



LiCovid™  
COVID-19 RT qPCR Kit

100 Reactions

Cat. No.: LG9971

مقدمه

کیت تشخیصی LiCovid™ به منظور شناسایی ویروس جدید کرونا ۲۰۱۹ (2019-nCoV) در نمونه های تنفسی انسان طراحی شده است. این کیت با هدف قرار دادن ژن های N و RdRp با استفاده از روش Real-Time PCR بر اساس طراحی متخصصین داخلی شرکت لیوژن، شناسایی 2019-nCoV را در یک میکروتیوب امکان پذیر می نماید.

آزمون Real-time PCR بر اساس سیستم پروب TaqMan انجام می شود. پروب های اختصاصی COVID-19 برای تشخیص ژن های N در کانال قرمز (رنگ فلورسانس Cy5) و RdRp در کانال سبز (رنگ فلورسانس FAM) طراحی شده اند. همچنین پروب برای ژن کنترل داخلی در کانال زرد با رنگ فلورسانس HEX نشاندار شده است.

اقدامات و هشدارهای ایمنی زیستی

- کارکنان باید با پروتکل و ابزارهای مورد استفاده آشنا باشند.
- هنگام کار با نمونه های بالینی، از وسایل محافظ شخصی (مانند لباس، دستکش، شیلد، عینک محافظ) استفاده کنید.
- کلیه مراحل آماده سازی و کار با نمونه، بایستی در فضای BSL2 یا سطوح ایمنی زیستی بالاتر و در زیر هود بیولوژیکی کلاس II انجام شود.
- کنترل های مثبت و کلیه نمونه های بیمار باید به عنوان نمونه های عفونی در نظر گرفته شده و مراحل غیرفعالسازی ویروس و نیز امحاء نمونه باید مطابق با پروتکل های دفع و امحاء نمونه های عفونی بیولوژیک انجام شود.
- از خوردن، آشامیدن، سیگار کشیدن، استعمال لوازم آرایشی و استفاده از لنزهای تماسی در تمام فضاهای آماده سازی نمونه و آزمون جدا خودداری نمایید.
- هنگام استفاده از کیت، به تاریخ انقضاء چاپ شده بر روی جعبه کیت توجه نموده و از محصول منقضی شده استفاده نکنید.
- از صحت نصب، کارکرد و کالیبراسیون تمام ابزارهای مورد استفاده اطمینان حاصل کنید.
- در هنگام کار با کیت مواد و میکروتیوب های واکنش Real-time PCR، از دستکش بدون پودر استفاده کرده و آن ها را بر روی یخ و یا رک های خنک کننده قرار دهید.
- بلافاصله پس از استفاده از کیت، آن را در شرایط بهینه درج شده بر روی جعبه کیت منتقل کرده و نگهداری نمایید.

نمونه های قابل قبول برای آزمون

نمونه های دستگاه تنفسی فوقانی شامل سواب های نازوفارنکس و اوروفارنکس می باشد.

شرایط نگهداری نمونه

نمونه ها تا ۷۲ ساعت پس از جمع آوری می توانند در دمای ۴°C نگهداری شوند. در صورت تاخیر در استخراج RNA، نمونه ها را در دمای ۸۰°C- نگهداری کنید. اسیدهای نوکلئیک استخراج شده باید در دمای ۸۰°C- نگهداری شوند.

محدودیت های روش تشخیصی

نتایج آزمایش این کیت با طرز صحیح جمع آوری نمونه، شرایط انتقال و نگهداری نمونه مرتبط است. جمع آوری نادرست نمونه، شرایط نگهداری و انتقال نامناسب و روند نامناسب پردازش نمونه منجر به نتایج نادرست آزمایش می شود.

عوامل زیر می توانند باعث نتیجه منفی کاذب شوند:

- شرایط نادرست نگهداری معرف های آزمایش و نمونه ها

- وجود عوامل مهار کننده در واکنش آزمون
- جهش های ژنتیکی ایجاد شده در توالی هدف ویروس، در دوره شیوع همه گیری بیماری
- آلودگی های خارج از کنترل به وجود آمده در طی پردازش نمونه می تواند منجر به نتایج مثبت کاذب آزمایش شود.

تشخیص قطعی بیماری و درمان آن باید در کنار سایر علائم بیماری، تاریخچه بیماری، نتایج آزمایشگاهی دیگر و پاسخ بیمار به درمان بررسی شود.

تجهیزات مورد نیاز

- میز کار دارای لامپ UV و فیلتر HEPA / هود لامینار کلاس II
- میکرواسپین-ورتنس
- میکروسانتریفیوژ
- سمپلر و سر سمپلر مربوطه (۲-۱۰ میکرولیتر، ۲۰-۲۰۰ میکرولیتر و ۱۰۰۰-۱۰۰ میکرولیتر)
- رک های خنک کننده فلزی ویژه آماده سازی واکنش های Real-time PCR
- فریزرهای ۲۰°C- و ۸۰°C-، یخچال ۸°C-۲
- دستگاه Real-time PCR دارای کانال های خوانش رنگ های سبز، زرد و قرمز
- کیت یا سیستم اتوماتیک استخراج اسید نوکلئیک
- میکروتیوب های مخصوص واکنش Real-time PCR
- میکروتیوب های استریل (بدون DNase و RNase)

حمل و نقل و شرایط نگهداری کیت

کیت را بر روی یخ خشک حمل نموده و بلافاصله پس از دریافت در دمای ۲۰±۵°C نگهداری کنید.

با تقسیم کردن مواد در حجم های کوچک، از فریز و دفریز شدن مکرر مواد جلوگیری کنید و برای حفظ بهترین کارایی کیت، بیشتر از ۳ مرتبه محتویات کیت را فریز و دفریز نکنید.

استخراج اسید نوکلئیک

عملکرد سنجش مبتنی بر روش RT-PCR، بستگی به میزان و کیفیت نمونه RNA دارد. از این رو روشهای استخراج RNA بایستی برای بازیابی و خلوص نمونه RNA، مناسب و معتبر باشند. روشهای تجاری موجود برای استخراج RNA مطلوب و با کیفیت، عبارتند از:

سیستم های bioMérieuxNucliSens® و کیت های:

QIAamp® Viral RNA Mini, QIAamp® MinElute Virus Spin یا RNeasy® Mini (QIAGEN), EZ1 DSP Virus (QIAGEN), Roche MagNA Pure Compact RNA Isolation, Roche MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation, and Roche MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume, Invitrogen ChargeSwitch® Total RNA Cell, Invisorb Spin Universal Kit (Stratec).

-پس از استخراج RNA و استفاده از آن، باقیمانده نمونه را فوراً در دمای ۸۰°C- قرار دهید. جهت انجام آزمون RT-PCR، به مقدار مورد نیاز نمونه RNA از فریزر خارج نمایید. نمونه دریافت شده از بیمار و یا RNA استخراج شده از آن را بیش از یکبار ذوب یا فریز نکنید.

محتویات کیت

اجزاء کیت	حجم (میکرولیتر)
One-Step RT qPCR Mix	۵۰۰
Probe/Primer Mix (N, RdRp & IC ژن های)	۵۰۰
Positive Control (RdRp & N ژن های)	۱۰۰
RNase Inhibitor	۱۰۰
Nuclease-free Water	۶۰۰

- آزمون را مطابق برنامه دمایی ذکر شده در جدول زیر راه اندازی کنید.

تعداد سیکل	زمان	دما (°C)
۱	۳۰ دقیقه	۵۰
۱	۳ دقیقه	۹۵
۴۰	۲۰ ثانیه	۹۵
**	۳۰ ثانیه	۶۲**

\*\* خوانش رنگ در دمای ۶۲ درجه انتخاب گردد.

### آنالیز نتایج

#### ۱- کنترل مثبت

در مرحله اول، عملکرد کنترل مثبت را بررسی کنید. Ct منحنی کنترل مثبت برای هر دو ژن N و RdRp باید در محدوده  $5 \pm 20$  مشاهده شود. تکثیر خارج از این محدوده قابل قبول نبوده و آزمایش باید تکرار گردد.

#### ۲- واکنش NTC

در شرایط ایده آل، نتیجه واکنش NTC، باید بصورت یک خط مسطح (نتیجه منفی) باشد که نشان دهنده عدم آلودگی مواد زمینه واکنش می باشد. از این رو: -مشاهده منحنی تکثیر NTC در  $Ct > 37$  معتبر نبوده و نتیجه آزمون از این نظر مورد تایید است و نیازی به تکرار آزمون نیست. -در صورت مشاهده منحنی تکثیر در  $Ct \leq 37$ ، نتایج نامعتبر بوده و بایستی آزمون مجدداً تکرار شود.

#### ۳- کنترل داخلی (IC)

منحنی تکثیر بدست آمده برای ژن کنترل داخلی IC، نشان دهنده استخراج موفقیت آمیز RNA و نیز عملکرد مطلوب و کیفیت مواد بیولوژیکی واکنش می باشد. -اگر نمونه تست دارای منحنی تکثیر برای ژن IC با مقدار  $Ct \leq 37$  باشد، استخراج RNA و انجام واکنش مورد تایید است.

### بررسی نمونه مورد آزمون

- نمونه هایی که برای ژن N، RdRp و IC مثبت هستند، بایستی دارای منحنی "سیگموئیدی" باشند.  
- اگر فلورسانس منحنی از خط Threshold عبور کند و عدد Ct را نشان دهد، منحنی تکثیر قابل قبول است.  
- اگر نمونه تست دارای منحنی تکثیر برای ژن های N و RdRp با مقدار  $Ct \leq 37$  باشند، موید آن است که نمونه، برای nCoV-2019 مثبت است.  
- اگر نمونه مورد آزمون دارای منحنی تکثیر برای ژن های N و RdRp با مقدار  $Ct > 37$  باشند، بایستی آزمون تکرار شود. چنانچه نتایج مشابه دیده شد، نمونه برای nCoV-2019 مثبت است.  
- اگر نمونه مورد آزمون مقدار  $Ct \leq 37$  را تنها برای یکی از ژن های N یا RdRp داشته باشد و هیچ گونه منحنی تکثیر برای ژن دیگر مشاهده نشود، بایستی آزمون تکرار شود. چنانچه نتایج مشابه دیده شد، نمونه برای nCoV-2019 مثبت است.

تست با این کیت توسط دستگاه های Real-time PCR که دارای کانال های Cy5، HEX و FAM باشند مانند Rotor-Gene Q 5Plex و Magnetic Induction Cycler (Mic) قابل انجام می باشد.

### پروتکل آزمون تشخیصی RT-qPCR

مخلوط Probe/Primer Mix دارای پروب/پرایمر ژن N، RdRp مربوط به ویروس (2019-nCoV) و حاوی پروب/پرایمر ژن Internal Control می باشد که یک ژن انسانی را مورد هدف قرار می دهد. ژن Internal Control در کانال HEX خوانش شده و تکثیر آن، کیفیت RNA استخراج شده را تایید می نماید.

۱- سنجش ژن های RdRp، N و Internal Control (IC) به صورت همزمان در یک میکروتیوب

- با توجه به جدول زیر یک میکروتیوب برای نمونه RNA (تست) و یک میکروتیوب برای کنترل مثبت ژن N و RdRp (کنترل) آماده کنید.
- ۴ میکرولیتر از نمونه RNA به میکروتیوب تست اضافه کنید. برای افزایش حساسیت تست می توانید مقدار نمونه RNA را ۹ تا ۹ میکرولیتر افزایش دهید.
- ۴ میکرولیتر از کنترل مثبت به میکروتیوب کنترل اضافه کنید.

اجزاء	حجم (میکرولیتر)
One-Step RT qPCR Mix	۵
RNase Inhibitor	۱
Probe/Primer Mix	۵
Positive Control / Sample (RNA)	۴
Nuclease-free Water	تا حجم ۲۰

#### ۲- واکنش (NTC: Non Template Control)

- با توجه به جدول زیر یک میکروتیوب برای واکنش بدون نمونه الگو (NTC) آماده کنید.
- ۴ میکرولیتر از آب Nuclease-free را به میکروتیوب واکنش NTC اضافه نمایید.

اجزاء	حجم (میکرولیتر)
One-Step RT qPCR Mix	۵
RNase Inhibitor	۱
Probe/Primer Mix	۵
Nuclease-free Water	تا حجم ۲۰

#### ۳- انجام آزمایش Real-time PCR

-میکروتیوب های آماده شده را در دستگاه Real-time PCR قرار دهید.

-کانال مربوط به خوانش رنگ های فلورسانس را تعیین کنید.

ژن	طول موج شناسایی (نانومتر)	طول موج برانگیختگی (نانومتر)	کانال	No
RdRp	۵۲۰	۴۹۵	FAM	۱
IC	۵۵۶	۵۳۵	HEX	۲
N	۶۶۲	۶۴۶	Cy5	۳

1-2019-nCoV WHO qPCR kit (Quick User Guide). Version 1.1

2- Real-Time RT-PCR Panel for Detection 2019-Novel Coronavirus (Centers for Disease Control and Prevention, Respiratory Viruses Branch, Division of Viral Diseases) (Feb 2020)

3- Instruction for use of detection kit for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) RNA (PCR-Fluorescence Probing). DAAN Gene co. Jan 2020

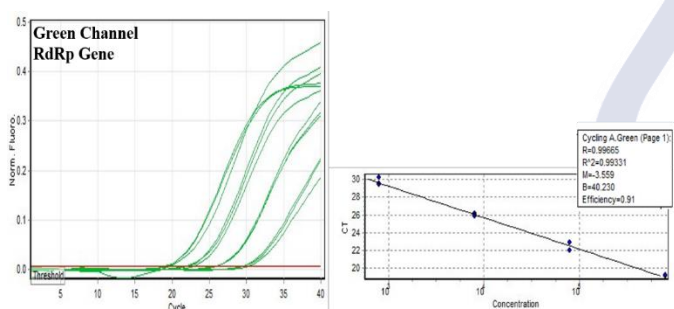
### معتبرسازی آزمون

#### نتایج معتبرسازی ژن RdRp:

ضریب همبستگی واکنش ( $R^2$ ): ۰/۹۹

شیب خط: -۲/۵

بازده تست: ۰/۹

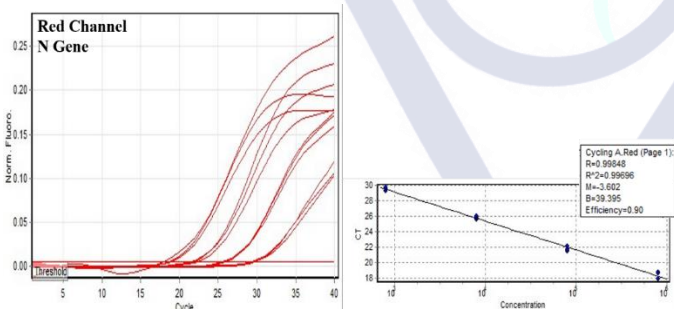


#### نتایج معتبرسازی ژن N:

ضریب همبستگی واکنش ( $R^2$ ): ۰/۹۹

شیب خط: -۳/۶

بازده تست: ۰/۹



سیگنال qPCR							
ژن هدف N	+	+	+	-	-	+/-	+/-
ژن هدف RdRp	+	+	-	+	-	+/-	+/-
کنترل مثبت	+	+	+	+	+	+/-	-
کنترل داخلی IC	+	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-
NTC	-	-	-	-	-	+	-
نتایج	مثبت	مثبت	تکرار تست استخراج RNA	تکرار تست استخراج RNA	منفی	نا معتبر	نا معتبر

### اختصاصیت تست

کیت تشخیصی LiCovid™ برای توالی ویروس SARS-COV-2 طراحی شده است. بنابراین به صورت اختصاصی فقط توالی مورد هدف در ویروس SARS-COV-2 را شناسایی می کند. کیت طراحی شده در بررسی *In Silico* هیچ گونه واکنش متقاطعی با سایر پاتوژن های سیستم تنفسی مانند Coronavirus (NL63, HKU1, 229e, OC43), SARS Coronavirus, MERS Coronavirus, Influenza A virus, Influenza B virus, adenovirus, parainfluenza virus (1-4), Human Metapneumovirus (hMPV), Enterovirus EV68, Respiratory syncytial virus, Legionella pneumophila, Rhinovirus, Chlamydia pneumonia, haemophilus influenzae, Mycobacterium tuberculosis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Bordetella pertussis, Mycoplasma pneumoniae, Pneumocystis jirovecii, Candida albicans, Staphylococcus epidermis, Streptococcus salivarius, pseudomonas aeruginose ندارد.

همچنین در Wet Testing نیز هیچ واکنش متقاطعی با میکروارگانیسم های haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Mycoplasma pneumoniae, Candida albicans, Staphylococcus epidermis, Streptococcus salivarius دیده نشد.

### حساسیت تست

حداقل تعداد کپی قابل تشخیص در این تست ۲۰۰ کپی در میلی لیتر می باشد.

### نشانه ها

	Temperature Limitation		In Vitro Diagnostic Medical Device		Trade Mark
	Use by MM-YYYY		Keep Dry		Cycle Threshold
	Catalogue number/Reference number		Biological Risk		Multiplex
	Lot Number/ Batch Code/ Batch Number		Consult Instruction For Use		Duplex
	Data of Manufacture		Place for opening of The Seal		Non Template Control

Be your Best  
**LIVOGEN**  
لیوژن

تهران، خ ایلیا، حدفاصل خ قدس و خ وصال شیرازی، پ ۴۱، طبقه چهارم  
تلفکس: ۰۲۱-۸۸۹۹۶۸۲۸ کدپستی: ۱۴۱۷۷۵۳۵۸

[www.livogen.co](http://www.livogen.co) , [www.Masscenter.ir](http://www.Masscenter.ir) , [www.Boomix.ir](http://www.Boomix.ir)

[info@livogen.co](mailto:info@livogen.co) , [order@livogen.co](mailto:order@livogen.co) , [info@Masscenter.ir](mailto:info@Masscenter.ir)