Viga SARS COV-2 Molecular Diagnostic Kit

Store at -20 ºC in darkness

100 rxn

Cat NO: MD983053

By ROJE

Edition,1/2021

2021 ROJETechnologies, all rights reserve

محتویات

اجزای کیت	۱۰۰ واکنش
Q-ROMAX, 4X	۵۰۰ µl
Pro I Mix	۴۰۰ µl
RTase, Recombinant Reverse Transcriptase, RNase H-	۱۰۰µl
Positive Control	۱۵۰µl
Negative Control	۱۵۰µl

شرح محصول

کیت تشخیص مولکولی Viga SARS-CoV-2 Molecular Diagnostic Kit تست رونوشت بردار معکوس Real-time PCR می باشد که برای تشخیص کیفی ویروس SARS-CoV-2 از نمونه سواب‌های نازوفارنکس، سواب‌های حلقی (گلو)، سواب‌های قدامی بینی و آسپیراسیون بینی، که توسط پرسنل مراکز خدمات بهداشتی و درمانی از افراد مشکوک به کوید ۱۹ گرفته می‌شود، مورد استفاده قرار می‌گیرد. این کیت برای تشخیص کیفی ژن‌های RdRp و N از ژنوم SARS-CoV-2 طراحی شده است.

جمع آوری نمونه

در مرحله نمونه‌برداری، نگهداری و انتقال نمونه ها باید دقت کافی بعمل آید. به صورت پیش فرض، نمونه آلوده در نظر گرفته می شود و جابه جایی باید با رعایت نکات کامل ایمنی زیستی صورت گیرد. سواب نمونه گیری باید از نوع نایلون یا داکرون و با دسته آلومینیومی یا پلاستیکی باشد. سواب پنبه ای به هیچ وجه توصیه نمی‌شود. بعد از نمونه گیری، سواب باید فورا در داخل محیط مناسب انتقال ویروس نگهداری شود.

استخراج نمونه

به منظور استخراج اسیدنوکلئیک ویروسی می‌توان از RNJia Virus Kit (REF: RN983072) و یا کیت‌های دیگر دارای تاییدیه وزارت بهداشت، استفاده کرد.

مراحل کار

تمامی اجزاء را از جعبه کیت بیرون آورده تا به دمای اتاق برسد. سپس هر کدام از اجزا را قبل از مصرف، ورتکس مختصری نمایید. حجم نمونه تخلیص شده مورد استفاده در این تست باید ۱۰ میکرولیتر باشد. مطابق جدول ۱ اجزای واکنش را آماده کرده و طبق جدول ۲ برنامه Real-time PCR را اجراء کنید.

جدول۱: آماده سازی اجزای واکنش به ازای یک واکنش

اجزاء مورد نیاز	حجم
Q-ROMAX	۵ µl
Pro I Mix	۴ µl
RTase, Recombinant Reverse Transcriptase, RNase H-	۱ µl
Isolated RNA	۱۰ µl

جدول ۲: برنامه دمایی One-step Multiplex Real-time RT-PCR

تعداد سیکل	دما	زمان	مرحله
۱	۵۰ درجه سانتیگراد	۲۰ دقیقه	سنتز cDNA
۱	۹۵ درجه سانتیگراد	۳ دقیقه	فعال شدن آنزیم پلیمراز
۴۵	۹۵ درجه سانتیگراد	۱۰ ثانیه	واسرشته شدن
	۵۵ درجه سانتیگراد	۴۵ ثانیه	اتصال و تکثیر اسید نوکلییک
	۷۲ درجه سانتیگراد	۱۵ ثانیه	تکثیر نهایی

آنالیز نتایج

- تجزیه و تحلیل داده‌ها باید به صورت جداگانه برای هر ژن با استفاده از تنظیم دستی آستانه (Manual Threshold) انجام شود. خط آستانه برای هر نمونه باید در فاز نمایی منحنی‌های فلورسانس و بالاتر از هر سیگنال پس زمینه قرار گیرد.

ROJETECHNOLOGIES

- فلوروفور FAM (سبز) برای ژن RdRp، فلوروفور Texas Red (نارنجی) برای ژن N و فلوروفور HEX (زرد) برای ژن RNase P (کنترل داخلی) است.
- کنترل منفی (NTC) به عنوان کنترل آلودگی استفاده می‌شود. مقدار افزایش فلورسانس منحنی در کنترل منفی از مرز آستانه عبور نمی‌کند. اگر Ct کمتر از ۳۵ باشد به عنوان آلودگی احتمالی در نظر گرفته می‌شود. سیگنال‌های قوی، Ct بالای ۳۵ در کنترل منفی می‌تواند PCR artifacts باشد که در این موارد می‌توان شکل منحنی را در نظر گرفت (منحنی S شکل تیپیکال نتیجه مثبت می‌باشد).
- کنترل داخلی یا ژن RNase P باید در Ct ۴۰ یا قبل از آن برای همه نمونه‌های بالینی، مثبت باشد که نشان‌دهنده وجود اسیدنوکلئیک کافی از ژن RNase P انسان بوده و نمونه از کیفیت قابل قبولی برخوردار است.
- منحنی ژن RNase P با Ct> 40 یا بدون Ct نشان دهنده غلظت پایین نمونه یا مواد ممانعت کننده در واکنش است. در این شرایط توصیه می‌شود نمونه تخلیص شده حداقل ۱/۲ رقیق شود. اگر پس از تکرار آزمایش ، نتیجه تست مورد پذیرش نبود، باید یک نمونه تازه دیگر از بیمار گرفته و تست تکرار شود.
- نمونه بالینی مثبت باید Ct ≤ 40 داشته باشد.
- در صورت عدم دستیابی به واکنش مثبت مورد انتظار (منحنی S شکل تیپیکال)، آزمایش انجام شده مورد پذیرش نمی‌باشد و با رعایت دقیق دستورالعمل‌های کیت، تست را دوباره تکرار کنید.
- علت عدم موفقیت در واکنش کنترل مثبت را تعیین کنید، اقدامات اصلاحی را انجام دهید و نتایج اقدامات اصلاحی را مستند کنید.
- برای اطلاع از کنترل‌های مثبت و منفی برای هر ران به جدول ۳ مراجعه کنید.

جدول۳: شرایط قابل قبول برای کنترل مثبت و منفی

نتایج	IC HEX	N Texas Red	RdRp FAM
کنترل مثبت	در نظر گرفته نمی شود	+	+
		−	+
		+	−
کنترل منفی	+	−	−
نامعتبر و مورد پـذیرش نمی باشد	−	−	−

*Result of (-): Ct value >40 or Undetermined, Result of (+): Ct value ≤ 40

محدودیت ها

- تیتر پائین ویروس در نمونه بیمار، حمل و نقل نامناسب، یا عدم کیفیت تخلیص می تولند منجر به نتیجه منفی کاذب شود.
- ژنوم ویروس کرونا از نوع RNA می‌باشد که تنوع ژنتیکی قابل توجهی را نشان می‌دهد. اگرچه تلاش شده پرایمر و پروب ها در مناطق حفاظت شده از ژنوم ویروسی طراحی شوند ، اما این تنوع ژنتیکی می‌تواند منجربه عدم اتصال مناسب بین پرایمر/ پروب و توالی هدف و در نهایت منفی کاذب شود.
- تمامی کنترلها می بایست قبل از تفسیر نتایج بررسی شوند. در صورت عدم تایید کنترل ها ، نتایج بیماران قابل تفسیر نمی باشد. میزان حد تشخیص این کیت برابر Ct≤40 می‌باشد. تمام منحنی‌های مثبت باید پیک تکثیری (S) شکل داشته باشند.
- عدم رعایت شرایط مناسب نگهداری کیت می‌تواند منجر به نتایج منفی کاذب شود.
- استفاده از این کیت نیاز به پرسنل مجرب و آموزش دیده دارد و هر گونه خطای پرسنلی می‌تواند منجر به نتایج نامعتبر گردد.
- نتایج حاصل از این کیت تنها در کنار شواهد بالینی برای تشخیص SARS CoV-2 مورد قبول می‌باشد. تشخیص قطعی و درمان بیماران باید بر اساس ترکیب نتیجه این آزمایش با نتایج آزمایش‌های دیگر و سابقه پزشکی و همچنین نحوه پاسخ دهی به درمان صورت گیرد.
- کمترین حد تشخیص کیت ۱۰۰ کپی بر میلی لیتر می باشد.