

راهنمای کیت RSV RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۱/۰

جهت تشخیص RNA ویروس RSV

به روش Real-Time RT-PCR

مخصوص تحقیقات

 24 (Cat# RSVRQ24)

 48 (Cat# RSVRQ48)

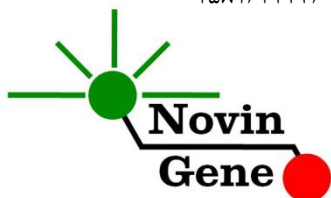
 96 (Cat# RSVRQ96)

 NG-WI-ASL-64-100

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.....	۴
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت.....	۵
۸. محدودیت کاربرد.....	۵
۹. سایر موارد مورد نیاز.....	۵
۱۰. احتیاط و نکات لازم.....	۶
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن.....	۷
۱۲. کنترل داخلی.....	۷
۱۳. استخراج RNA.....	۸
۱۴. دستور کار RT-PCR و مراحل آزمایش.....	۹
۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها.....	۹
۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene.....	۱۰
۱۷. تنظیم دستگاه StepOne.....	۱۱
۱۸. تنظیم سایر دستگاه ها.....	۱۲

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

۱. مقدمه

کیت RSV RQ جهت تشخیص ویروس Respiratory Syncytial Virus (RSV) 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 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 حاضر امکان بررسی نمونه بیمار، جهت تشخیص ویروس RSV را به روش Real-Time RT-PCR فراهم می‌کند. این کیت جهت استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه‌ای

ویروس RSV یا Respiratory Syncytial Virus یک پاتوژن شایع تنفسی از خانواده پارامیکسو ویریده است که حاوی ژنوم RNA تک رشته ای می‌باشد. ویروس RSV سبب عفونت دستگاه تنفسی می‌شود و علائمی مشابه سرماخوردگی ایجاد می‌کند. با این وجود این ویروس می‌تواند در کودکان خردسال، سالمندان و یا افرادی با سیستم ایمنی ضعیف سبب عفونت‌های شدیدتر گردد.

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 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 به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

۵. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
RSV Mix	میکس RT-PCR*	۳۶۰ میکرولیتر
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 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 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 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 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 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، نمونه به دست آمده از بخش فوقانی دستگاه تنفس شامل سواب بینی- حلقی 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 Mix اضافه نمایید. در حالت اول، کنترل داخلی علاوه بر بررسی مهار واکنش، نشانگر کیفیت استخراج نیز می باشد. برای استفاده در مرحله استخراج، کنترل داخلی را پس از افزودن بافر lysis به نمونه، اضافه کنید. میزان مورد نیاز از کنترل داخلی ده درصد حجم حلال نهایی (elution buffer) می باشد. یعنی در صورتی که DNA را نهایتاً در ۱۰۰ میکرولیتر بافر حل می کنید،

۱۰ میکرولیتر از کنترل داخلی را به مخلوط نمونه و بافر Lysis اضافه نمایید. توجه داشته باشید که کنترل داخلی نباید مستقیماً به نمونه بیمار (یعنی پیش از افزودن بافر lysis) اضافه شود، زیرا کارآیی خود را از دست خواهد داد. در صورتی که کنترل داخلی را به RSV 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 RSV 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 ۳۲ 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)
- QIAampUltraSens® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampMiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

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.

در صورتی که کنترل داخلی را در حین استخراج وارد کرده اید، به هر لوله

مستقیماً ۱۵ میکرولیتر از **RSV Mix** اضافه کنید.

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به **RSV Mix** اضافه نمایید، مطابق

توضیحات قسمت ۱۳ کنترل داخلی را به میکس افزوده و ۱۵ میکرولیتر از

مخلوط حاصل را به هر لوله منتقل کنید.

در پایان ۱۰ میکرولیتر از RNA استخراج شده، کنترل مثبت یا آب به هر

لوله اضافه کنید.

درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه *StepOne* لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

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

۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت RSV 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 بزنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

فایل تمپلیت RSV را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل RSV 0.2 یا RSV 0.1 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 دو کانال انجام دهید.

Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس RSV 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	10FI	15FI	1	10
Yellow	1	5FI	10FI	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 (save) 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 شاهدها 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 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 و منفی و تعدادی نمونه از پیش تعریف شده اند. کنترل مثبت، کنترل منفی 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	40
	60°C x 60 sec	

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

۱۹. تحلیل نتایج Rotor-Gene

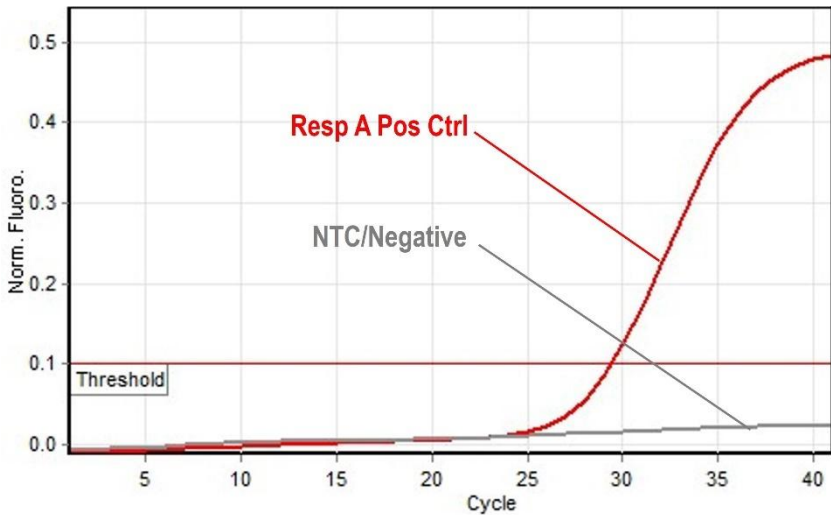
به طور خلاصه از منوی Quantitation, Analysis را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. سپس آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. فرایند فوق را برای کانال Yellow نیز تکرار کنید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهد های مثبت و منفی و کنترل داخلی تصاویر ۱ و ۲ را ملاحظه فرمایید. توجه داشته باشید که افزایش تابش سبز (Green) مربوط به RSV و تابش زرد (Yellow) مربوط به کنترل داخلی می باشد.

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.

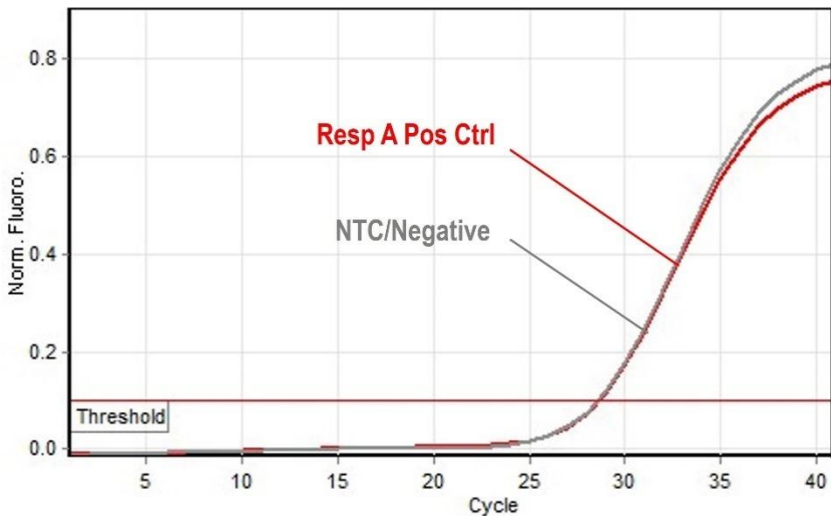
نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال سبز، مثبت و دارای منحنی سیگموئیدی و CT کمتر از ۳۵ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد از نظر RSV مثبت است.
- در صورتی که نمونه در کانال سبز منفی و در کانال زرد مثبت با CT بین ۲۷ تا ۳۲ باشد، نمونه از نظر RSV منفی است.
- در صورتی که نمونه در هر دو کانال سبز و زرد منفی باشد، نتیجه نامعتبر بوده و آزمایش باید تکرار شود. خلاصه نتایج آزمایش در جدول زیر آمده است.

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



شکل ۱. منحنی شاهدها در کانال سبز دستگاه روتورژن



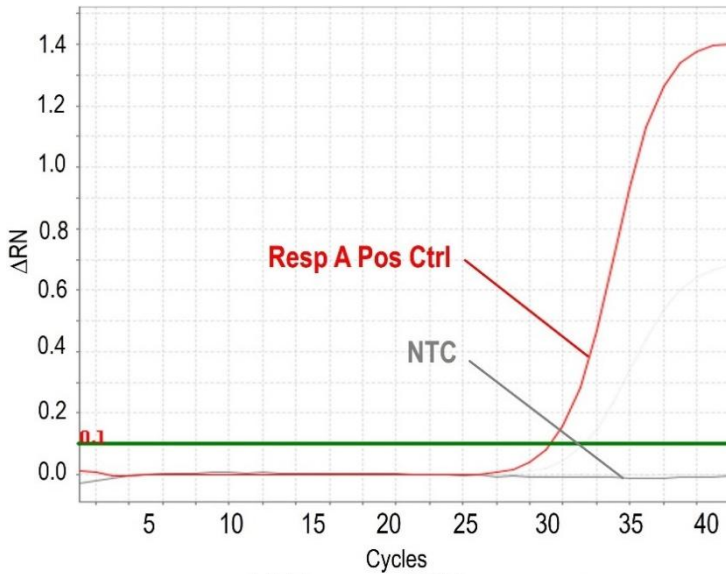
شکل ۲. منحنی شاهدها در کانال زرد دستگاه روتورژن

۲۰. آنالیز نتایج StepOne

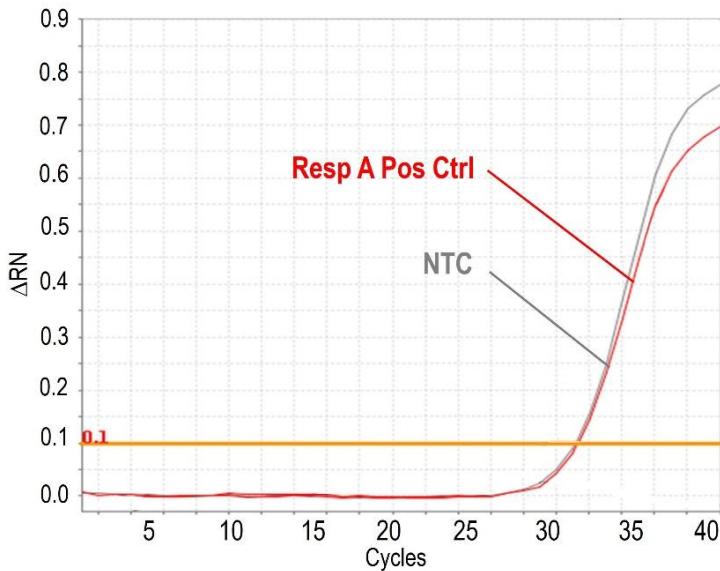
برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای RSV/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید. همچنین برای کانال IC/VIC نیز آستانه را روی ۰/۱ تنظیم نمایید. برای مشاهده گراف مورد انتظار شاهد مثبت و منفی و کنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.

توجه داشته باشید که افزایش تابش RSV/FAM مربوط به RSV 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 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.



شکل ۳. نمودار شاهدهای RSV در کانال FAM دستگاه استپ وان



شکل ۴. نمودار شاهدهای RSV در کانال VIC دستگاه استپ وان

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** مثبت با CT کمتر از ۳۵ باشد بدون در نظر گرفتن نتیجه در کانال **زرد**، از نظر RSV **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** منفی و در کانال **زرد** مثبت با CT بین ۲۷ تا ۳۲ باشد، نمونه از نظر RSV منفی است.
- در صورتی که نمونه در هر دو کانال **سبز** و **زرد** منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

۲۱. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم RSV بررسی شده است و برای RSV معادل ۹ 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 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.

۲۳. پشتیبانی فنی

برای ارتباط با بخش پشتیبانی فنی می توانید 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

- Griffiths, C., Drews, S.J. and Marchant, D.J., 2017 'Respiratory syncytial virus: Infection, detection, and new options for prevention and treatment', Clinical Microbiology Reviews, 30(1), pp. 277–319.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Walsh, E.E. and Hall, C.B., 2014. Respiratory syncytial virus (RSV). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, p.1948.

۲۶. توضیحات برچسب

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

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

RSV RQ Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.0

For Real-Time RT-PCR Detection of RSV (RNA)
For Research Use Only

 24 (Cat# RSVRQ24)

 48 (Cat# RSVRQ48)

 96 (Cat# RSVRQ96)

 NG-WI-ASL-64-100

RUO



NovinGene ParsVira

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

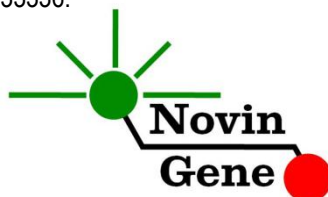


Table of Contents

1. Introduction	3
2. Intended Use	3
3. Background Information	3
4. Test Principle	3
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	6
14. RT-PCR Protocol	6
15. Devices and software.....	7
16. Programming of the Rotor-Gene.....	7
17. Programming of the StepOne	9
18. Programming Other Machines	9
19. Data Analysis: Rotor-Gene	9

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

1. Introduction

RSV RQ kit provides a ready-to-use Real-Time RT-polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting Respiratory Syncytial Virus (RSV) RNA. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit. This Mix also contains 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

RSV RQ kit provides a ready-to-use One-Step Multiplex Real-Time RT-PCR system for the detection of RSV with Rotor-Gene, StepOne and MIC

3. Background Information

Respiratory Syncytial Virus (RSV) is a single-stranded RNA virus of the Paramyxoviridae family. In healthy individuals it causes respiratory tract infections with cold like symptoms, but it may cause severe respiratory infections in young children, elderly and immunocompromised patients.

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
RSV Mix	RT-PCR mix	360 μ l*
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 and required equipments/items
- 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 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. 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 RSV RQ kit contains an internal control (IC). This IC can be used during the extraction process or added directly to the RSV 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 RSV 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 RSV Mix before it is added to the tubes.

In a successful RNA extraction and PCR test, the IC should generate a CT of 27-32 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)
- 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/water.

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

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

Then add 10ul of extracted DNA, [Positive Control](#), or water to each tube.

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

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

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

15. Devices and software

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

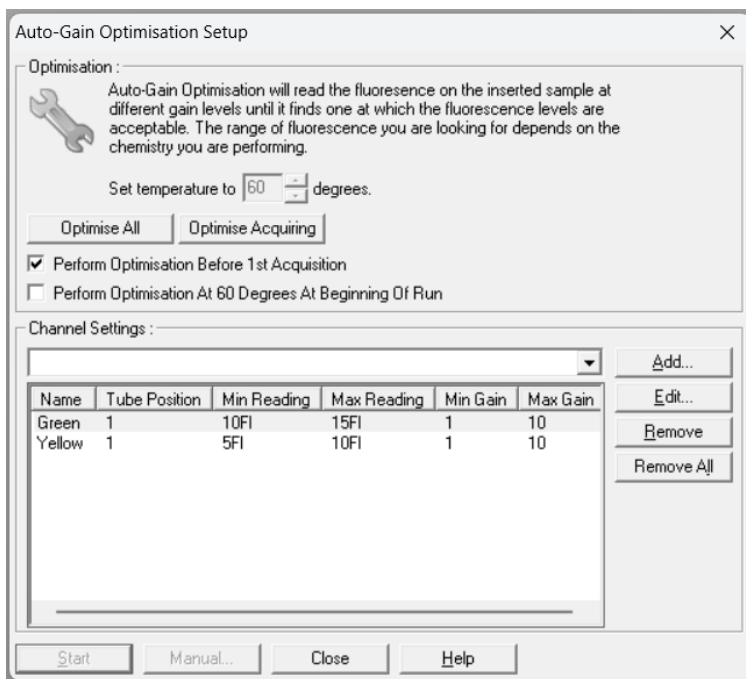
16. Programming of the Rotor-Gene

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

Open the RSV template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); RSV 0.1 is for strip tubes and RSV 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 RSV Mix).

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.



The dialog box is titled "Auto-Gain Optimisation Setup". It contains an "Optimisation:" section with a wrench icon and a text description: "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." Below this is a temperature setting: "Set temperature to 60 degrees." There are two buttons: "Optimise All" and "Optimise Acquiring". Two checkboxes are present: "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (checked) and "Perform Optimisation At 60 Degrees At Beginning Of Run" (unchecked). The "Channel Settings:" section features a table with columns: Name, Tube Position, Min Reading, Max Reading, Min Gain, and Max Gain. The table contains two rows: "Green" and "Yellow", both with Tube Position 1. To the right of the table are buttons: "Add...", "Edit...", "Remove", and "Remove All". At the bottom of the dialog are four buttons: "Start", "Manual...", "Close", and "Help".

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 60 degrees.

Optimise All Optimise Acquiring

☒ 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

Add... Edit... Remove Remove All

Start Manual... Close Help

17. Programming of StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu, click RSV template file (provided in the flash card, or accessible by kit QR code). Click on Plate Setup. One Positive control and negative 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	40
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM, VIC dyes. The RSV 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, the Positive controls have been defined as "Positive control". 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 Channel. Figures 1, 2 represent typical graphs for the Rotor-Gene. To interpret the results, please note that: Signal in the **Green** channel is due to **RSV**, the **Yellow** channel due to **Internal Control**.

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.

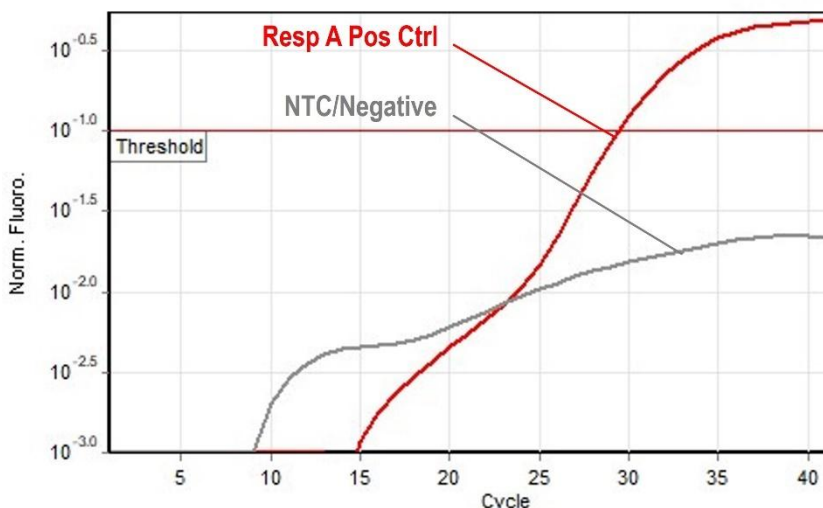


Fig 1. Typical Controls graph in Green channel for Rotor-Gene

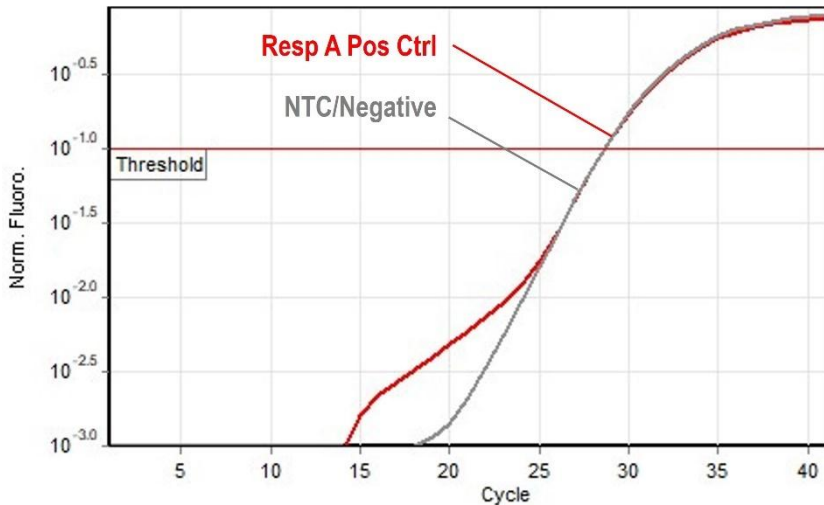


Fig 2. Typical Controls graph in Yellow channel for Rotor-Gene

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** for RSV if it is positive in the Green channel with sigmoid graphs and CT of less than 35.
- A sample is **Negative** for RSV if it is negative in the Green and positive in Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 27-32.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in the Green and Yellow channels.

Interpretation of results is summarized in the following table.

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

20. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to the StepOne Manual. Briefly, click on Analyze and set the threshold for the **RSV/FAM** at 0.1 and repeat the above for the **IC/VIC** channels.

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

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

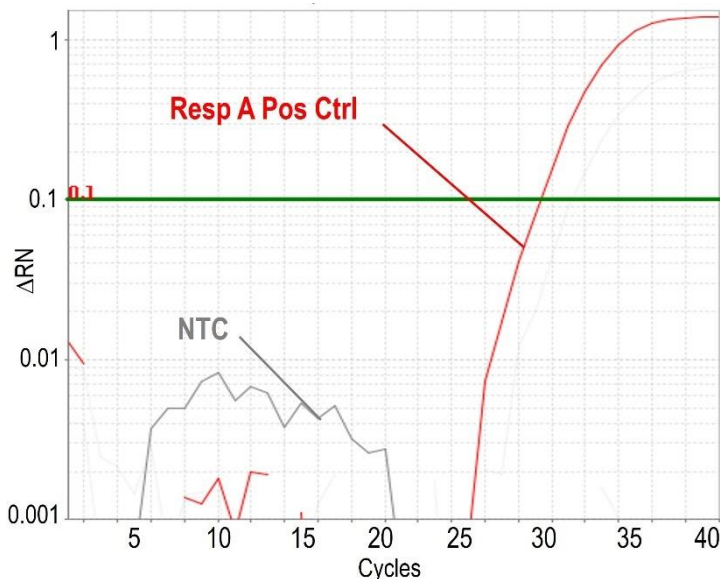


Fig 3. Typical RSV graph in FAM channel for StepOne

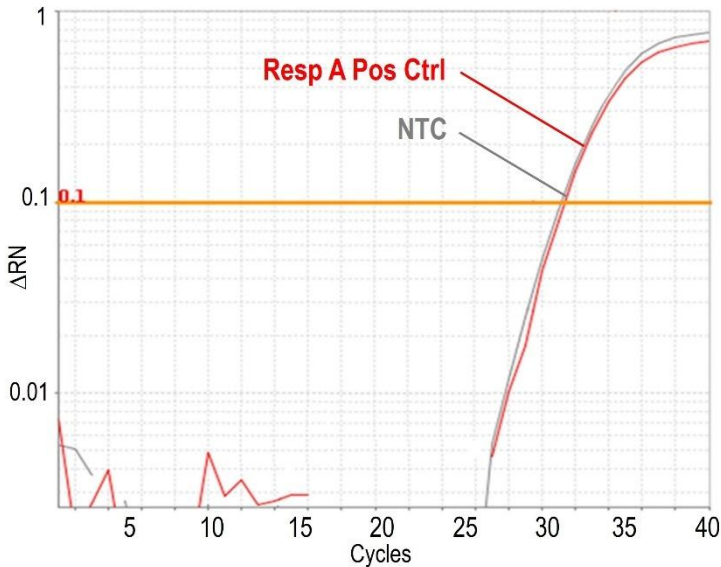


Fig 4. Typical RSV graph in VIC channel for StepOne

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in the FAM/RSV channel with a sigmoid graph and a CT of less than 35.
- A sample is **Negative** if it is negative in the FAM/RSV channel while it is positive in the VIC/IC channel with a sigmoid graph and CT of 27-32.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both the FAM/RSV and VIC/IC channels.

Interpretation of results is summarized in the table on page 11.

21. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with a cloned target of RSV genome and showed a limit of detection equal to 9 copies/μl for RSV.

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

Email: info@novingene.com






Website: www.novingene.com

25. References

- Griffiths, C., Drews, S.J. and Marchant, D.J., 2017 'Respiratory syncytial virus: Infection, detection, and new options for prevention and treatment', Clinical Microbiology Reviews, 30(1), pp. 277–319.

- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Walsh, E.E. and Hall, C.B., 2014. Respiratory syncytial virus (RSV). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, p.1948.

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

