then under Quantitation tab double-click on Cycling the A. Green. Manually put threshold at 0.1. Repeat the above for the Yellow and the Orange Channels.

Figures 1, 2, 3 represent typical graphs for the Rotor-Gene.

To interpret the results, please note that:

- Signal in the **Green** channel is due to **SARS-CoV-2**, the **Yellow** channel is due to **Influenza A** and **B** and the signal in the **Orange** channel is due to **IC**.

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.

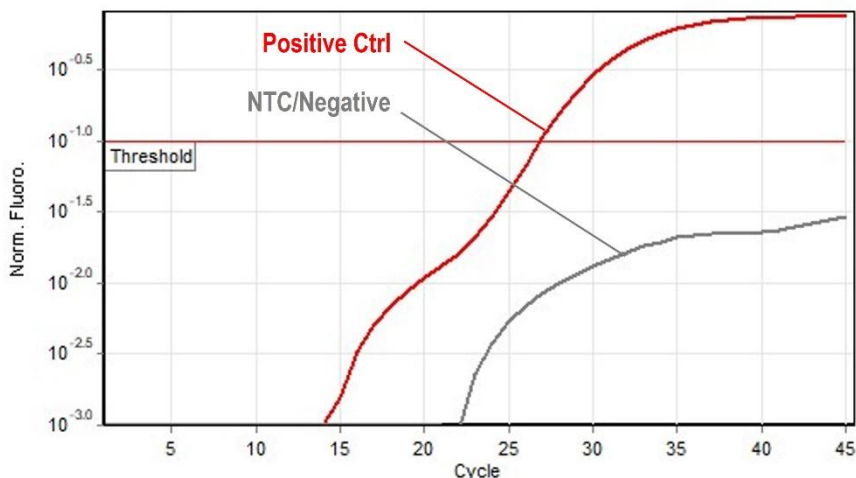


Fig 1. Typical Control graph in Green channel for Rotor-Gene

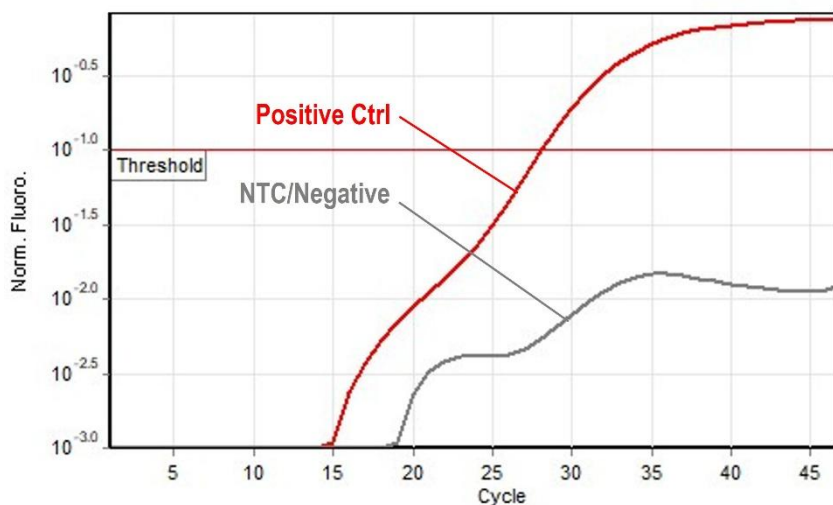


Fig 2. Typical Controls graph in Yellow channel for Rotor-Gene

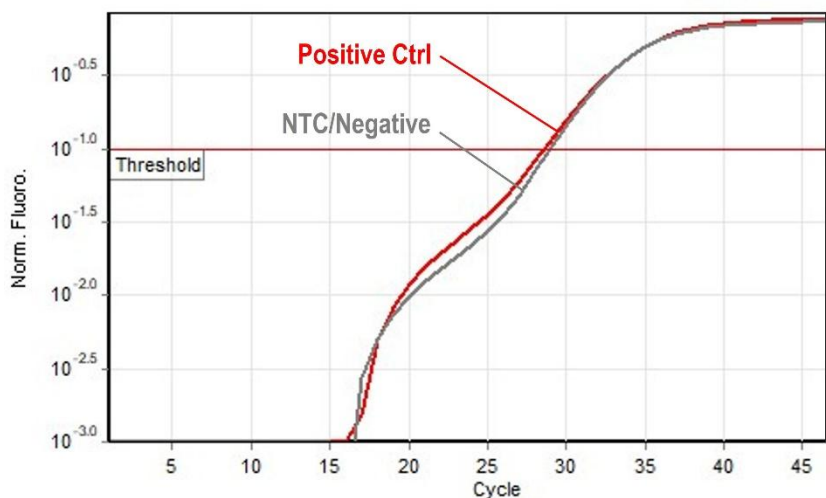


Fig 3. Typical Internal Control graph in Orange channel for Rotor-Gene

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** for SARS-CoV-2 if it is positive in the **Green** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40.
- A sample is **Positive** for Influenza A or B if it is positive in the **Yellow** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40.
- A sample is **Negative** for SARS-CoV-2, Influenza A, B if it is negative in the Green and Yellow channels while it is positive in Orange channel with a sigmoid graph and CT of 20-35.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in all channels.

Interpretation of results is summarized in the following table.

Green	Yellow	Orange	Result
+	-	+/-	Positive for SARS-CoV-2
-	+	+/-	Positive for Flu A/B
-	-	+	Negative
-	-	-	Inconclusive

19. 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 1000 and repeat it for **Influenza/VIC** channel and put the threshold at 300 for the **IC/Orange** channel.

Figures 4, 5 and 6 represent typical graphs for the StepOne machine.

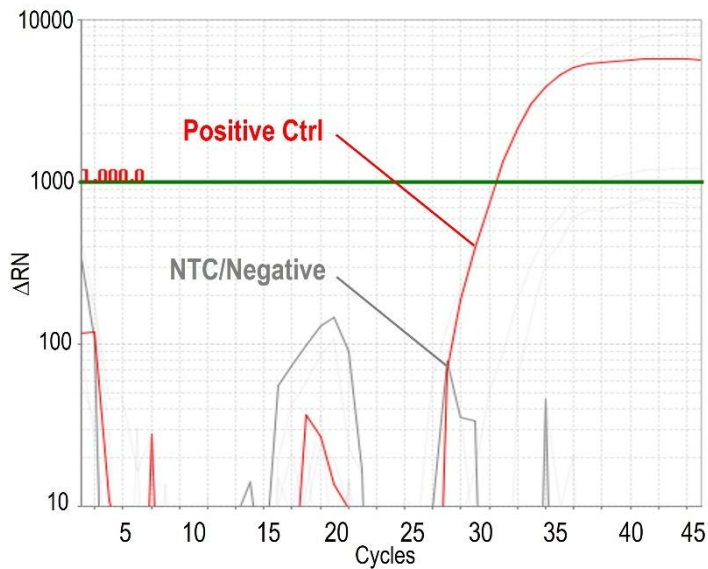


Fig 4. Typical Controls graph in FAM channel for StepOne

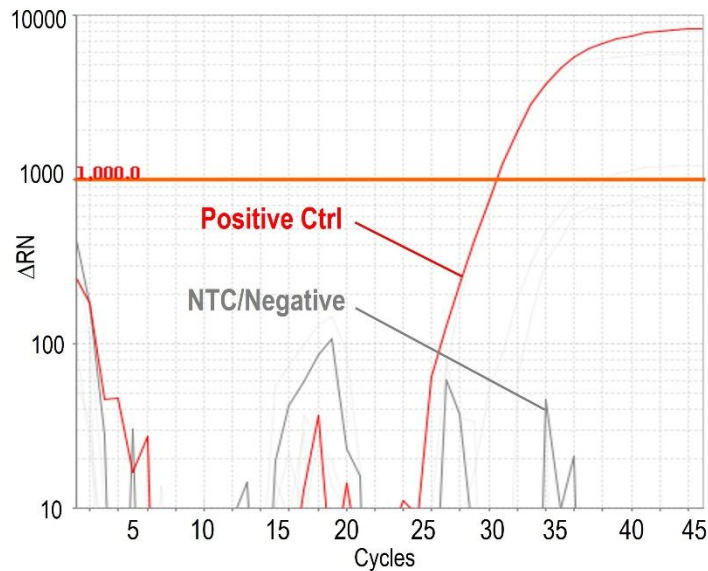


Fig 5. Typical Controls graph in VIC channel for StepOne

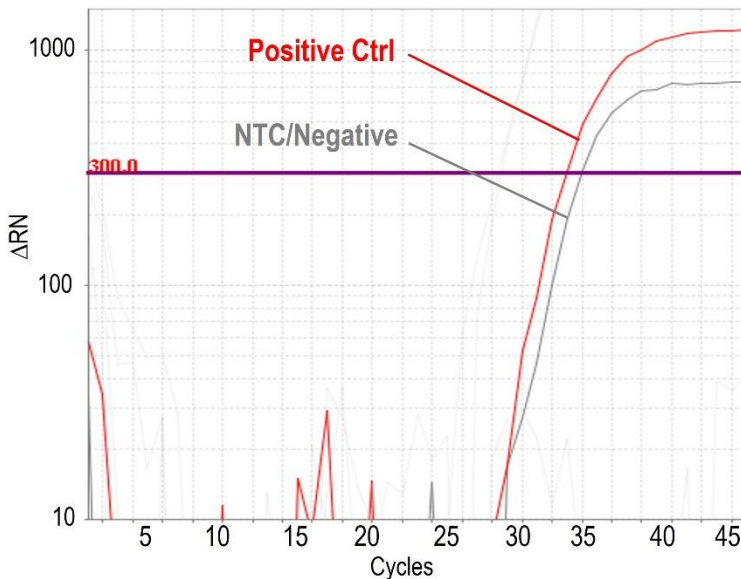


Fig 6. Typical IC graph in ROX channel for StepOne

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** for SARS-CoV-2 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 **Positive** for Influenza A or B if it is positive in the **VIC/Influenza A,B** 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 and VIC/Influenza A,B channels while it is positive in the **IC/Orange** channel with a sigmoid graph and CT of 27-35.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in all channels, the FAM/SARS-CoV2 and the VIC/Influenza A,B and the **ROX/IC** channels.

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

20. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with a cloned target of SARS-CoV-2 and Influenza A and B genome and showed a limit of detection equal to 17 copies/μl for SARS-CoV-2, 10 copies/μl for Influenza A and Influenza B.

21. 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.

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

- 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.

- Lamers, M.M. and Haagmans, B.L., 2022. SARS-CoV-2 pathogenesis. Nature reviews microbiology, 20(5), pp.270-284.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Palese, P. and Kingsbury, D.W., 2011. Genetics of Influenza Viruses. Springer.
- Paules, C. and Subbarao, K., 2017. 'Influenza', The Lancet, 390(10095), pp. 697–708.
- Uyeki, T. M., Hui, D. S., Zambon, M., Wentworth, D. E., & Monto, A. S., 2022. Influenza. Lancet (London, England), 400(10353), 693–706.

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

