راهنمای کیت
Flu-RSV RQ

جهت تشخیص ویروس های Influenza A, Influenza B, RSV
به روش Real-Time RT-PCR

جهت کار با Rotor-Gene
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-39-100
ویرایش ۱/۰
پاییز ۱۳۹۹

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱. مقدمه ۲

۲. محتویات کیت ۳

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت ۳

۴. سایر موارد مورد نیاز ۳

۵. نکات قابل توجه ۴

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن ۵

۷. کنترل داخلی ۵

۸. استخراج RNA ۵

۹. دستورکار RT-PCR ۶

۱۰. تنظیم دستگاه Rotor-Gene ۶

۱۱. تنظیم سایر دستگاه ها ۷

۱۲. تحلیل نتایج Rotor-Gene ۸

۱۳. میزان حساسیت ۱۱

کیت **Flu-RSV RQ** جهت کار با دستگاه Rotor-Gene و به منظور تشخیص RNA ویروس آنفولانزا نوع A و B و همچنین RSV (Respiratory Syncytial Virus) RSV طراحی شده است. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی می باشد.

۱. مقدمه

ویروسهای انفلونزا A و انفلونزا B هر دو از خانواده اورتومیکسو ویروسها (Orthomyxoviridae) بوده و حاوی ژنوم تک رشته ای RNA و پوشش لیپیدی می باشند. هر دو ویروس منجر به همه گیری فصلی انفلونزا می شوند، گرچه ویروس انفلونزا A نقش بیشتری دارد و می تواند باعث همه گیری جهانی یا پاندمی نیز بشود. ویروس RSV یا Respiratory Syncytial Virus عمدتا باعث عفونت قسمت های پایین تر دستگاه تنفسی میشود و علایمی مشابه سرماخوردگی خفیف ایجاد می کند. با این وجود این ویروس می تواند عامل عفونتهای شدید نیز باشد.

کیت حاضر امکان بررسی نمونه جهت تشخیص Influenza A, B و RSV را به روش Multiplex Real-Time RT-PCR فراهم می کند. همچنین ژن RNase P نیز به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است. در این روش با استفاده از پروب های نشاندار شده به رنگ های فلورسنت می توان محصول PCR را حین انجام آزمایش بررسی نمود. با توجه به این که در این روش نیازی به بررسی محصول PCR وجود ندارد، احتمال ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت. این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene طراحی شده است. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می باشد که از گزارش منفی کاذب حاصل از ناکارآمدی استخراج RNA یا مهار RT-PCR پیشگیری می کند.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک لوح فشرده و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
Flu-RSV Mix	میکس *RT-PCR	۳۶۰ میکرولیتر
Pos Ctrl	شاهد مثبت	۱۰۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

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

۳. شرایط نگهداری و پایداری 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 این مواد به ویژه میکس RT-PCR بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

۴. سایر موارد مورد نیاز

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

- دستگاه Real-TimePCR 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!

۵. نکات قابل توجه

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج ، فضای آماده سازی مواد (برای انتقال میکس به میکروتیوب های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه RNA به میکروتیوب PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود داشته باشند به ویژه سمپلر. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.
- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- پیش از باز کردن درپوش تیوب های کیت، آن ها را روی یخ خرد شده نگهداری کنید تا کاملاً ذوب شود. سپس با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر تیوب اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین اسپین کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخهای قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارآیی آنها می‌شود.

۶. 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 می‌باشد.

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 می‌ماند.

۷. 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 می باشد. کنترل داخلی باید به تولید فلورسانس با تابش نارنجی یا ROX با CT حدود ۲۰ تا ۳۵ منجر شود. برای توضیحات بیشتر به بخش تحلیل نتایج رجوع کنید.

۸. 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)

۹. دستورکار RT-PCR

ابتدا تمامی تیوب های کیت را روی یخ خرد شده قرار دهید تا به طور کامل محتویات آن ها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آن ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید. به تعداد مورد نیاز میکروتیوب PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، یک میکروتیوب برای شاهد مثبت و یک میکروتیوب برای کنترل منفی (آب) نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله ۱۵ میکرولیتر از Flu-RSV Mix اضافه کنید. سپس ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده، کنترل مثبت یا آب به هر لوله اضافه کنید.

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

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

۱۰. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

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

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

در لوح فشرده همراه کیت روی فایل Flu-RSV 0.1 و یا Flu-RSV 0.2 (با توجه به نوع میکروتیوب های استفاده شده) دوبار کلیک کنید تا برنامه باز شود.

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. همچنین میتوانید دستگاه را مطابق جدول زیر آماده 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 10 sec	
	72°C x 15 sec	

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

۱۱. 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 30 sec	
	72°C x 15 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.

۱۲. 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 تکرار کنید و برای کانال Orange آستانه را روی ۰/۰۵ 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 **Influenza A** و **تابش زرد (Yellow)** مربوط به **Influenza B**، افزایش **تابش قرمز (Red)** مربوط به **RSV** و افزایش **تابش نارنجی (Orange)** حاصل از **کنترل داخلی** یا **RNase P** 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 سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می باشد.

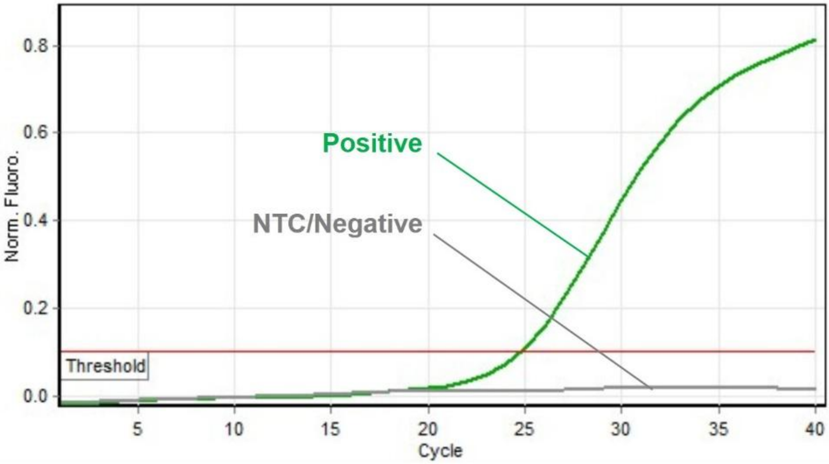
نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** مثبت با CT کمتر از ۳۵ و در کانال **نارنجی** مثبت با CT بین ۲۰ تا ۳۵ باشد، از نظر Influenza A **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **زرد** مثبت با CT کمتر از ۳۵ و در کانال **نارنجی** مثبت با CT بین ۲۰ تا ۳۵ باشد، از نظر Influenza B **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **قرمز** مثبت با CT کمتر از ۳۵ و در کانال **نارنجی** مثبت با CT بین ۲۰ تا ۳۵ باشد، از نظر RSV **مثبت** است.

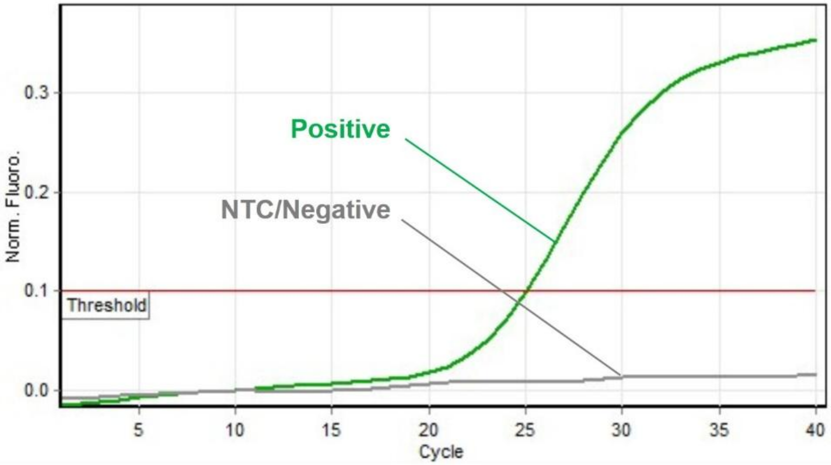
- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** و **زرد** و **قرمز** منفی و در کانال **نارنجی** مثبت با CT بین ۲۰ تا ۳۵ باشد، نمونه از نظر Influenza A, B و RSV منفی است.
- در صورتی که نمونه در هر چهار کانال **سبز** ، **زرد**، **قرمز** و **نارنجی** منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

خلاصه تفسیر نتایج آزمایش در جدول زیر آمده است.

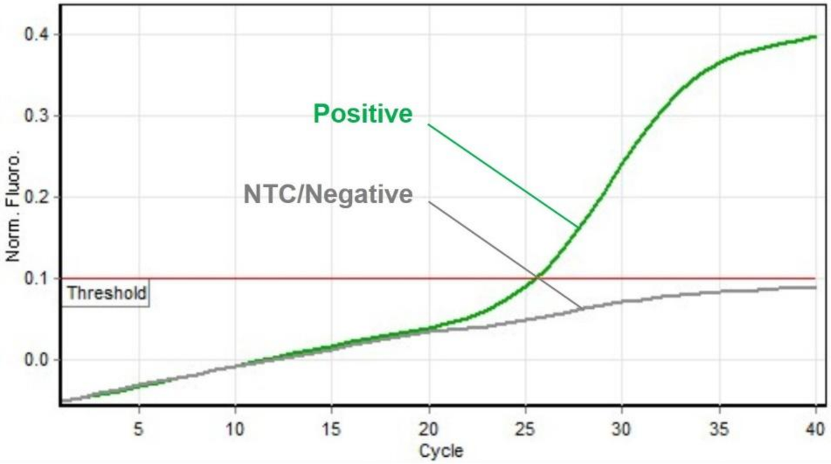
Green	Yellow	Red	Orange	Result
+	-	-	+	Positive for Flu A
-	+	-	+	Positive for Flu B
-	-	+	+	Positive for RSV
-	-	-	+	Negative
-	-	-	-	Inconclusive



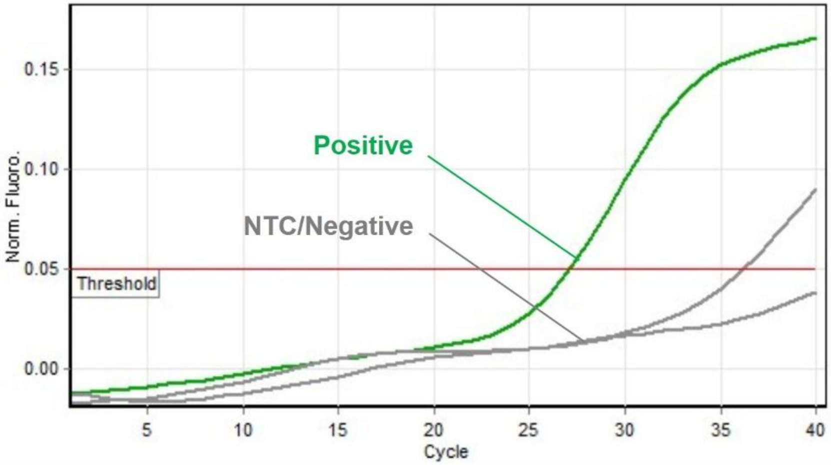
شکل ۱. منحنی شاهدها در کانال سبز دستگاه روتورژن



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

۱۳. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم آنفولانزا A, B و RSV بررسی شده است و برای انفولانزا A معادل ۵۰ کپی در میکرولیتر، برای انفولانزا B معادل ۲۵۰ کپی در میکرولیتر و برای RSV معادل ۱۵۰ کپی در میکرولیتر می باشد. 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.

Flu-RSV RQ
Kit Manual

For Real-Time RT-PCR Detection of Influenza A, Influenza B and RSV

For use with Rotor-Gene
Research use only

NG-WI-ASL-39-100
Version 1.0
Autumn 2020

Novin
Gene

Table of Contents:

1. Introduction 2
2. Kit Contents 2
3. Storage and Stability 3
4. General Precautions 3
5. Additionally Required Materials 4
6. Specimen, storage and transport 4
7. Internal Control (IC) 4
8. RNA isolation 4
9. RT-PCR Protocol 5
10. Programming of the Rotor-Gene 5
11. Programming other machines 6
12. Data Analysis: Rotor-Gene 6
13. Sensitivity 10

Flu-RSV RQ kit is intended for detection of RNA of Influenza A and B viruses as well as RSV. It is designed for use with Rotor-Gene. This kit is for research use only.

1. Introduction

Human influenza A and B are enveloped RNA viruses of the Orthomyxoviridae family. While both of these viruses cause seasonal flu epidemics, Influenza A virus is responsible for 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 casue also severe respiratory infections in some.

Flu-RSV RQ kit provides a ready-to-use One-Step Multiplex Real-Time RT-PCR system for detection of Influenza A virus, Influenza B virus and RSV with Rotor-Gene. In this method application of fluorescent probes allows detection of multiple targets within the same PCR reaction. Analysis of fluorescent kinetics also leads to detection of target sequences in the reaction without requiring post-amplification analysis therefore, reducing the possibility of contamination with the PCR product.

2. Kit Contents

The kit contains a manual a CD with templates and following reagents:

Label	Content	Quantity
Flu-RSV Mix	RT-PCR Master mix	360 µl*
Pos Ctrl	Positive Control	100 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

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

3. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws especially for Flu-RSV Mix more than few times to prevent reduced sensitivity.

4. 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 0.2ml PCR tubes on crushed ice. Use cold block instead.

5. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Vortex Mixer
- Adjustable pipetters 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!

6. Specimen, Storage and Transport

We recommend upper respiratory tract samples mainly nasopharyngeal swabs. Samples can be stored at 2-8°C for few hours or at -20°C or lower for up to few days.

7. Internal Control (IC)

In order to evaluate the possibility of RNA extraction failure and PCR inhibition and prevent false negative results, Flu-RSV Mix contains primers and probe of a housekeeping gene (RNase P) as an internal control. In a successful RNA extraction and RT-PCR test, IC should generate a CT of 20-35 in Orange/Rox Channel.

8. 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).

9. 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 the negative control/water.

Aliquot 15µl of Flu-RSV Mix directly to each PCR tube. Then add 5ul of extracted RNA, Positive Control or water.

Lower reaction volumes may also be used. Including:

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

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

10. Programming of the Rotor-Gene

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

Open the CD provided in the kit and double click on "Flu-RSV 0.2" or on "Flu-RSV 0.1" depending on the tubes used.

Program starts. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save program on desired location. You may also set the machine according to the following table.

Step	Temperature and time	Cycles
1	**50°C x 10 min**	1
2	**95°C x 3 min**	1
3	**95°C x 15 sec**	40

	60°C x 10 sec	
	72°C x 15 sec	

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

11. Programming Other Machines

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

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 30 sec	
	72°C x 15 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM, VIC, ROX and Cy5 dyes.

12. Data Analysis: Rotor-Gene

To analyze data briefly, click on 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 put threshold at 0.05 for Orange Channels.

Figures 1, 2, 3 and 4 represent typical graphs for Rotor-Gene.

To interpret the results, please note that:

- Signal in **Green** channel is due to **Influenza A,** Yellow channel due to Influenza B, **Red** channel due to **RSV** and **Orange** channel due to **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 sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

Consider following points when analyzing:

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

Interpretation of results is summarized in table 1.

Green	Yellow	Red	Orange	Result
+	-	-	+	Positive for Flu A
-	+	-	+	Positive for Flu B
-	-	+	+	Positive for RSV
-	-	-	+	Negative
-	-	-	-	Inconclusive

Table 1. Interpretation of results

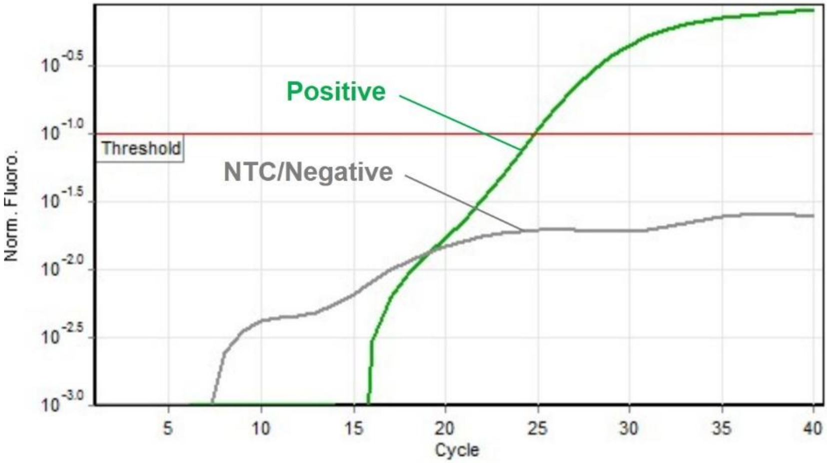


Fig 1. Typical Controls graph in Green channel for Rotor-Gene

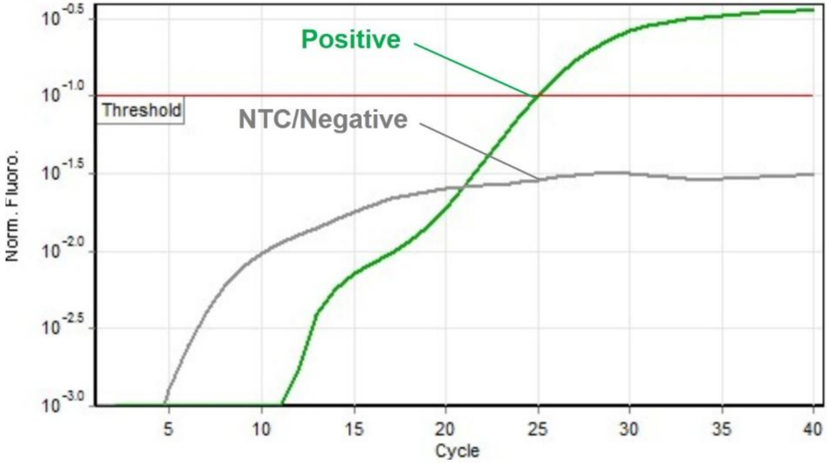


Fig 2. Typical Controls graph in Yellow channel for Rotor-Gene

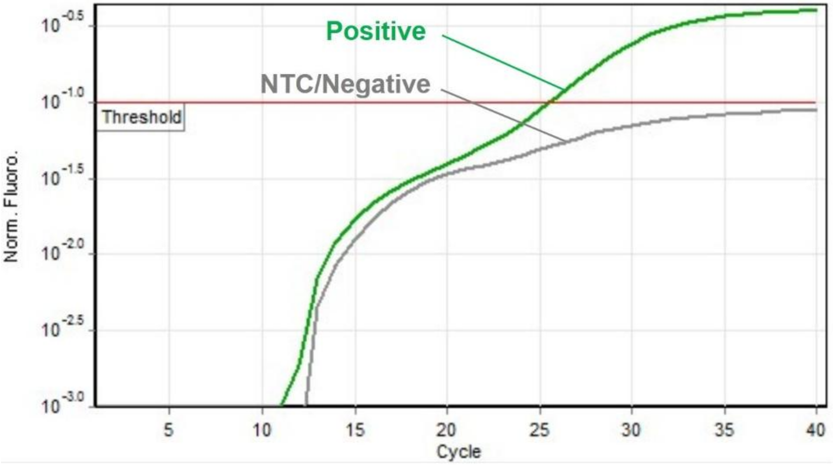


Fig 3. Typical Controls graph in Red channel for Rotor-Gene

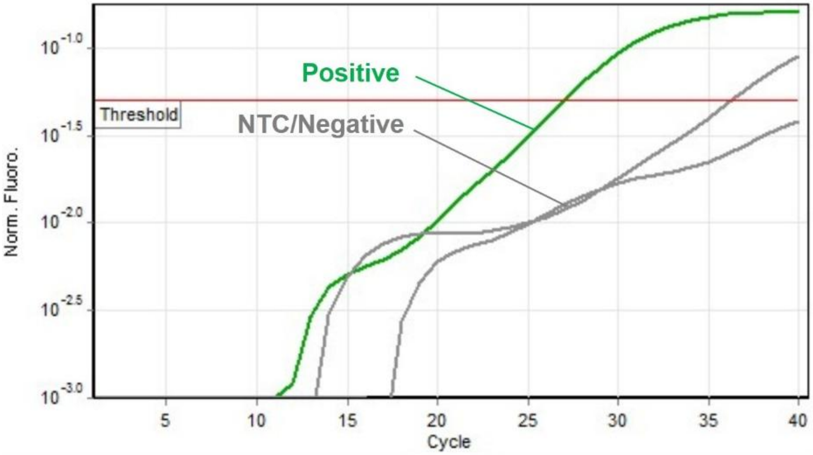


Fig 4. Typical Controls graph in Orange channel for Rotor-Gene

13. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with cloned target of Influenza A, B and RSV genome and showed a limit of detection equal to 50 copy/µl for Influenza A, 250 copy/µl for Influenza B and 150 copy/µl for RSV.