کیت rRT-PCR یک مرحله‌ای چند منظوره غربالگری SARS-CoV-2، آنفلوانزا نوع A و B

Ref: APSCFAB (In Vitro Diagnostic, IVD)

مقدمه:

شرکت پژوهش و توسعه امیر پیوند (AP-RAD) با هدف شناسایی سریع، حساس و اختصاصی عفونت اولیه SARS-CoV-2 (CoVID-19)، آنفلوانزا نوع A و B و تمایز آنها در نمونه های تنفسی فوقانی بیمارانی که دارای علائم و نشانه های بیماری تنفسی هستند، اقدام به طراحی و ساخت کیت آزمایش غربالگری چند منظوره یک مرحله ای rRT-PCR نموده است. عامل بیماری COVID-19 متعلق به خانواده Coronaviridae می باشد. این ویروس یک beta-coronavirus است که در دسامبر سال ۲۰۱۹ در منطقه هوبای کشور چین کشف شد و در ماه های ابتدایی سال ۲۰۲۰ منجر به همه گیر شدن عفونت دستگاه تنفسی گردید. کروناویروس‌ها، بزرگترین خانواده ویروسی RNA دار تک رشته اند که positive-sense بوده و دارای پوشش یا envelope می باشند. ویریون آن ها اکثراً کروی است و زوائد گلیکوپروتئینی (S) در پوشش ویروس قرار دارد. سایر پروتئین های ساختمانی این ویروس عبارتند از: Envelope (E), Matrix (M) و Nucleocapsid (N). شواهد بالینی حاکی از آن است که در بیشتر افراد، عفونت SARS-CoV-2 با علائم خفیف و شبیه به علائم بیماری آنفلوانزا بروز می‌کند. افرادی که به COVID-19 مبتلا شده اند طیف گسترده ای از علائم را گزارش داده اند: علائم خفیف تا متوسط (علائم خفیف تا پنومونی خفیف) در ۸۱٪ موارد، بیماری شدید (تنگی نفس ، هیپوکسی) بیش از ۵۰٪ ، درگیری ریه در تصویربرداری ها در ۱۴٪ موارد و در ۵٪ موارد بحرانی (نارسایی تنفسی، شوک یا اختلال در عملکرد چندین عضو) گزارش شده است. ویروس آنفلوانزا انسانی، متعلق به خانواده اورتومیکسوویریده است و انواع A و B آن منجر به اپیدمی می شوند. با این حال، آنفلوانزا نوع B منجر به پاندمی نمی‌شود. ژنوم ویروس های آنفلوانزا به صورت RNA تک رشته ای negative-sense است، دارای پوشش پلئومورفیک (چند شکلی) بوده و قطر آن ۵۰ تا ۱۲۰ نانومتر است. آنفلوانزا عامل یک بیماری حاد تنفسی است که به شدت مسری است و هر ساله به میزان قابل توجهی منجر به مرگ و میر در افراد می شود. ویروس آنفلوانزا نوع A و B، ابتدا در نازوفارنکس و حفرات اوروفارنکس عفونت ایجاد می کند. اغلب، توانایی بیماری زایی آنفلوانزا دست کم گرفته می شود که این امر منجر به بالا رفتن میزان مرگ و میر ناشی از این بیماری به ویژه در افراد مسن و بیماران پرخطر نظیر نوجوانان و افرادی که سیستم ایمنی تضعیف شده دارند می‌گردد. دوره کمون عفونت های تیپیک آنفلوانزا در انسان ۱ تا ۲ روز است و علائم آن نظیر بروز ناگهانی تب، گلو درد، سرفه، سر درد، دردهای عضلانی و احساس بی قراری است که حداقل تا یک هفته به طول می انجامد. هنگامی که فردی به نوع شدید آنفلوانزا مبتلا می شود علائم ذکر شده می تواند به سرعت به سمت پنومونی پیشرفت کرده و حتی دربرخی موارد منجر به مرگ شود. بروز پاندمیک نوع شدید آنفلوانزا، خطر جدی برای سلامت انسان و حیوانات محسوب می‌گردد. کیت rRT-PCR یک مرحله ای چند منظوره غربالگری SARS-CoV-2، آنفلوانزای نوع A و B تولید شده در شرکت پژوهش و توسعه امیر پیوند برای تشخیص مولکولی ویروس های یاد شده در آزمایشگاه تشخیص پزشکی(In Vitro Diagnostic) طراحی و تولید شده است. کارکنان آزمایشگاه های بالینی واجد شرایط که به ویژه در زمینه تکنیک های real-time PCR و روش های تشخیصی در محیط های آزمایشگاهی تعلیم دیده و تربیت شده اند مسئول انجام آزمایش هستند.

اصول انجام آزمایش:

روش اصلی تشخیص بیماری COVID-19 و آنفلوانزای نوع A و B آزمایشی براساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس به روش ملکولی(rRT-PCR) است. ابتدا RNA از نمونه ها استخراج می شود، سپس از روی آن رشته های مکمل DNA یا همان (cDNA) ساخته می شود و به دنبال آن، بخش های خاصی از cDNA تکثیر می شوند. آزمایش rRT-PCR چند منظوره از پروب های فلوروژنیک بر پایه TaqMan استفاده می کند که با استفاده از خاصیت فعالیت نوکلئازی ۵ پریم Taq DNA polymerase هنگامی که در چرخه های PCR تجمع پیدا می کنند قادر به شناسایی محصولات اختصاصی PCR است. نمونه های تنفسی انسانی مشکوک، به صورت همزمان در یک میکروتیوب همراه با کنترل داخلی با استفاده از پرایمر و پروب های اختصاصی برای عامل ایجاد بیماری های CoVID-19، آنفلوانزا نوع A و B مورد آزمایش قرار خواهند گرفت. به ترتیب ژن N (ژن پروتئین نوکلئوکپسید) برای SARS-CoV-2، ژن M (ماتریکس) برای آنفلوانزا نوع A و ژن NS1 (پروتئین غیر ساختاری) برای آنفلوانزا B به صورت موازی با RNase P (ریبونوکلئازP) به عنوان کنترل داخلی برای بررسی استخراج و ارزیابی آزمایش، مورد سنجش قرار خواهند گرفت.باشد.

محتویات کیت:

محتویات این کیت برای ۵۰ تست با حجم ۲۰ µl می باشد

ردیف	محتویات	حجم	شرایط نگهداری
۱	ویال حاوی مسترمیکس و پرایمر و پروب آماده مصرف	۵۰۰ µl	≥ -۲۰ °C
۲	کنترل منفی	۵۰ µl	≥ -۲۰ °C
۳	کنترل مثبت	۵۰ µl	≥ -۲۰ °C

021-26422362
Co.ap-rad.com
order@co.ap-rad.com
شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند
ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

مواد و وسایل مورد نیاز:

- دستگاه ارزیابی و کالیبر شده Real time PCR به عنوان مثال: Rotor-Gene Q 5plex Platform, Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform, Rotor-Gene Q 6plex Platform of Qiagen) با کانال کانال سبز (FAM)، قرمز (CY5) و زرد (HEX یا VIC یا JOE).
- هود ایمنی زیستی کلاس II
- سمپلر در حجم های (100-1000 µl , 10-100 µl , 0.5-10µl)
- تجهیزات کوچک نظیر (ورتکس، Minispin، میز کار PCR یا هودهای ایمنی زیستی)
- کیت استخراج RNA ویروسی
- ظروف پلاستیکی: میکروتیوپ با حجم ۰/۱ یا ۰/۲ میلی لیتر یا پلیت های مخصوص دستگاه ریل تایم
- مواد مصرفی: دستکش یکبار مصرف فاقد پودر، روپوش های آزمایشگاهی، سرسمپلرهای دارای فیلتر آئروسل در حجم های 10 µl, 100 µl, 1000 µl، خودکار علامت گذاری آزمایشگاهی و رول دستمال کاغذی
- فریزر (۲۰- سانتی گراد)

شرایط نگهداری کیت:

- دمای استاندارد برای نگهداری محتویات این کیت (۲۰ °C-) می باشد. حفظ دما در مدت زمان نگهداری محصول الزامی است.
- مدت زمان مناسب برای استفاده از این کیت ۱۲ماه بوده که تاریخ انقضا نیز بر روی کیت درج شده است.

توجه:

- نگهداری کیت به مدت طولانی در دمای اتاق منجر به بروز نتایج نادرست می گردد، نگهداری کیت در تاریکی الزامی است.
- پایداری کیت در مقابل عمل Freeze thaw تا دو مرتبه کنترل شده و توصیه می شود تنها دو مرتبه این عمل بر روی کیت اعمال شود.

ایمنی زیستی:

- توصیه می شود آزمایشگاه‌ها خطرات موجود در برخورد با افراد مشکوک به COVID-19 و آنفلوانزا را شناسایی و روش های مقابله را رعایت نمایند. در صورت مواجهه با بیماران مبتلا به COVID-19 و آنفلوانزا می بایست اقدامات ایمنی لازم نظیر استفاده از وسایل حفاظت شخصی رعایت گردد. تمامی نمونه ها را آلوده و عفونی تلقی کنید.

موارد احتیاطی و پیشگیری:

۱) پیش از شروع آزمایش، دستورالعمل را به دقت مطالعه نمایید.

۲) قبل از انجام آزمایش از ضدعفونی بودن محل انجام تست اطمینان حاصل کنید.

۳) توصیه می شود کیت در دمای کم تر از ۲۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شود.

۴) از استفاده کیت های دارای نقص اجتناب نمایید.

۵) محلول های استفاده نشده را مطابق با قوانین و مقررات کشوری دور بریزید.

۶) کیفیت RNA نمونه بسیار حائز اهمیت است و ممکن است بروی نتایج اثر بگذارد، به منظور به حداقل رساندن خطر دناتوراسیون RNA ویروس توسط ریبونوکلئازها، به شدت توصیه میشود RNA ویروس فورا بعد از جمع آوری نمونه ها استخراج شود. هنگام کار با RNA ، همیشه از دستکش استفاده کنید تا از آلودگی ریبونوکلئاز روی پوست دست اجتناب شود.

۷) با توجه به حساسیت بالای تکنیکRT-PCR لازم است جهت جلوگیری از بروز نتایج مثبت کاذب از عدم آلودگی محیط کار و ابزار ها با cDNA،RNA یا محصولات PCR سایر نمونه‌ها، اطمینان حاصل نمایید. پرسنل آزمایشگاه باید ملزومات پوشش حرفه ای را که شامل دستکش‌های یکبار مصرف، عینک و گان یا روپوش‌آزمایشگاه تمیز است را رعایت کنند. مراحل انجام کار باید به گونه‌ای سازماندهی شوند که حرکت فقط در یک جهت صورت گیرد. و هیچ‌گاه محصولات واکنش در خلاف جهت این مسیر انتقال پیدا نکنند.

۸) میزهای آزمایشگاهی، سمپلرها و روپوش های آزمایشگاهی باید بطور منظم تمیز شوند.

۹) توصیه می شود در تمام مراحل انجام آزمایش از سرسمپلرهای دارای فیلتر آئروسل استفاده شود. تعویض دستکش‌ها هنگام دست زدن به میکروتیوب‌های حاوی RNA یا DNA، امری ضروری است. پس از انجام PCR، باید میکروتیوب‌ها با احتیاط امحا شوند تا از ریختن محصولاتی که تکثیر یافته اند جلوگیری شود.

۱۰) آزمایشگاه های داخل ایران می بایست تمامی جواب های مثبت خود را به مراجع تعیین شده توسط وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی نظیر انستیتوپاستور و ادارات امور آزمایشگاه های دانشگاه های علوم پزشکی گزارش دهند.

۱۱) کیت را هنگام نگهداری و حین حمل و نقل به حالت ایستاده قرار دهید.

۱۲) پیش از استفاده از کیت، ویال ها را از لحاظ بروز نشتی یا آسیب بررسی کنید.

۱۳) هر یک از محتویات کیت باید در دمای اتاق ذوب شوند، کاملاً مخلوط شده و پیش از استفاده به مدت کوتاهی با دور پایین سانتریفیوژ یا اسپین نمائید.

021-26422362
Co.ap-rad.com
order@co.ap-rad.com
شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند
ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

۱۴) سرسمپلر ها می بایست پس از استفاده در یک Safety box حاوی محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ ریخته شوند. پس از انجام آزمایش، سطوح محل کار و ابزار باید با محلول سدیم هیپوکلریت ۱۰٪ تازه تهیه شده ضدعفونی شوند سپس با اتانول ۷۵٪ یا آب خالص تمیز شوند و در نهایت لامپ UV به مدت ۳۰ دقیقه به منظور ضدعفونی سطوح کار، روشن شود.

۱۵) وسایلی که برای انجام آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفته اند باید بر اساس دستورالعمل ذکر شده در دفترچه راهنمای دستگاه دستگاه به صورت منظم کالیبره شوند تا امکان بروز cross-talks میان کانال ها از بین برود.

جمع آوری نمونه، حمل و نقل و نگهداری آن ها:

تمامی آزمایش های SARS-CoV-2 و آنفلوانزا نوع A و B باید تحت نظر و مشورت با پزشک معالج انجام شود

نمونه های دستگاه تنفسی فوقانی:

الف. سواب حلق و بینی در یک لوله جمع آوری نمونه که حاوی محیط انتقال ویروسی است (VTM AP-RAD Ref :APVTMA1)

ب. یک سواب ابتدا برای حلق و سپس برای بینی

پ. سواب های حلق و بینی جداگانه در لوله های VTM مجزا

ت. آسپیره نازوفارنژیال یا آسپیره بینی (NA)

ث. سواب تیغه میانی بینی (NMT)، که سواب عمقی بینی نیز نامیده می شود. (عمق حدود ۲ سانتی متر)

ج. نمونه حفره قدامی (NS)، سواب در فاصله حداقل ۱ سانتی متر

نکات مهم:

- تنها از سواب های الیاف مصنوعی با دسته پلاستیکی استفاده کنید. از سواب های آلژینات کلسیم یا سواب هایی که دسته چوبی دارند استفاده نکنید زیرا ممکن است حاوی موادی باشند که برخی از ویروس ها را غیر فعال کرده و منجر به مهار آزمایش PCR شوند. سواب ها را بلافاصله در لوله های استریل حاوی محیط انتقال ویروس قرار دهید.
- نمونه ها می بایست در محیط انتقال ویروسی استریل حمل شوند. (۲ میلی لیتر) (VTM AP-RAD Ref :APVTMA1)
- سواب خشک شده ارسال نشود.
- اگر سواب هم از مجاری بینی و هم از حلق جمع آوری شده است، هر دو سواب را می‌توان در یک لوله حاوی VTM حمل کرد.

نکته: با توجه به عدم دسترسی به نمونه های تنفسی تحتانی، چرا که از نظر ایمنی حتی در مراکز بیمارستانی این امر به ندرت اتفاق می افتد، این کیت تنها با نمونه های تنفسی فوقانی ارزیابی شده است. اما با توجه به آنالیزهای نرم افزاری انجام شده و آزمایش های حساسیت، نباید با نمونه های تنفسی تحتانی نیز مشکلی داشته باشد.

نگهداری و دمای مناسب برای انتقال نمونه:

- نمونه جمع آوری شده را در لوله های VTM در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت پس از جمع آوری نمونه، نگهداری کنید. (لوله های VTMتولید شده در شرکت پژوهش و توسعه امیر پیوند، حفظ سلامت نمونه را تا ۱ هفته تضمین می‌کند). اگر پیش بینی می کنید که ممکن است تاخیری در مراحل انجام آزمایش یا حمل نمونه رخ دهد باید نمونه ها در دمای ۷۰- یا پایین‌تر نگهداری کنید.
- نمونه را برای انجام آزمایش در اسرع وقت به آزمایشگاه انتقال دهید. به این منظور نمونه ها را بر روی پک های یخ قرار دهید . چنانچه نمونه ها طی ۲۴ ساعت به آزمایشگاه ارسال نشود باید به سرعت در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد منجمد شوند و برای ارسال باید بر روی مقدار زیادی یخ خشک حمل شوند.
- نمونه ها می‌بایست مطابق با دستورالعمل فعلی تنظیم مقررات انجمن بین‌المللی حمل و نقل هوایی (IATA) تحت عنوان کالای خطرناک بسته‌بندی و منتقل شوند. به منظور کسب اطلاعات بیشتر می توانید به آدرس های اینترنتی ذیل مراجعه نمایید:

- Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)
https://www.cdc.gov/coronavirus/SARS-CoV-2/guidelines-clinical-specimens.html

- Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)
https://www.cdc.gov/coronavirus/SARS-CoV-2/lab-biosafety-guidelines.html

شرایط رد نمونه:

- سواب ها در محیط مورد تائید قرار ندارد. (سواب خشک).
- نوع نمونه مورد تائید نیست (سواب زبان یا سواب بزاق)
- نمونه ها فاقد اطلاعات شناسایی بیمار است.
- حجم نمونه ناکافی است.
- نمونه ها در دمای اتاق دریافت شده اند.

021-26422362
Co.ap-rad.com
order@co.ap-rad.com
شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند
ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

- نمونه های فریز نشده پس از گذشت بیش از ۷۲ ساعت از زمان جمع آوری نمونه به آزمایشگاه، رسیده اند

روش آزمایش:

ریبونکلئیک اسیدها با استفاده از کیت معتبر استخراج RNA ویروسی از نمونه های جمع آوری شده استخراج می شوند. RNA تخلیص شده مستقیما با استفاده از معرف های آماده مصرف rRT-PCR تک مرحله ای چند منظوره AP-RAD تکثیر می شوند. در این فرآیند، پروب به سکانس هدف ویژه ای که میان پرایمرهای فوروارد و ریورس واقع شده اند، متصل می گردد. در طی فاز گسترش چرخه PCR، فعالیت ۵ نوکلئازی Taq polymerase، پروب را تخریب کرده و منجر به جدا شدن رنگ ریپورتر از رنگ quencher شده و سیگنال فلورسنت ایجاد می‌کند. در هر چرخه، مولکولهای اضافی رنگ ریپورتر از پروب مربوطه جدا می شوند و شدت فلورسانس را افزایش می دهند. شدت فلورسانس در هر چرخه PCR توسط دستگاه Real-Time PCR ثبت می‌شود.

استخراج و تخلیص نوکلئیک اسید:

با استفاده از کیت های معتبر استخراج RNA (Qiagem DSP Viral RNA، RNJia Virus Kit و High Pure Viral Nucleic Acid Roche) می توان RNA ویروسی را مستقیماً از سواب های جمع آوری نمونه که در محیط انتقال ویروس (VTM) قرار گرفته اند یا نمونه های Lavon Broncho-Alveolar Lavage (BAL) یا سایر نمونه های مایع، استخراج کرد. کیت rRT-PCR تک مرحله‌ای چند منظوره SARS-CoV-2، با کیت های استخراج RNA نامبرده سازگار می‌باشد

روش RT-PCR کیفی یک مرحله ای برپایه TaqMan:

RT-PCR یک مرحله‌ای مطابق مراحل ذیل انجام می شود.

۱. در کلیه آزمایشات برای هر بیمار دو میکروتیوب همراه با میکروتیوب‌های کنترل مثبت و منفی و NTC نام گذاری نمائید.

توجه: برای دستیابی به نتایج دقیق قابل اطمینان، بر انجام PCR به صورت دوتایی (دوپلیکیت) برای هر بیمار تأکید می شود.

۲. تمام میکروتیوب‌ها را بر روی رک سرد قرار دهید.

۳. ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس آماده را به تمامی میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.

۴. ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به میکروتیوب NTC اضافه کنید.

۵. ۱۰ میکرولیتر کنترل منفی به میکروتیوب که برای آن نام گذاری شده است اضافه کنید.

۶. ۱۰ میکرولیتر از RNA بیماران را به هر دو میکروتیوب نام گذاری شده بیمار اضافه کنید.

۷. ۱۰ میکرولیتر کنترل مثبت به میکروتیوب که برای آن نام گذاری شده است اضافه کنید.

۸. محتویات میکروتیوب ها را خوب مخلوط کرده ویا Spin کوتاه انجام دهید.

توجه : خلاصه ای از مراحل تهیه مسترمیکس برای یک واکنش

مسترمیکس آماده مصرف	نمونه
10 µl	10 µl

سپس آن را در دستگاه Real Time-PCR قرار داده و برنامه را همانگونه که در برنامه واکنش حرارتی ذکر شده است اجرا کنید.

مشخصات واکنش حرارتی معمول:

	دما	زمان	چرخه
RTرونویسی معکوس	۵۰°C	۳۰ دقیقه	۱
فعال سازی اولیه	۹۵°C	۱ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۵°C	۱۵ ثانیه	۴۵
انیلینگ/گسترش	۵۵°C	۳۵* ثانیه	

***توجه** :کانال سبز (FAM) اختصاصی ژن M (آنفلوانزا نوع A) و نارنجی(ROX) اختصاصی ژن NS1 (آنفلوانزا نوع B) و زرد (JOE, HEX, VIC) اختصاصی ژن N (SARS-COV-2) و قرمز (CY5) اختصاصی کنترل داخلی (RNase P) است.

مشخصات واکنش حرارتی نیمه سریع (Semi-fast):

برنامه ی واکنش حرارتی Semi-fast فقط برای دستگاه های ریل تایم کمپانی کیاژن (QIAGEN) و Corbet قابل اجرا می باشد.

	دما	زمان	چرخه
رونویسی معکوس (RT)	۵۰ °C	۱۰ دقیقه	۱
فعال سازی اولیه	۹۵ °C	۱ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۵ °C	۲ ثانیه	۴۵
انیلینگ/گسترش	۵۵ °C	۳ ثانیه	
گسترش نهایی	۷۲ °C	۷۰ تانیه	۱

- روش نیمه سریع جهت تسریع در انجام واکنش قابل استفاده می باشد. مدت زمان کل تست از ۱۲۰ دقیقه به ۷۳ دقیقه کاهش می یابد.
- با استفاده از این روش بار کار بر دستگاه کاهش می یابد.
- پاسخ دریافتی از این روش مشابه با پاسخ دریافتی از روش معمول است.

آنالیز داده ها و گزارش آن ها:

کانال سبز (FAM) اختصاصی ژن M (آنفلوانزا نوع A) و نارنجی(ROX) اختصاصی ژن NS1 (آنفلوانزا نوع B) و زرد (JOE, HEX, VIC) اختصاصی ژن N (SARS-COV-2) و قرمز (CY5) اختصاصی کنترل داخلی (RNase P) است .. نتایج با استفاده از نرم افزار دستگاه Real Time PCR، به واسطه عبور منحنی فلورسانس از خط آستانه یا Threshold و بر اساس دستورالعمل های دستگاه تفسیر می شوند.

تفسیر:

آنالیز نتایج با استفاده از میزان Ct اندازه گیری شده برای هر هدف تائید می شود. در صورتی که میزان Ct برای هر هدف طی ۴۵ سیکل کمتر یا مساوی ۴۰ (≤40) باشد مثبت خوانده می شود و هنگامی که میزان Ct بیشتر از ۴۰ باشد (Ct value >40) منفی خوانده می شود.

- کیت rRT-PCR یک مرحله‌ای چند منظوره غربالگری SARS-CoV-2، آنفلوانزا نوع A و B دارای کنترل های مثبت، منفی و داخلی است.

میزان Ct می بایست برای کنترل مثبت ≤40 باشد و برای کنترل منفی کاملا" مسطح یا Flat باشد. میزان Ct برای کنترل داخلی (RNase P) می بایست ≤40 باشد. تمامی کنترل های آزمایش باید پیش از تفسیر نتایج بیمار، بررسی شوند (جدول شماره ۱).

اگر کنترل ها مورد تائید نیستند نباید نتایج آزمایش بیماران تفسیر گردد. در صورتیکه کنترل ها عملکرد مورد انتظار را آن گونه که شرح داده شد نشان نمی دهند، ممکن است نحوه انجام آن نادرست باشد یا خرابی در معرف یا نقص در تجهیزات رخ داده باشد. در این صورت، آزمایش را تایید نکرده و مجددا تکرارشود.

(جدول شماره ۱)

نام کنترل خارجی	برای نظارت بر	ژن N SARS-CoV-2	ژن M Influenza A	ژن NS1 Influenza B	ژن RNase P	میزان مورد انتظار
کنترل مثبت CoVID-19و Influenza A&B	عملکرد اجزای معرف نظیر پرایمر و پروب‌ها	+	+	+	+	Ct ≤40
کنترل منفی CoVID-19 و Influenza A&B	آلودگی معرف و یا محیط	-	-	-	+	به جز کنترل Ct > 40 داخلی
فاقد الگو(NTC)	آلودگی معرف و یا محیط	-	-		-	Ct > 40

تفسیر نتایج بیمار:

تفسیر نتایج بیمار با خواندن Ct هر یک از نمونه ها مشخص می شود و اگر میزان آن کمتر یا بیشتر از ۴۰ باشد تشخیص داده می شود. خلاصه ای از تفسیر نتایج در جدول شماره ۲ وجود دارد.

021-26422362
Co.ap-rad.com
order@co.ap-rad.com
شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند
ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

(جدول شماره ۲)

اقدامات	Report	Result Interpretation	ژن NS1 Influenza B	ژن M Influenza A	ژن SARS- N CoV-2	RNase P
گزارش جواب	مثبت یا وجود دارد	SARS-CoV-2 detected	-	-	+	+
گزارش جواب	مثبت یا وجود دارد	Influenza A Detected	-	+	-	+
گزارش جواب	مثبت یا وجود دارد	Influenza B Detected	+	-	-	+
گزارش جواب	منفی یا وجود ندارد	SARS-CoV-2 Influenza A/B not detected	-	-	-	+
استخراج و آزمایش را تکرار کنید. اگر همچنان نامعتبر شد مجددا از بیمار نمونه بگیرید.	نامعتبر	نتیجه نامعتبر وغیر قابل گزارش		-	-	-

- در غیاب *RNase P* یا کنترل داخلی، افزایش فلورسنت در هر یک از میکروتیوب ها (به جز میکروتیوب NTC) اتفاق افتد نتایج نباید گزارش شوند.
- در صورت افزایش فلورسنت در میکروتیوب NTC، می بایست آزمایش تکرار شود و احتمال وجود آلودگی وجود دارد.
- در صورت افزایش فلورسنت در میکروتیوب نرمال(به جز کنترل داخلی)، می بایست آزمایش تکرار شود و احتمال بروز آلودگی وجود دارد.
- در صورتی که نتایج هر سه ژن منفی شد برای دیگر ژنهای عفونی پیشنهاد بدهید.

نکته مهم: از نتایج این کیت به تنهایی جهت تشخیص (تائید یا رد عفونت) نباید استفاده نمود و میبایست در تفسیر نتایج و اتخاذ تصمیمات به کلیه یافته های بالینی، داده‌های آزمایشگاهی و اپیدمیولوژی توجه کنید. ممکن است عفونت متقاطع رخ دهد، بنابراین باید تفسیر نتایج با توجه به تمامی داده های آزمایشگاهی و بالینی انجام شود.

محدودیت ها:

۱. تمام اطلاعات بالینی و آزمایشگاهی و اپیدمیولوژیک برای تفسیر باید در نظر گرفته شود، زیرا احتمال آلودگی وجود دارد.

۲. این کیت برای تشخیص کیفی وجود SARS-CoV-2 RNA و آنفلوانزا A و B در نمونه های تنفسی انسان استفاده می شود. نتایج نشان دهنده ی میزان بار یا Load ویروس در نمونه های اصلی نیستند.

۳. نمونه های مورد آزمایش باید مطابق با شرایط مشخص شده در دستورالعمل جمع آوری، پردازش، نگهداری و حمل باشند ممکن است آماده سازی نمونه و انجام آزمایش به شیوه غلط منجر به دریافت نتایج نادرست شود.

٤. توصیه می‌شود از منجمد و ذوب کردن کیت بیش از دو مرتبه پرهیز نمائید.

٥. پیشنهاد می‌گردد جهت جلوگیری از تکرار ذوب و منجمد کردن کیت، در اولین زمان ذوب کردن، محتویات کیت را به میزان مورد نظر در هر Run دستگاه در میکروتیوب های مخصوص تقسیم (Aliquot) کرده و مجددا منجمد نمائید.

٦. تقویت و شناسایی ویروس‌های ذکر شده با کیت چندمنظوره شرکت پژوهش و توسعه امیر پیوند با Qiagen 5plex and 6Plex دستگاه Real-Time PCR انجام شده است. اگر از دستگاه های دیگر استفاده می شود باید Validation انجام شود.

۷. محدوده تشخیص (LOD) با اطمینان ۹۵٪ تعیین می شود. هنگامی که ویروس ها در غلظت LOD در نمونه آزمایش وجود داشته باشند احتمال یافت نشدن آن ها کم است. هنگامی که ویروس ها در نمونه آزمایش در غلظت کم تر از LOD باشند نیز احتمال یافتن آن ها وجود دارد.

۸. پرایمرها و پروب های این کیت، مناطق بسیار محافظت شده در ژنوم SARS-CoV-2 و آنفلوانزا نوع A وB را مورد هدف قرار می دهند. بروز جهش در این مناطق بسیار حفاظت شده (اگرچه بسیار نادر است) می تواند منجر به غیر قابل تشخیص شدن RNA ویروس شود.

۹. نتایج منفی، نشان دهنده عدم ابتلاء به عفونت SARS-CoV-2 و آنفلوانزا نوع A وB نیست و نباید تنها مبنای درمان یا سایر تصمیمات مدیریتی قرار گیرد.

۱۰. آزمایشگاهها موظفند کلیه نتایج مثبت را به وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی و یا ارگان های زیربط گزارش دهند.

۱۱. کارکنانی که مسئول بررسی و آنالیز هستند، می بایست پیش از انجام آزمایش با روند انجام آزمایش و تفسیر نتایج آشنایی داشته و آموزش دیده باشند.

۱۲. چنانچه تعداد میکروارگانیسم های موجود در نمونه به علت جمع آوری، انتقال و رسیدگی نادرست به آن به مقدار کافی نباشد ممکن است جواب آزمایش منفی کاذب شود.

۱۳. چنانچه مقدار خیلی زیادی از الگوی RNA در واکنش وجود داشته باشد ممکن است جواب آزمایش، منفی کاذب شود.

ویژگی های عملکرد:

این کیت قادر به تشخیص همزمان ژن N به عنوان مارکر اختصاصی SARS-CoV-2 و به ترتیب ژن های M و NS1 برای آنفلوانزا نوع A و B و ژن RNase P به عنوان کنترل داخلی می باشد.

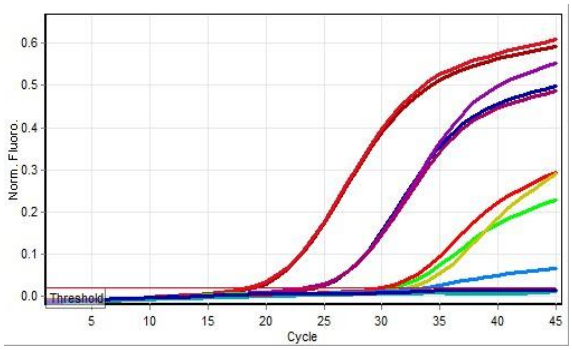
021-26422362
Co.ap-rad.com
order@co.ap-rad.com
شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند
ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

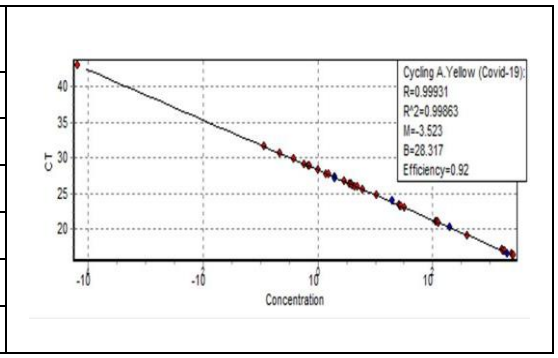
حساسیت آنالیتیکال (محدوده تشخیص (LOD):

آزمایش های حساسیت آنالیتیکال (محدوده تشخیص یا LOD) برای تعیین کمترین غلظت SARS-CoV-2 ، آنفلوانزا A و B انجام شد که 100٪ از replicates ها مثبت (مثبت حقیقی) شد. به این منظور ابتدا با استفاده از نمونه RNA استاندارد خارجی، غلظت ویروس SARS-CoV-2، و نمونه پلاسمید استاندارد آنفولانزا نوع A و B در نمونه‌های بالینی با لود بالا تعیین شد. از نمونه ها رقت‌های مختلف تهیه و حد تشخیص (LOD) هر یک از ویروس ها محاسبه گشت. طی این روش محدوده تشخیص اولیه محاسبه شد، حساسیت این کیت برای ژن های N متعلق به SARS-CoV-2، میزان ۰/۴کپی در میکرولیتر و ژن M آنفلوانزا نوع A به میزان ۱ کپی در میکرولیتر و ژن NS1 آنفلوانزا نوع B به میزان ۱/۷ کپی در میکرولیتر می باشد. جهت ارائه LOD نهایی، غلظت های تعیین شده به عنوان LOD اولیه را ۲۰ مرتبه در یک run تکرار کرده و با گزارش ۲۰ مورد مثبت و بدون مورد منفی کاذب این غلظت ها به عنوان LOD نهایی تعیین می گردند. بنابراین کیت حتی در بیمارانی که غلظت ویروس های نام برده پایین است نیز از حساسیت خوبی برخوردار است.

	مثبت	منفی کاذب	معیار پذیرش	نتیجه ارزیابی
SARS-CoV-2	۲۰	۰	۹۵ – ۱۰۰ ٪	۱۰۰ ٪
Influenza A	۲۰	۰	۹۵ – ۱۰۰ ٪	۱۰۰ ٪
Influenza B	۲۰	۰	۹۵ – ۱۰۰ ٪	۱۰۰ ٪

نتایج منحنی استاندارد و گراف مربوط به حساسیت آنالتیکال N gene (SARS-CoV-2)





RNA Copy/ µl
20000
2000
200
20
2
0.4

حد آستانه مثبت:

با توجه به مطالعه‌ی مقدار مرجع، Ct مرجع برای ژن های مورد هدف و ژن کنترل داخلی این کیت ۴۰ می‌باشد.

اختصاصیت آنالیتیکال:

این کیت منحصراً قادر به شناسایی ژن های N متعلق به SARS-CoV-2، ژن M آنفلوانزا نوع A و ژن NS1 آنفلوانزا نوع B می باشد. پرایمرها و پروب‌ها به گونه ای طراحی شده‌اند که با ویروس‌های بیماری‌زای دیگر هیچگونه واکنش متقاطعی نداشته باشند.به منظور تائید اختصاصیت کیت rRT-PCR تک مرحله ای چند منظوره شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند، اختصاصیت کیت به دو روش آنالیز آزمایشگاهی (WET) و آنالیز بیوانفورماتیک (In-Silico PCR) مورد ارزیابی قرار گرفت.

نکته : برای میکروارگانیسم‌های باکتریایی غلظت استفاده شده 10^6 CFU/ml می‌باشد و با توجه به عدم دسترسی به تمام میکروارگانیسم های باکتریایی با غلظت مشخص (CFU/ml) و میکروارگانیسم های ویروسی با غلظت مشخص (PFU/ml)، از کیت حاضر با نمونه هایی با Ct بین ۳۵-۲۰ و مورد تایید آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند استفاده شده است. سایر میکروارگانیسم ها به دلیل عدم دسترسی به صورت بیوانفورماتیک ارزیابی شده و درصد تشابه در همه موارد یاد شده در ذیل صفر می‌باشد و اختصاصیت ۱۰۰ ٪ اعلام می‌شود.

میکروارگانیسم‌های یاد شده عبارتند از: Adenovirus، Enterovirus، RSV، VZV، HSV-I، HSV-II، CMV، Streptococcus pneumoniae، Klebsiella pneumoniae، Human Alphaherpesvirus I، Adenoviridae، Human metapneumovirus، Human respirovirus III، Human parainfluenza virus I، Human Alphaherpesvirus II، parainfluenza virus 4a، Human parainfluenza virus 4b، Rice stripe tenuvirus، Chlamydia pneumoniae، Haemophilus influenza، Legionella pneumoniae، Mycobacterium tuberculosis، Streptococcaceae، Human alphaherpevirus III، Mycoplasma، Pneumocystis، Cucumber mosaic virus، Fungi، Legionellales، Bordetella و Mollicutes.

021-26422362
Co.ap-rad.com
order@co.ap-rad.com
شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند
ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

دقت:

کمیت ضریب تغییرات (CV%) در یک run کاری دارای دقت کمتر از۵٪ است.

مطالعات بالینی:

عملکرد بالینی کیت RT-PCR یک مرحله ای چندمنظوره کیفی شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند برای ویروس SARS-CoV-2 و آنفلوانزا نوع A و B با استفاده از نمونه های بالینی مثبت ومنفی مورد تائید ارزیابی شد. نتایج ارزیابی هر یک از ژن های N gene، M gene و NS1 gene بخ شرح جداول ذیل می‌باشد.

SARS-CoV-2 (N gnene)

حساسیت:۱۰۰٪

اختصاصیت : ۱۰۰٪

		روش مرجع	
		مثبت	منفی
کیت rRT-PCR یک مرحله‌ای چند منظوره غربالگری SARS-CoV-2، آنفلوانزا نوع A و B	مثبت	۳۲	۰
	منفی	۰	۲۴

Influenza A (M gene)

حساسیت:۱۰۰٪

اختصاصیت : ۱۰۰٪

		روش مرجع	
		مثبت	منفی
کیت rRT-PCR یک مرحله‌ای چند منظوره غربالگری SARS-CoV-2، آنفلوانزا نوع A و B	مثبت	۸	۰
	منفی	۰	۴۸

Influenza B (NS1 gene)

حساسیت:۱۰۰٪

اختصاصیت : ۱۰۰٪

		روش مرجع	
		مثبت	منفی
کیت rRT-PCR یک مرحله‌ای چند منظوره غربالگری SARS-CoV-2، آنفلوانزا نوع A و B	مثبت	۱۳	۰
	منفی	۰	۴۳

کنترل کیفیت:

در این آزمایش، RNase P (Ribonuclease P) به عنوان کنترل داخلی ویروس‌های SARS-CoV-2، آنفلوانزا نوع A و B در یک میکروتیوب وجود دارد و کنترل داخلی باید در تمامی میکروتیوب‌ها به جز میکروتیوب NTC در کانال قرمز افزایش یابد.

تداخل:

- ممکن است در اثر حمل یا انتقال آلودگی از سایر نمونه های مثبت به نمونه در حال آزمایش، نتیجه مثبت کاذب شود.
- عمدتاً نتایج منفی کاذب، ناشی از روش های نادرست جمع آوری نمونه است.

دفع پسماندها:

- دفع پسماندها را با مشورت با مقامات محلی یا ایالتی و با توجه به روش های توصیه شده موجود انجام دهید.

021-26422362
Co.ap-rad.com
order@co.ap-rad.com
شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند
ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

- زباله‌هایی با منشاء انسانی به ویژه لوله‌های VTM به دلیل احتمال حضور میکروارگانیسم‌های پاتوژنیک انواع مختلف ویروس‌هایی چون SARS-CoV-2 و آنفلوانزا نوع A و B و ... در آن، باید همانند زباله‌های زیستی ابتدا اتوکلاو شوند سپس با احتیاط امحا گردند. هنگام برخورد و دفع چنین نمونه هایی، اقدامات احتیاطی جهانی را بکار گیرید.

منابع:

- Chodari, L.; Maleki Dizaj, S.; Ardalan, M.; Samiei, M.; Sharifi, S.; Zununi Vahed, S.; Huseynova, I.; Khalilov, R.; et al. A Comprehensive Review of Detection Methods for SARS-CoV-2. *Microorganisms* **2021**, *9*, 232.
- Kiani, J.; Ghorbani, S.; Seif, F.; Khoshmirsafa, M.; Bokharaei, F. Tips for Molecular Detection of SARS-CoV-2 Using Real-time PCR Method. *RJMS.* **2020**, *27(6)*, 113-165.
- Hu, B.; Guo, H.; Zhou, P.; et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and CoVID-19. *Nat Rev Microbial* **2021**, *19*, 141-154.

علائم و توضیحات:

سری ساخت	LOT
شماره رفرنس	REF
تاریخ تولید	
تاریخ انقضا	
مطالعه بروشور	
استفاده در موارد تشخیصی و بالینی	IVD
شرایط نگهداری	
آدرس شرکت	
دور از تابش آفتاب	

جهت ارتباط با واحد پشتیبانی با شماره ۲۶۴۲۲۹۴۰-۰۲۱ تماس بگیرید.

021-26422362

Co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com

شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند

ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱