

راهنمای کیت Resp II RQ

پاییز ۱۴۰۳، ویرایش ۱/۰

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

Respiratory Syncytial Virus (RSV)

Human parainfluenza viruses 1-4 (HPIV1-4)

به روش Multiplex Real-Time RT-PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene

مخصوص تحقیقات

Σ 24 (Cat# ResplIRQ24)

Σ 48 (Cat# ResplIRQ48)

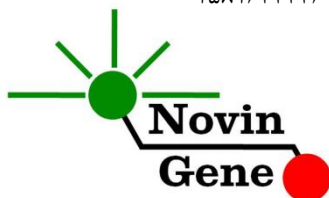
Σ 96 (Cat# ResplIRQ96)

HB NG-WI-ASL-63-100

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

| | | |
|-----|--------------------|----|
| ۱۹. | میزان حساسیت..... | ۲۰ |
| ۲۰. | روش امحاء..... | ۲۰ |
| ۲۱. | پشتیبانی فنی..... | ۲۱ |
| ۲۲. | اطلاعات تماس..... | ۲۱ |
| ۲۳. | منابع..... | ۲۱ |
| ۲۴. | توضیحات برچسب..... | ۲۲ |

۱. مقدمه

کیت Resp II RQ جهت تشخیص RNA ویروس های SARS-CoV-2، انفلونزا A / انفلونزا B و RSV (Respiratory Syncytial Virus RSV) و پارا انفلونزا نوع ۱ تا ۴ (Human Parainfluenza Viruses HPIV1-4) بوده و طراحی آن به روش Multiplex Real-time RT-PCR می باشد. در این روش، RNA ویروس به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می شود. همچنین در این کیت، میکس Resp A حاوی سری دیگری از پرایمرها و پروب جهت شناسایی ژن RNase P به عنوان کنترل داخلی می باشد. کنترل داخلی از گزارش منفی کاذب ناشی از استخراج نامناسب و یا مهار PCR جلوگیری می کند. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

۲. حیطه کاربرد

کیت حاضر حاوی دو میکس Resp A و Resp B می باشد. میکس Resp A امکان بررسی نمونه بیمار، جهت تشخیص ویروسهای SARS-CoV-2، انفلونزا A یا B (بدون تفکیک بین دو نوع انفلونزا A و B) و RSV را فراهم می کند همچنین با این میکس ژن RNase P به عنوان کنترل داخلی بررسی می شود. میکس Resp B نمونه را از نظر ویروس های پارا انفلونزا نوع ۱ تا ۴ را (با تفکیک چهار تایپ از یکدیگر) به روش Multiplex Real-Time RT-PCR بررسی می کند. این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

کورونا ویروس ها (Corona viruses) حاوی ژنوم تک رشته ای RNA و دارای پوشش لیپیدی هستند. اواخر سال ۲۰۱۹ نوع جدیدی از بتا کورونا ویروس

شناسائی شد که می‌تواند موجب سندرم حاد تنفسی شود. این ویروس با نام 2 Sever Acute Respiratory Syndrom Coronaviurs 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 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 شود.

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

ویروس پارا انفلونزا Human Parainfluenza Viruses یا HPIV حاوی ژنوم تک رشته ای RNA و از خانواده پارامیکسو ویروس‌ها (Paramyxoviridae) می‌باشد و به عنوان عامل ایجاد عفونت‌های تنفسی خصوصاً در کودکان شناخته می‌شود. این ویروس‌ها به چهار نوع HPIV1-4 تقسیم شده و با علائم مشابه سرماخوردگی از خفیف تا شدید ظاهر می‌شوند.

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی عامل عفونی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR/ Polymerase Chain Reaction 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 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 B Mix | میکس RT-PCR* برای تشخیص Human Parainfluenza Viruses (HPIV1-4) | ۴۸۰ میکرولیتر |
| Resp A Pos Ctrl | شاهد مثبت برای Resp A | ۱۵۰ میکرولیتر |
| Resp B Pos Ctrl | شاهد مثبت برای Resp B | 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 و چهار، چهار و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می باشد.

۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰- درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند. از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود. همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

۸. محدودیت کاربرد

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

۹. سایر موارد مورد نیاز

- برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:
- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
 - ورتکس (Vortex Mixer)

- 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 کاملاً ذوب نموده و 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 یخ های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.**

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

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای SARS-CoV-2 و RSV نمونه بدست آمده از بخش فوقانی و یا تحتانی دستگاه تنفسی می‌باشد و برای انفلونزا نمونه بخش فوقانی دستگاه تنفسی و سواب بینی- حلقی مناسب تر است. 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 پایین 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، Resp A Mix حاوی پرایمرها و پروب مخصوص ژن RNase P نیز می‌باشد. واکنش نمونه با میکس Resp A برای کنترل داخلی باید به تولید فلورسانس با تابش نارنجی یا ROX با CT حدود ۲۰ تا ۳۰ منجر شود. توجه نمایید تمامی نمونه بیمارها باید با Resp A Mix از جهت کنترل داخلی بررسی 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. استفاده از کیت های زیر توصیه می‌شود:

- 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. این کیت حاوی دو میکس می باشد. میکس Resp A برای تشخیص ویروس های SARS-CoV-2 انفلونزا A یا B و RSV و میکس Resp B که جهت بررسی نمونه از نظر وجود چهار ویروس پارا انفلونزا نوع ۱ تا ۴ می باشد. به این منظور هر نمونه همزمان با دو میکس بررسی می شود. برای هر میکس یک سری لوله جداگانه قرار دهید. در هر سری 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 سری اول ۲۰ میکرولیتر از **Resp A Mix** اضافه کنید. سپس ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده، **Resp A Pos Ctrl** یا آب به هر لوله اضافه کنید.

به هر لوله سری دوم ۲۰ میکرولیتر از **Resp B Mix** اضافه کنید. سپس ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده، **Resp B Pos Ctrl** 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 II RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene 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. در کارت حافظه همراه کیت روی Resp II 0.1 و یا Resp II 0.2 (با توجه به نوع میکروتیوب های استفاده شده) دوبار کلیک کنید تا برنامه باز شود.


نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منو 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.

در تنظیمات کانال (Channel Setting): برای هر چهار کانال Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس Resp A باشد) و مقدار Target Sample Range را در بازه ۱۰ تا ۱۵ قرار دهید. گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را فعال کنید و پنجره را ببندید. تنظیمات مطابق تصویر انجام شود.

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 | -10 | 10 |
| Orange | 1 | 10FI | 15FI | -10 | 10 |
| Red | 1 | 10FI | 15FI | -10 | 10 |
| Yellow | 1 | 10FI | 15FI | -10 | 10 |

تنظیمات Gain Optimisation

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.

۱۷. تنظیم سایر دستگاه ها

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

| Step | Temperature and time | Cycles |
|------|----------------------|--------|
| 1 | 50°C x 10 min | 1 |
| 2 | 95°C x 3 min | 1 |
| 3 | 95°C x 15 sec | 45 |
| | 60°C x 60 sec | |

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای 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

نتایج بر اساس واکنش نمونه‌ها با دو میکس Resp A و Resp B در چهار کانال تفسیر می‌شود. در جدول زیر به طور خلاصه مشخص شده است که چهار کانال مورد بررسی برای هر یک از میکس‌ها مربوط به کدام ویروس است.

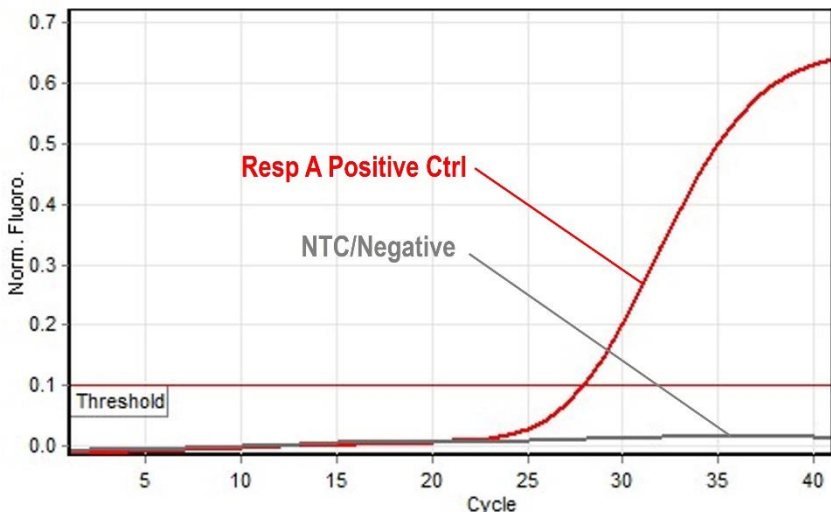
| Mix/Channel | Green/FAM | Yellow/HEX | Orange/ROX | Red/Cy5 |
|-------------|------------|------------------|---------------|---------|
| Resp A Mix | SARS-CoV-2 | Influenza A or B | Internal Ctrl | RSV |
| Resp B Mix | HPIV-1 | HPIV-2 | HPIV-3 | HPIV-4 |

الف) آنالیز نتایج نمونه‌ها با Resp A Mix:

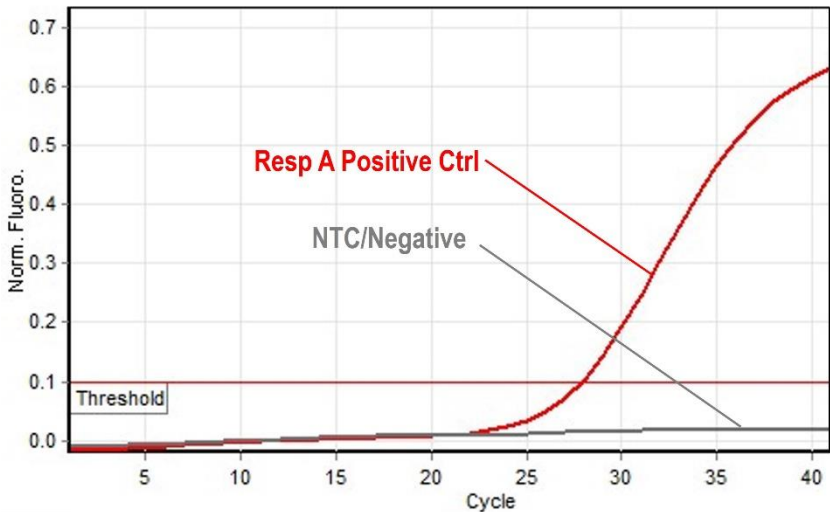
به طور خلاصه از منوی Quantitation, Analysis را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. سپس آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. فرایند فوق را برای سایر کانال‌های Yellow و Red و Orange نیز تکرار کنید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهد‌های مثبت و منفی و کنترل داخلی تصاویر ۱، ۲، ۳ و ۴ را ملاحظه فرمایید. توجه داشته باشید که با میکس Resp A افزایش تابش سبز (Green) مربوط به **SARS-CoV-2** و افزایش 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.

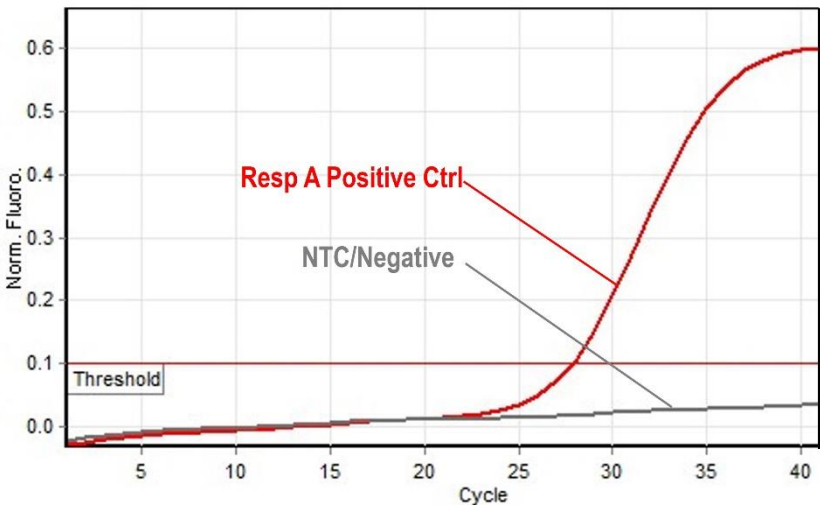
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می‌شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت **CT** معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموئیدی، نمونه منفی محسوب می‌شود و **CT** آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می‌باشد.



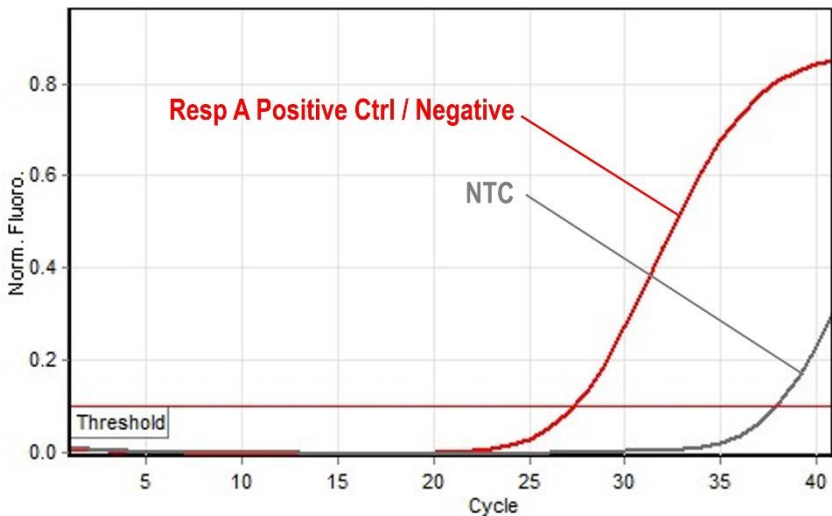
شکل ۱. منحنی‌های شاهد با Resp A Mix در کانال سبز دستگاه روتورژن SARS-CoV-2



شکل ۲. منحنی شاهدها با Resp A Mix در کانال زرد دستگاه روتورژن (Influenza A / B)



شکل ۳. منحنی شاهدها با Resp A Mix در کانال قرمز دستگاه روتورژن (RSV)



شکل ۴. منحنی شاهد با Resp A Mix در کانال نارنجی دستگاه روتورژن (کنترل داخلی)

نتایج نمونه با **Resp A Mix** 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 RSV، Influenza A, B 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.

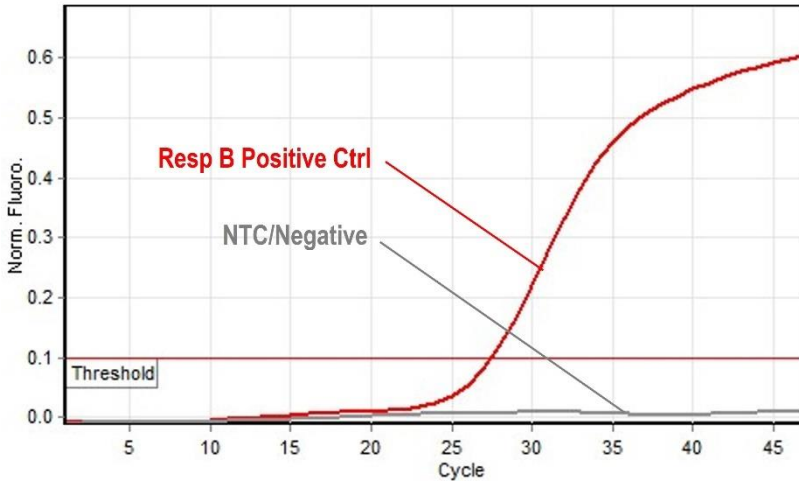
خلاصه تفسیر نتایج با Resp A Mix در جدول زیر آمده است.

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

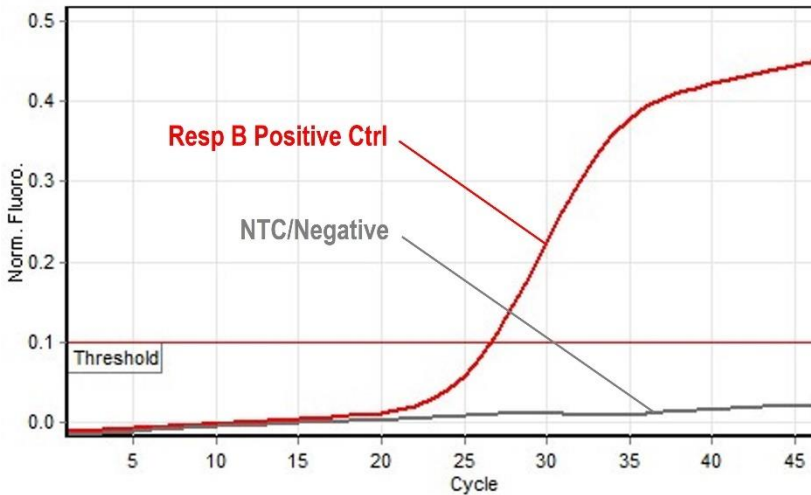
ب) آنالیز نتایج نمونه ها با Resp B Mix :

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 و Red نیز تکرار کنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید و برای کانال Orange آستانه را روی ۰/۰۵ تنظیم نمایید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهد های مثبت و منفی و کنترل داخلی تصاویر ۵، ۶، ۷ و ۸ را ملاحظه فرمایید. توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **HPIV-1**، افزایش **تابش زرد (Yellow)** مربوط به **HPIV-2**، افزایش **تابش نارنجی (Orange)** حاصل از **HPIV-3** و افزایش **تابش قرمز (Red)** مربوط به **HPIV-4** می باشد.

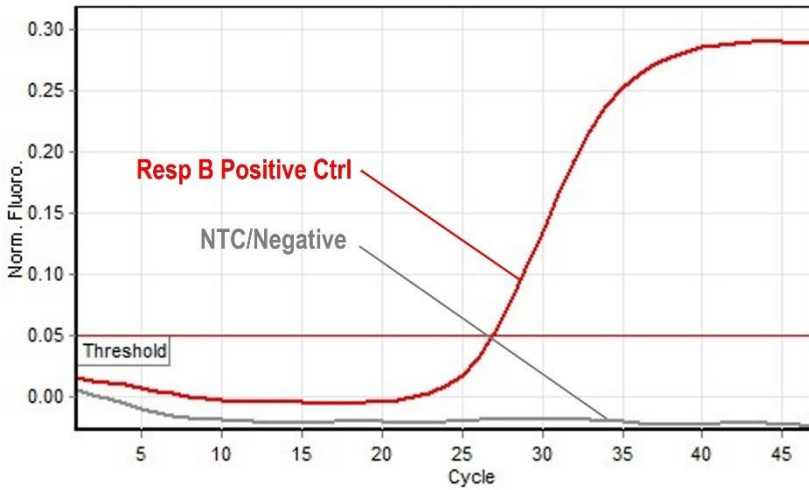
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموئیدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می باشد.



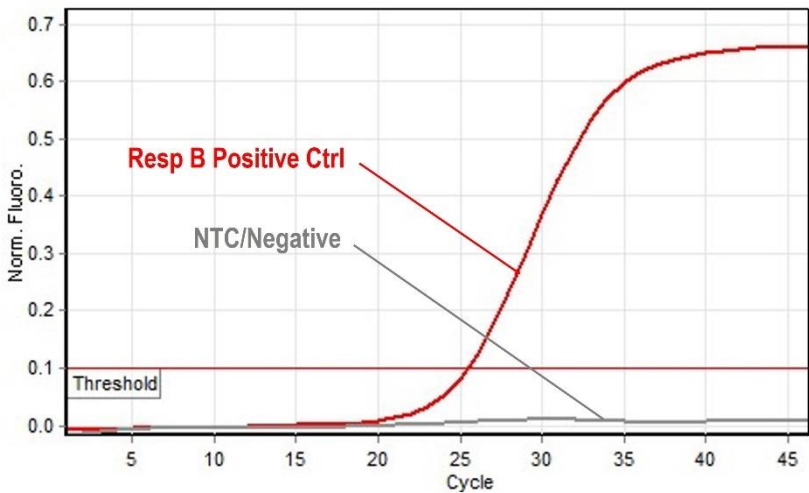
شکل ۵. منحنی شاهدها با Resp B Mix در کانال سبز دستگاه روتورژن (HPIV-1)



شکل ۶. منحنی شاهدها با Resp B Mix در کانال زرد دستگاه روتورژن (HPIV-2)



شکل ۷. منحنی شاهدها با Resp B Mix در کانال نارنجی دستگاه روتورژن (HPIV-3)



شکل ۸. منحنی شاهدها با Resp B Mix در کانال قرمز دستگاه روتورژن (HPIV-4)

- نتایج نمونه با **Resp B Mix** را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:
- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** مثبت با CT کمتر از ۴۰ و کنترل داخلی در کانال نارنجی با میکس Resp A با CT بین ۲۰ تا ۳۰ مثبت باشد، از نظر HPIV-1 **مثبت** است.
 - در صورتی که نمونه در کانال **زرد** مثبت با CT کمتر از ۴۰ و کنترل داخلی در کانال نارنجی با میکس Resp A با CT بین ۲۰ تا ۳۰ مثبت باشد، از نظر HPIV-2 **مثبت** است.
 - در صورتی که نمونه با میکس Resp B در کانال **نارنجی** با CT کمتر از ۴۰ مثبت شود و کنترل داخلی در کانال نارنجی با میکس Resp A نیز با CT بین ۲۰ تا ۳۰ مثبت باشد، نمونه از نظر HPIV-3 **مثبت** است.
 - در صورتی که نمونه در کانال **قرمز** مثبت با CT کمتر از ۴۰ و در کانال نارنجی با میکس Resp A با CT بین ۲۰ تا ۳۰ مثبت باشد، از نظر HPIV-4 **مثبت** است.
 - در صورتی که کنترل داخلی نمونه با میکس Resp A در کانال **نارنجی** منفی باشد بدون توجه به نتیجه ی دو میکس در کانال های دیگر نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. خلاصه تفسیر نتایج با میکس Resp B در جدول زیر آمده است.

| Resp B Mix | | | | |
|--|--------|-----|--------|---|
| Green | Yellow | Red | Orange | Result |
| + | - | - | - | Pos for HPIV-1 |
| - | + | - | - | Pos for HPIV-2 |
| - | - | - | + | Pos for HPIV-3 |
| - | - | + | - | Pos for HPIV-4 |
| - | - | - | - | Negative (if IC is Pos with Resp A in Orange channel) |
| If sample is Neg in Orange channel with Resp A Mix | | | | Inconclusive |

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 آنفولانزا A و B معادل ۱۰ کپی در میکرولیتر و برای RSV معادل ۹ کپی در میکرولیتر، برای HPIV-1 معادل ۸ کپی در میکرولیتر، برای HPIV-2 معادل ۸/۴ کپی در میکرولیتر، برای HPIV-3 معادل ۱۳/۶ کپی در میکرولیتر و برای HPIV-4 معادل ۹/۲ کپی در میکرولیتر می‌باشد. 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.

۲۰. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیک یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیماً به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه‌های عفونی آزمایشگاه را در محلول هیپوکلریت

سدیم ۵٪ به مدت حداقل یک شبانه روز قرار دهید و سپس آنها را به سطل زباله منتقل کنید.

۲۱. پشتیبانی فنی

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

۰۹۹۳۶۲۳۳۲۴۱

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.
- Liu, W.-K., Liu, Q., Chen, D.-H., Liang, H.-X., Chen, X.-K., Huang, W.-B., Qin, S., Yang, Z.-F. and Zhou, R., 2013. Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. BMC Infectious Diseases, 13(1).
 - 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

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

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

Resp II RQ Kit Manual

Fall 2024, Version 1.0

For Real-Time RT-PCR Detection of SARS-CoV-2,
Human Influenza Virus A/B, Respiratory Syncytial Virus (RSV)
and Human Parainfluenza Viruses 1-4 (HPIV1-4) RNA
For use with Rotor-Gene
For Research Use Only

 24 (Cat# RespIIRQ24)

 48 (Cat# RespIIRQ48)

 96 (Cat# RespIIRQ96)

 NG-WI-ASL-63-100

RUO



NovinGene ParsVira

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

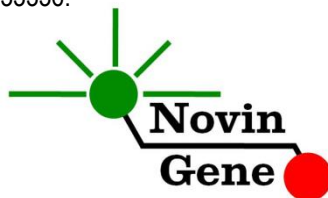


Table of Contents

| | |
|---|----|
| 1. Introduction | 3 |
| 2. Intended Use | 3 |
| 3. Background Information | 3 |
| 4. Test Principle | 4 |
| 5. Kit Contents | 4 |
| 6. Packaging models | 5 |
| 7. Storage and Stability | 5 |
| 8. Product Use Limitations | 5 |
| 9. Additionally Required Materials | 5 |
| 10. General Precautions | 6 |
| 11. Specimen, Storage and Transport | 6 |
| 12. Internal Control (IC) | 7 |
| 13. RNA Isolation | 7 |
| 14. RT-PCR Protocol | 7 |
| 15. Devices and software | 8 |
| 16. Programming of the Rotor-Gene | 8 |
| 17. Programming Other Machines | 9 |
| 18. Data Analysis: Rotor-Gene | 10 |
| 19. Sensitivity | 17 |
| 20. Disposal Method | 18 |

| | |
|------------------------------|----|
| 21. Technical Support..... | 18 |
| 22. Contact Information..... | 18 |
| 23. References | 18 |
| 24. Symbols..... | 19 |

1. Introduction

Resp II 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, Respiratory Syncytial Virus (RSV) and Human Parainfluenza Viruses types 1 to 4 (HPIVs 1-4). All required reagents are included in the PCR Mixes provided in the kit. Resp A 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

The Resp II RQ kit includes two distinct Mixes, Resp A Mix and Resp B Mix. Resp A Mix is designed for detecting RNA from SARS-CoV-2, Human Influenza A or B viruses (without distinguishing between A and B), RSV and RNase P gene as IC. Resp B Mix is intended for the detection of HPIVs 1 to 4. Mixes are used with a One-Step Multiplex Real-Time RT-PCR system with the Rotor-Gene machine.

3. Background Information

Coronaviruses are enveloped viruses characterized with single stranded RNA genome, which cause respiratory illnesses.

The emergence of SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome by SARS CoV), MERS (Middle East Respiratory Syndrome by MERS CoV), and recently COVID-19 (by SARS CoV-2), has highlighted their significant impact on global health.

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.

Human parainfluenza viruses are single-stranded RNA viruses classified under the paramyxoviridae family. These viruses are divided into four distinct types HPIV-1, HPIV-2, HPIV-3 and HPIV-4, each associated with different clinical symptoms and varying degrees of severity. Signs and symptoms are similar to common cold, but it can also cause more serious infection especially in children.

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 with Rotor-Gene templates and the following reagents:

| Label | Content | Quantity |
|-----------------|---|----------|
| Resp A Mix | RT-PCR mix* for SARS-CoV-2, Flu A/Flu B, RSV | 480 µl |
| Resp B Mix | RT-PCR mix* for Human Parainfluenza Viruses (HPIV1-4) | 480 µl |
| Resp A Pos Ctrl | Positive Control for Resp A | 150 µl |

| | | |
|-----------------|-----------------------------|--------|
| Resp B Pos Ctrl | Positive Control for Resp B | 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 the and the accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- 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

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 PCR tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- **Place kit components on ice till completely thawed, 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 0.2ml PCR tubes on crushed ice. Use cold block instead.

11. Specimen, Storage and Transport

Proper samples for testing SARS CoV-2 and RSV can be collected from upper and lower respiratory tract and for Influenza from upper respiratory tract, mainly nasopharyngeal swabs. These samples should be stored at 2-8°C for a few hours and at -20°C or lower for up to a few weeks.

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 a probe targeting the housekeeping gene RNase P as an internal control (IC). In a successful RNA extraction and RT-PCR test, the reaction of sample with Resp A Mix should generate a CT of 20-30 in Orange/Rox Channel. So, all patient samples must be examined with Resp A Mix to control RNA extraction.

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. This kit includes two mixes, [Resp A Mix](#) which detects SARS-CoV-2, Influenza A/B virus and RSV and [Resp B Mix](#) which detects HPIVs 1-4. Each sample should be examined with both mixes in two separate series of reactions. In each series, consider one tube for each sample plus one for positive control and one for water.

Aliquot 20µl of Resp A Mix to the first series of PCR tube followed by adding 5ul of extracted RNA, Positive Control A or water.

Aliquot 20µl of Resp B Mix to each tube of the second series followed by adding 5ul of extracted RNA, Positive Control B or water.

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

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

15. Devices and software

Resp II RQ kit is designed for use with Rotor-Gene.

16. Programming of the Rotor-Gene

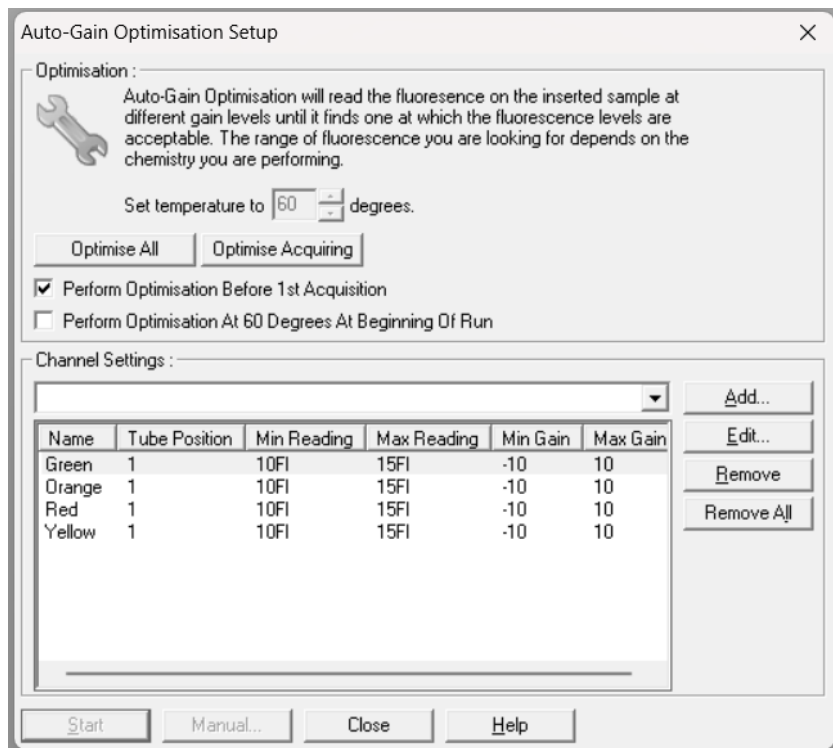
Before starting the machine, ensure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the memory card provided in the kit and double-click on Respiratory template "Resp II 0.2" or "Resp II 0.1" depending on the tubes used.

Note: To adjust the gain in the software, go to the View menu. Then, select the Gain Optimisation. Under the Auto-Gain Optimisation Setup first, select the Optimise Acquiring option.

In the Channel Setting, set the Tube Position to number 1 for all channels (consider that Tube number 1 should contain Mix Resp A). and set the Target Sample range within the range of 10 to 15. Enable the option Perform Optimisation Before 1st Acquisition option and close the window.

Adjust the setting according to the bellow image.



Gain Optimisation Setting

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.

18. Data Analysis: Rotor-Gene

The results are interpreted based on the reaction of the samples with two mixes (Resp A Mix and Resp B Mix) in four channels. It is specified in the next table that the four channels of each mix are related to which virus.

| Mix/Channel | Green/FAM | Yellow/HEX | Orange/ROX | Red/Cy5 |
|-------------|------------|------------------|---------------|---------|
| Resp A Mix | SARS-CoV-2 | Influenza A or B | Internal Ctrl | RSV |
| Resp B Mix | HPIV-1 | HPIV-2 | HPIV-3 | HPIV-4 |

A) Analysis of the sample results with [Resp A Mix](#):

To analyze data of [Resp A Mix](#) 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 with Resp A Mix for Rotor-Gene.

To interpret the results, please note that:

In the [Resp A Mix](#), a signal detected in the **Green** channel indicates **SARS-CoV-2**, a signal in the **Yellow** channel is due to **Influenza A or B**, a signal in the **Red** channel represents **RSV**, and a signal in the **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.

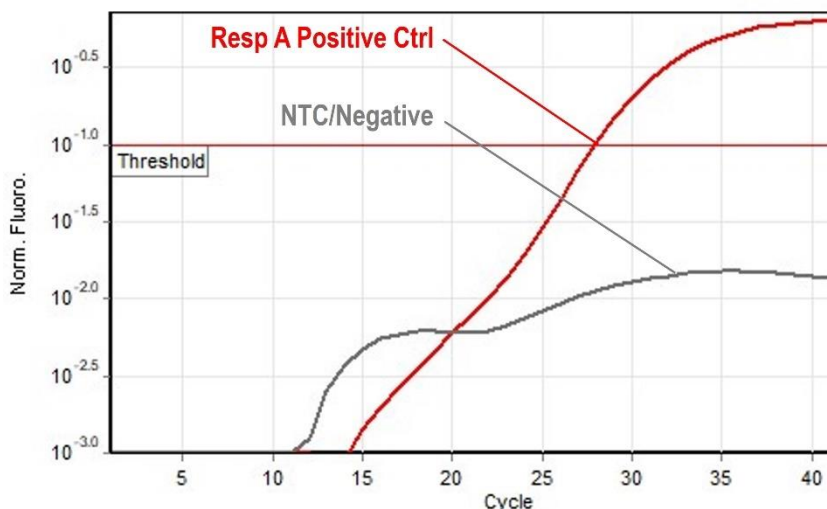


Fig 1. Typical Controls graph with Resp A Mix in Green channel for Rotor-Gene (SARS-CoV-2)

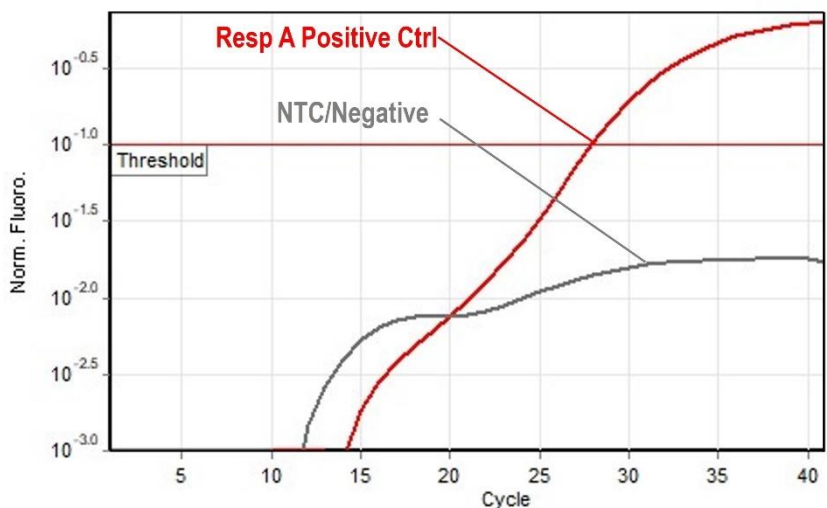


Fig 2. Typical Controls graph with Resp A Mix in Yellow channel for Rotor-Gene (Influenza A or B)

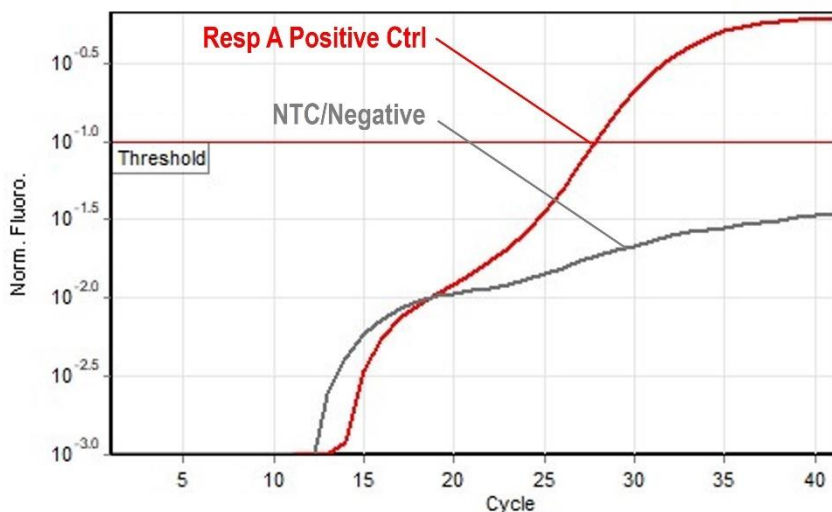


Fig 3. Typical Controls graph with Resp A Mix in Red channel for Rotor-Gene (RSV)

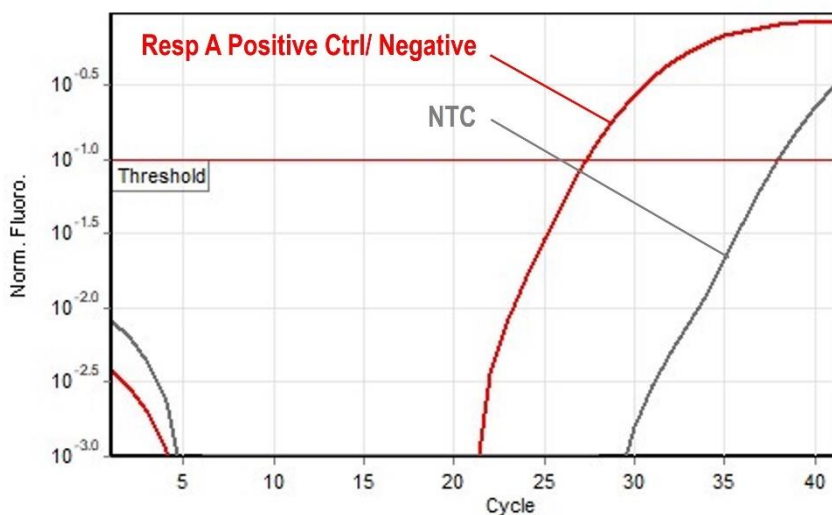


Fig 4. Typical Controls graph with Resp A Mix in Orange channel for Rotor-Gene (Internal Control)

Consider the following points when analyzing results with [Resp A Mix](#):

- 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 with Resp A Mix.

The interpretation of results is summarized in the following Table.

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

B) Analysis of the sample results with Resp B Mix:

To analyze data of **Resp B Mix** briefly, click on the analysis menu and then under Quantitation tab double click on cycling A. Green. Manually put threshold, at 0.1 for Green, Yellow and Red. Repeat the above for Orange Channel and put threshold at 0.05.

Figures 5, 6, 7 and 8 represent typical graphs with Resp B Mix for Rotor-Gene.

Signal with **Resp B Mix** in the **Green** channel indicates **HPIV-1**, a signal in the **Yellow** channel is due to **HPIV-2**, **Orange** channel indicates **HPIV-3** and **Red** channel is due to **HPIV-4**.

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.

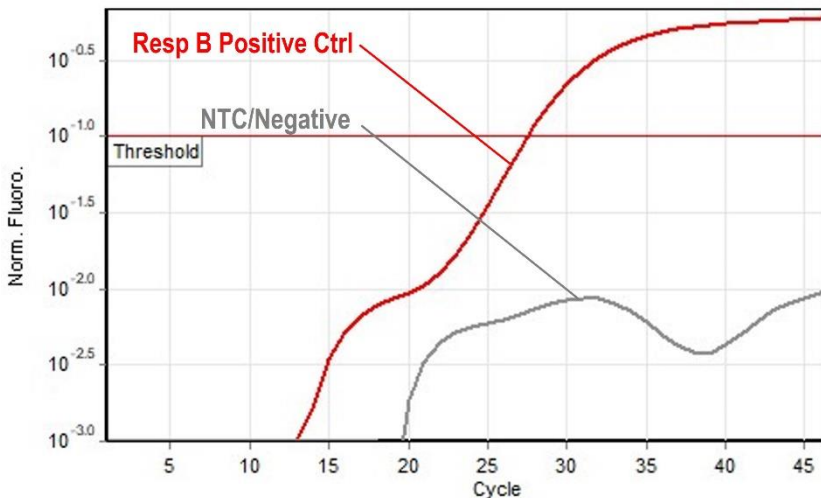


Fig 5. Typical Controls graph with Resp B Mix in Green channel for Rotor-Gene (HPIV-1)

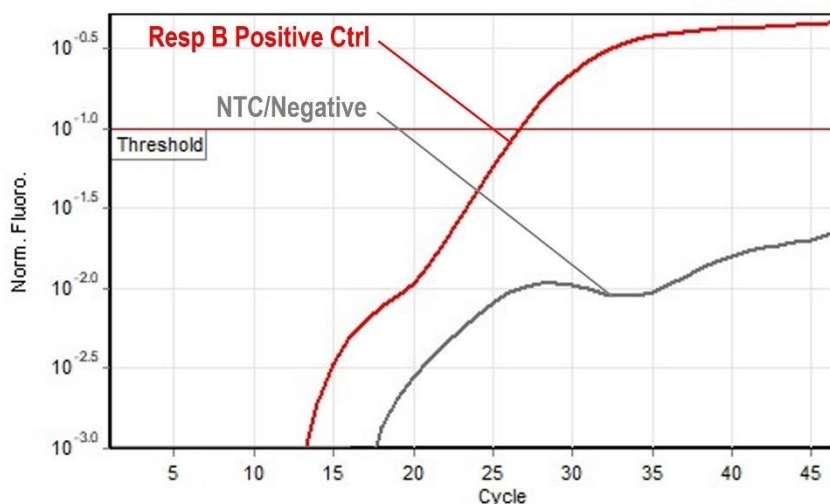


Fig 6. Typical Controls graph with Resp B in Yellow channel for Rotor-Gene (HPIV-2)

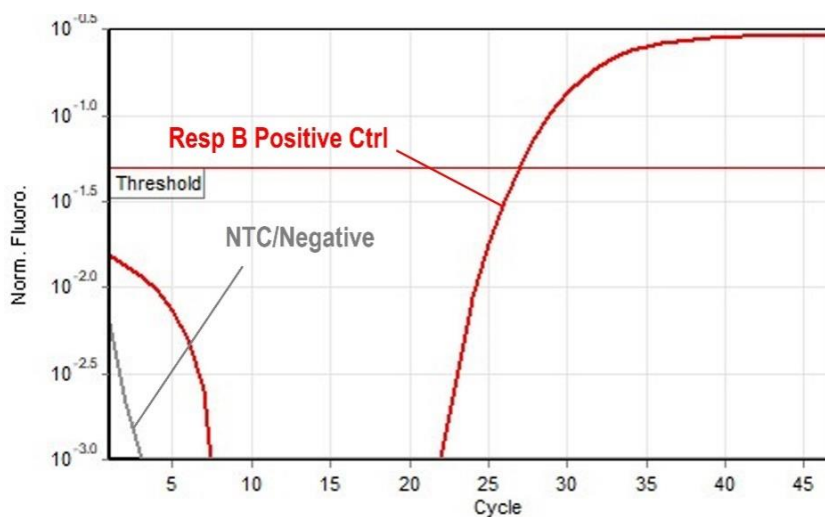


Fig 7. Typical Controls graph with Resp B Mix in Orange channel for Rotor-Gene (HPIV-3)

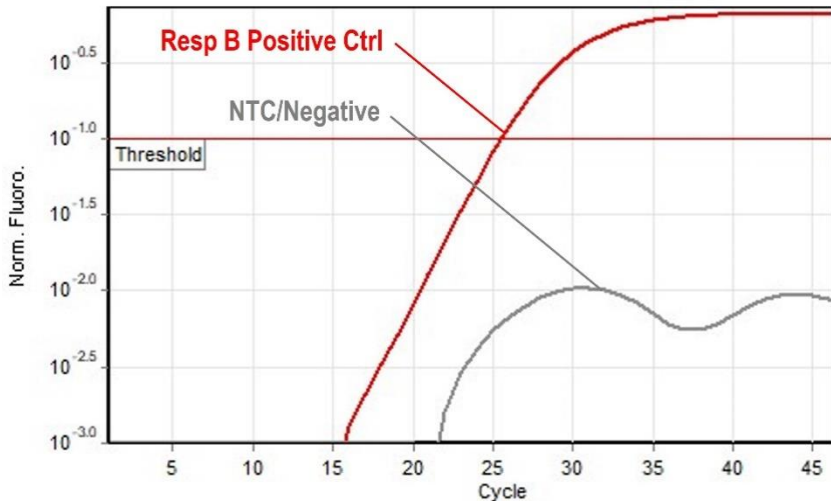


Fig 8. Typical Controls graph with Resp B in Red channel for Rotor-Gene (HPIV-4)

Consider the following points when analyzing with **Resp B Mix:**

- A sample is **Positive** for HPIV-1 if it is positive in the **Green** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40 and also positive for IC with Resp A Mix in the **Orange** channel with a CT of 20-30.
- A sample is **Positive** for HPIV-2 if it is positive in the **Yellow** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40 and also positive for IC with Resp A Mix in the **Orange** channel with a CT of 20-30.
- A sample is **Positive** for HPIV-3 if it is positive with Resp B Mix in the **Orange** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40 and also positive for IC with Resp A Mix in the **Orange** channel with a CT of 20-30.
- A sample is **Positive** for HPIV-4 if it is positive in the **Red** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40 and

also positive for IC with Resp A Mix in the **Orange** channel with a CT of 20-30.

- A sample is **Negative** for Human Para Influenza viruses types 1 to 4 if it is negative in the **Green** and the **Yellow** and the **Red** channels while IC is positive with Resp A Mix 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 IC is negative with Resp A Mix in the **Orange** channel.

The interpretation of results is summarized in the following Table.

| Resp B Mix | | | | Result |
|--|--------|-----|--------|---|
| Green | Yellow | Red | Orange | |
| + | - | - | - | Pos for HPIV-1 |
| - | + | - | - | Pos for HPIV-2 |
| - | - | - | + | Pos for HPIV-3 |
| - | - | + | - | Pos for HPIV-4 |
| - | - | - | - | Negative (if IC is Pos with Resp A in Orange channel) |
| If sample is Neg in Orange channel with Resp A Mix | | | | Inconclusive |

19. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with the cloned targets genomes (partial) and showed a limit of detection equal to 13 copies/μl for SARS-CoV-2 and 10 copies/μl for Influenza A and B, 9 copies/μl for RSV, 8 copies/μl for HPIV-1, 8.4 copies/μl for HPIV-2, 13.6 copies/μl for HPIV-3 and 9.2 copies/μl for HPIV-4.

20. 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.

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.
- Liu, W.-K., Liu, Q., Chen, D.-H., Liang, H.-X., Chen, X.-K., Huang, W.-B., Qin, S., Yang, Z.-F. and Zhou, R., 2013.

Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. BMC Infectious Diseases, 13(1).

- 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 |  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

