راهنمای کیت

Resp I RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۱/۰

جهت تشخیص RNA ویروس‌های RSV ,Human Influenza A/B,SARS-CoV-2

به روش Multiplex Real-Time RT-PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene

مخصوص تحقیقات

24 (Cat#RespIRQ24)

48 (Cat#RespIRQ48)

96 (Cat#RespIRQ96)

NG-WI-ASL-61-100

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

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

Novin Gene

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..... ۸
۱۴. دستورکار RT-PCR و مراحل آزمایش..... ۸
۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها..... ۹
۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۹
۱۷. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۱۱
۱۸. تحلیل نتایج Rotor-Gene..... ۱۱

۱۹. میزان حساسیت..... ۱۵
۲۰. روش امحاء..... ۱۵
۲۱. پشتیبانی فنی..... ۱۵
۲۲. اطلاعات تماس..... ۱۶
۲۳. منابع..... ۱۶
۲۴. توضیحات برچسب..... ۱۷

۱. مقدمه

کیت Resp I RQ جهت تشخیص RNA ویروس‌های SARS-CoV-2 انفلونزا A / انفلونزا B و RSV (Respiratory Syncytial Virus RSV) و به روش RT-PCR Multiplex Real-time طراحی شده است. در این روش، RNA ویروس به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین میکس این کیت حاوی سری دیگری از پرایمرها و پروب جهت شناسایی ژن RNase P 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 های SARS-CoV-2، انفلونزا A یا B (بدون تفکیک بین دو نوع انفلونزا A و B) و RSV را به روش Multiplex Real-Time RT-PCR فراهم می‌کند. همچنین ژن RNase P به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است. این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

کورونا ویروس‌ها (Corona viruses) حاوی ژنوم تک رشته ای RNA و دارای پوشش لیپیدی هستند. اواخر سال 2019 نوع جدیدی از بتا کورونا ویروس شناسائی شد که می‌تواند موجب سندرم حاد تنفسی شود. این ویروس با نام Sever Acute Respiratory Syndrom Coronaviurs 2 یا بطور خلاصه SARS CoV-2 نامیده میشود و به بیماری حاصل از آن COVID-19 گفته می‌شود.

ویروس‌های انفلونزا A و انفلونزا B هر دو از خانواده اورتومیکسو ویروس‌ها (Orthomyxoviridae) بوده و حاوی ژنوم تک رشته ای RNA با پوشش لیپیدی می باشند. 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 شود.

ویروس RSV یا Respiratory Syncytial Virus عمدتا باعث عفونت قسمت‌های پایین تر دستگاه تنفسی می‌شود و علایمی مشابه سرماخوردگی خفیف ایجاد می‌کند. با این وجود این ویروس می تواند عامل عفونت‌های شدید نیز باشد.

۴. اساس آزمایش

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

۵. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
Resp A Mix	میکس RT-PCR* برای تشخیص RSV, Flu A, Flu B, SARS-CoV-2	۴۸۰ میکرولیتر
Resp A Pos Ctrl	شاهد مثبت	۱۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

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

۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست وچهار، 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 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 نمی‌باشد.

۹. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-TimePCR 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
- 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 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.
- از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارآیی آنها می‌شود.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش، نمونه به دست آمده از بخش فوقانی دستگاه تنفس شامل سواب حلقی-بینی می‌باشد.

نمونه در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد برای ۴۸ ساعت قابل نگهداری است و برای زمان های طولانی تر می باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر یا پائین تر نگهداری شود. در چنین شرایطی نمونه تا چندین روز پایدار می‌ماند.

۱۲. کنترل داخلی

برای ارزیابی کیفیت استخراج RNA، احتمال مهار RT-PCR و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، میکس واکنش حاوی پرایمرها و پروب مخصوص ژن RNase P نیز می‌باشد. کنترل داخلی باید به تولید فلورسانس با تابش نارنجی یا ROX با CT حدود ۲۰ تا ۳۰ منجر 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 می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های 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 نمونه‌های مورد آزمایش، یک میکروتیوب برای شاهد مثبت و یک میکروتیوب برای کنترل منفی (آب) نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله ۲۰ میکرولیتر از Resp A Mix اضافه کنید. سپس ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده، کنترل مثبت یا آب به هر لوله اضافه کنید.

درپوش میکروتیوب ها را بگذارید. 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 Resp I RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene و MIC طراحی شده است.

۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

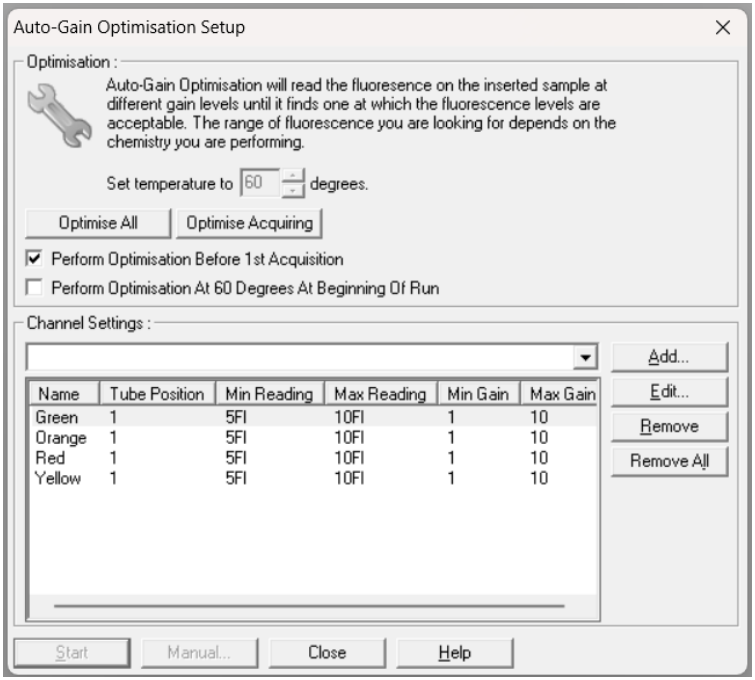
ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

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

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

Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس Resp A 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.

۱۷. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های Real-Time PCR استفاده می‌کنید، 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 رنگ‌های FAM، VIC، ROX و Cy5 تنظیم شود.

توجه داشته باشید که در این آزمایش *ROX* نباید به عنوان رنگ مرجع *(reference dye)* انتخاب شود.

۱۸. تحلیل نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation 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 Red و Orange نیز تکرار کنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدهای مثبت و منفی و کنترل داخلی تصاویر ۱، ۲، ۳ و ۴ را ملاحظه فرمایید. توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **SARS-CoV-2** و **تابش زرد (Yellow)** مربوط به **Influenza A/B**، افزایش **تابش قرمز (Red)** مربوط به **RSV** و افزایش **تابش نارنجی(Orange)** حاصل از **کنترل داخلی** یا **RNase P** می‌باشد.

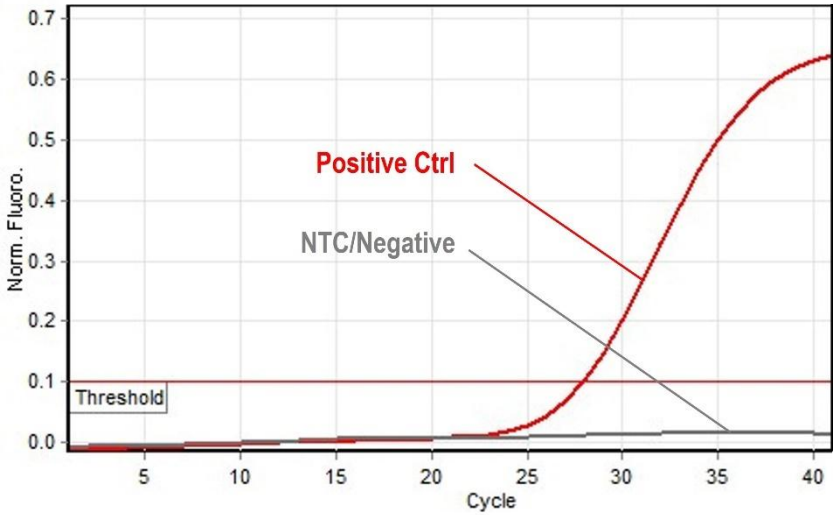
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می‌باشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

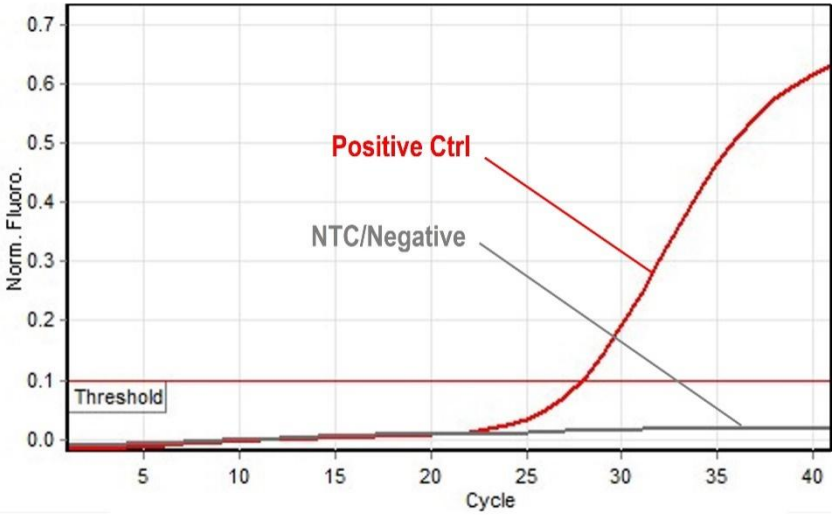
- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** مثبت با CT کمتر از ۴۰ و در کانال نارنجی مثبت با CT بین ۲۰ تا ۳۰ باشد، از نظر SARS-CoV-2 **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **زرد** مثبت با CT کمتر از ۴۰ و در کانال نارنجی مثبت با CT بین ۲۰ تا ۳۰ باشد، از نظر Influenza نوع A یا B **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **قرمز** مثبت با CT کمتر از ۴۰ و در کانال نارنجی مثبت با CT بین ۲۰ تا ۳۰ باشد، از نظر RSV **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** و **زرد** و **قرمز** منفی و در کانال **نارنجی** مثبت با CT بین ۲۰ تا ۳۰ باشد، نمونه از نظر Influenza A, B، RSV و SARS-CoV-2 منفی است.
- در صورتی که نمونه در کانال **نارنجی** منفی باشد بدون توجه به نتیجه در سه کانال **سبز** ، **زرد**، **قرمز**، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

خلاصه تفسیر نتایج آزمایش در جدول زیر آمده است.

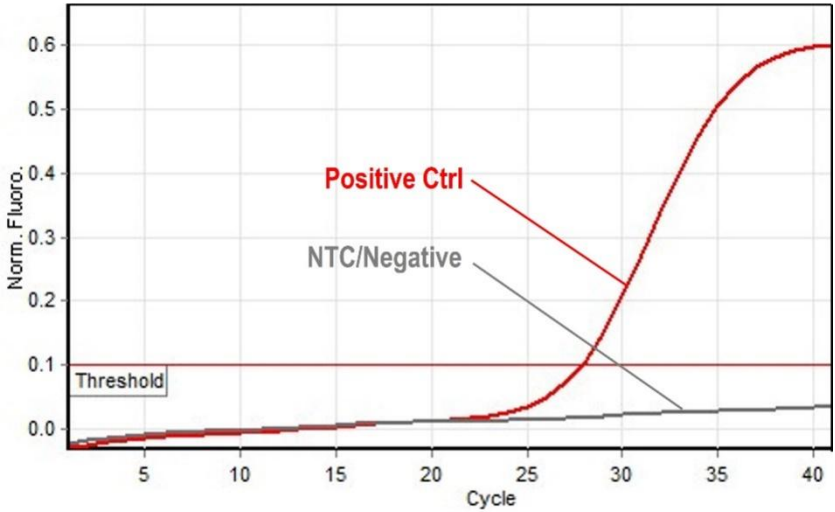
Green	Yellow	Red	Orange	Result
+	-	-	+	Pos for SARS-CoV-2
-	+	-	+	Pos for Flu A/B
-	-	+	+	Pos for RSV
-	-	-	+	Negative
- / +	- / +	- / +	-	Inconclusive



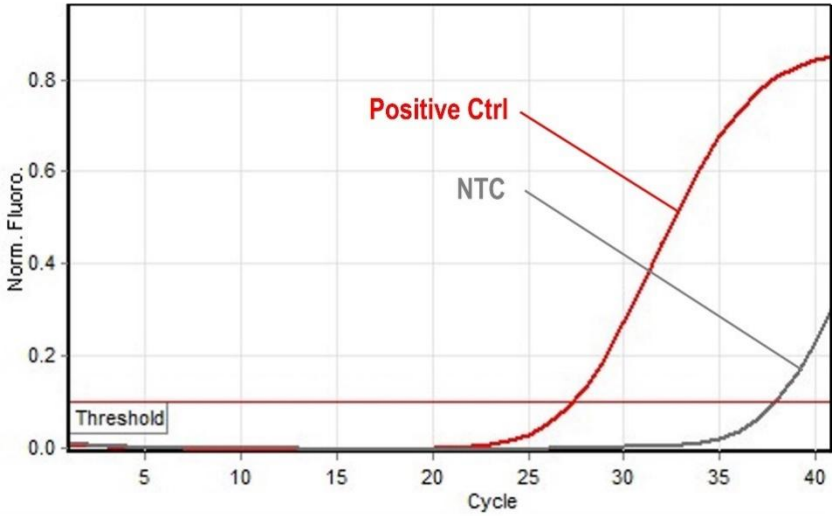
شکل ۱. منحنی شاهدها در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. منحنی شاهدها در کانال زرد دستگاه روتورژن



شکل ۳. منحنی شاهدها در کانال قرمز دستگاه روتورژن



شکل ۴. منحنی شاهدها در کانال نارنجی دستگاه روتورژن

۱۹. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم SARS-CoV-2، آنفولانزا A, B و RSV بررسی شده است. برای SARS-CoV-2 معادل ۱۳ کپی در میکرولیتر می‌باشد و برای انفولانزا A و B معادل ۱۰ کپی در میکرولیتر و برای RSV معادل ۹ کپی در میکرولیتر می‌باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتر ویروس در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیتر نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

۲۰. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیک یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیما 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.

۲۱. پشتیبانی فنی

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

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱
Info@novingene.com

۲۲. 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.ir

۲۳. 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.
- 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.
- 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.

۲۴. توضیحات برچسب

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

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

Resp I RQ
Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.0

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

Σ 24 (Cat#RespIRQ24)
Σ 48 (Cat#RespIRQ48)
Σ 96 (Cat#RespIRQ96)
NG-WI-ASL-61-100

RUO

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

Novin Gene

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 5
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 7
15. Devices and software 7
16. Programming of the Rotor-Gene 7
17. Programming Other Machines 8
18. Data Analysis: Rotor-Gene 9
19. Sensitivity 13
20. Disposal Method 13

21. Technical Support 13
22. Contact Information 13
23. References 13
24. Symbols 14

1. Introduction

Resp I RQ kit provides a ready-to-use Real-Time RT-PCR test designed for detecting RNA of the following viruses, SARS-CoV-2, Influenza A virus/Influenza B virus, and RSV. 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 RNase P as an Internal Control (IC).
This kit is intended for Research Use Only!

2. Intended Use

Resp I RQ kit is intended for detecting RNA of following viruses, SARS-CoV-2, Human Influenza A or B viruses (without differentiation between A and B), and RSV RNA. Detection is achieved using One-Step Multiplex Real-Time RT-PCR system with Rotor-Gene and MIC machine.

3. Background Information

Coronaviruses are enveloped viruses with single stranded RNA genome which lead to respiratory illnesses.
With the emergence of SARS (Sever Acute Respiratory Syndrome by SARS CoV), 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.
Respiratory Syncytial Virus (RSV) is also an enveloped RNA virus and belongs to Paramyxoviridae family. RSV mostly causes lower respiratory tract infections with cold like symptoms in healthy

individuals, but it may also cause severe respiratory infections in some.

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
Resp A Mix	RT-PCR Master mix* for SARS-CoV-2, Flu A/Flu B, RSV	480 µl
Resp A Pos Ctrl	Positive Control	150 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 accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters 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

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- Treat all samples as potentially infectious.

- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the master-mix is aliquoted into tubes, and c) Reaction preparation area for addition of extracted RNA to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw 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 tubes on crushed ice. Use cold block instead.

11. Specimen, Storage and Transport

Proper sample to test is upper respiratory tract sample mainly nasopharyngeal swab. Samples can be stored at 2-8°C for a few hours or at -20°C or lower for up to a few months.

12. Internal Control (IC)

To assess the possibility of RNA extraction failure and PCR inhibition and to prevent false negative results, The Resp A Mix contains primers and probe of a housekeeping gene (RNase P) as an internal control (IC). In a successful RNA extraction and RT-PCR test, IC should generate a CT of 20-30 in Orange/Rox 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 required number of tubes on cold block. Consider one tube for each sample plus one for positive sample and one for water.

Aliquot 20µl of Resp A Mix directly to each PCR tube. Then add 5ul of extracted RNA, Positive Control or water.

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

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

15. Devices and software

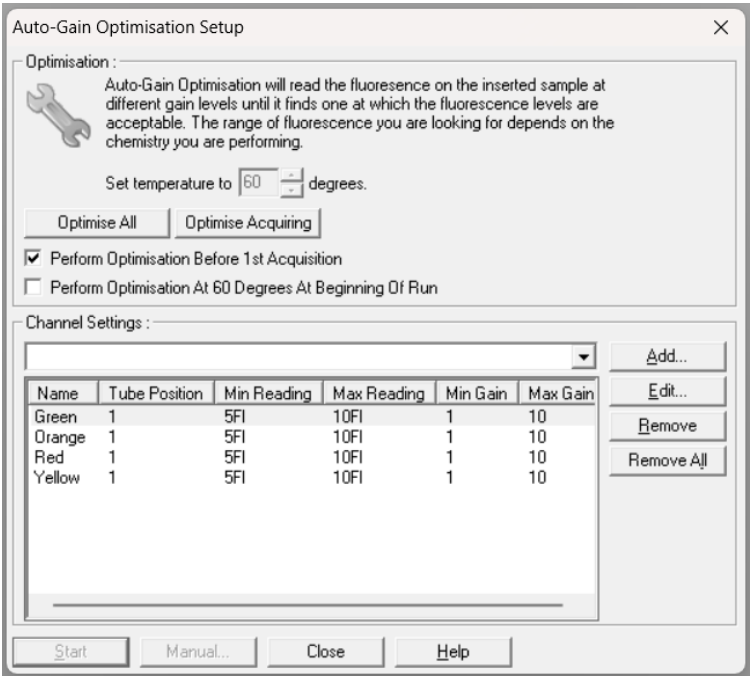
Resp I RQ kit is designed to work with Rotor-Gene and MIC.

16. Programming of the Rotor-Gene

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

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



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

17. 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, VIC, ROX and Cy5 dyes.

In this experiment, ROX should not be selected as the reference dye.

18. 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 A. Green. Manually put threshold, at 0.1. Repeat the above for Yellow, Red and Orange Channels.
Figures 1, 2, 3 and 4 represent typical graphs for Rotor-Gene.
To interpret the results, please note that:
A Signal in the **Green** channel indicates **SARS-CoV-2,** a signal in the **Yellow** channel is due to **Influenza A or B**, **Red** channel is due to **RSV** and **Orange** channel indicates **IC or RNase P.**

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** for SARS-CoV-2 if it is positive in the **Green** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40 and also positive in the **Orange** channel with a CT of 20-30.
- 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 and also positive in the **Orange** channel with a CT of 20-30.
- A sample is **Positive** for RSV if it is positive in the **Red** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40 and also positive in the **Orange** channel with a CT of 20-30.
- A sample is **Negative** for Influenza A, B, RSV and SARS-CoV-2 if it is negative in the **Green** and the **Yellow** and the **Red** channels while it is positive in the **Orange** channel with a sigmoid graph and CT of 20-30.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in **Orange** channel.

The interpretation of results is summarized in bellow Table.

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

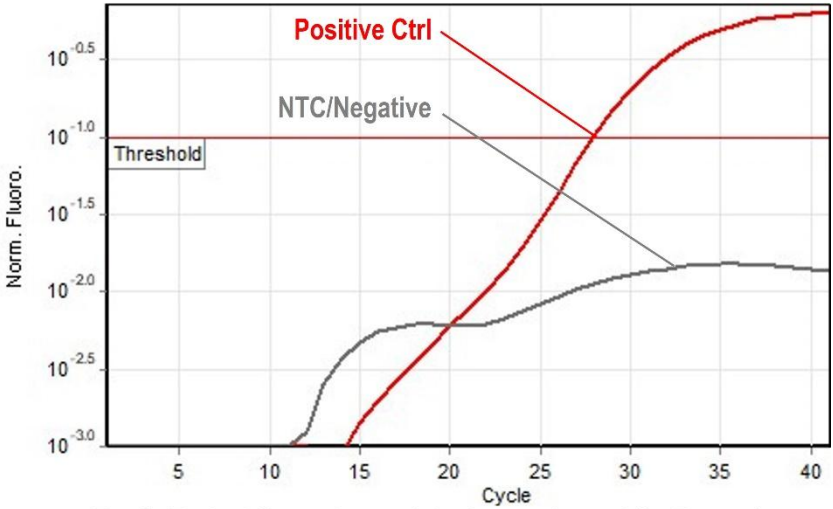


Fig 1. Typical Controls graph in Green channel for Rotor-Gene

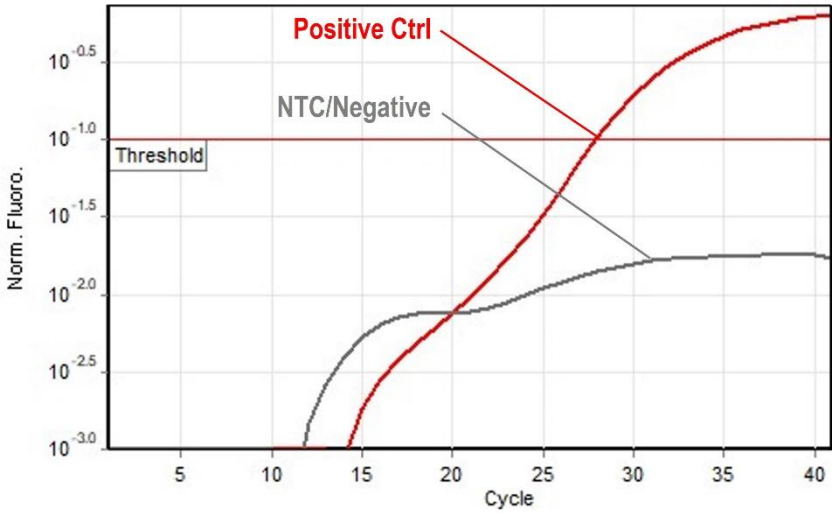


Fig 2. Typical Controls graph in Yellow channel for Rotor-Gene

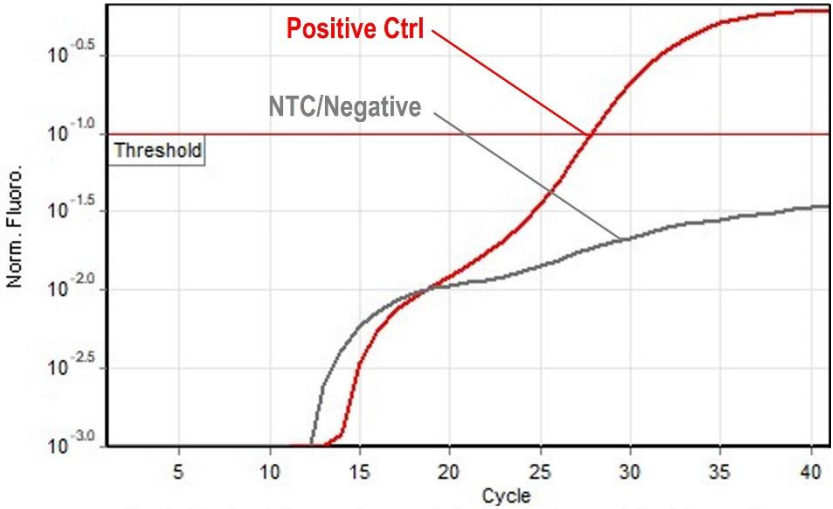


Fig 3. Typical Controls graph in Red channel for Rotor-Gene

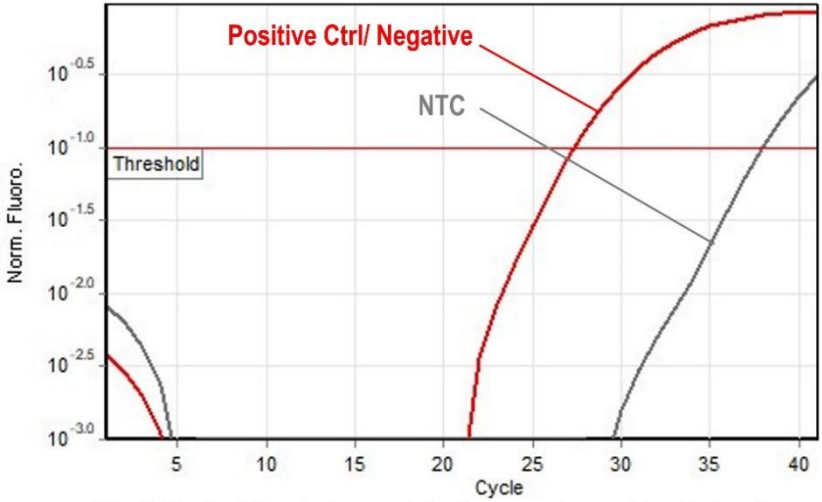


Fig 4. Typical Controls graph in Orange channel for Rotor-Gene

19. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with the cloned targets genomes and showed a limit of detection equal to 13 copies/µl for SARS-CoV-2 and 10 copies/µl for Influenza A and B, and 9 copies/µl for RSV.

20. Disposal Method

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

21. Technical Support

For technical support, contact us via
Phone: +98 993-6223241
Email: info@novingene.com

22. 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

23. 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.

- 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.
- 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.

24. Symbols

RUO	Research use only		Manufacturer		Consult instructions for use
LOT	Lot number	Σ	Content sufficient for <n> tests		Use-by date
REF	Catalogue number	SN	Serial number	-10°C -30°C	Temperature limit

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