

CoVID-19 Dropout Multiplex One Step RT-PCR Kit (Triple Genes)

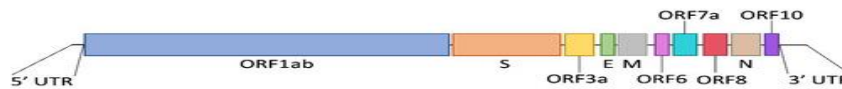
Ref: APCOVSA (In Vitro Diagnostic, IVD)

مقدمه:

شرکت پژوهش و توسعه امیر پیوند (AP-RAD) با هدف شناسایی سریع، حساس و اختصاصی ویروس SARS-CoV-2 (عامل بیماری CoVID-19) و تمایز آن در نمونه های تنفسی فوقانی بیمارانی که دارای علائم و نشانه های بیماری CoVID-19 هستند، اقدام به طراحی و ساخت کیت rRT-PCR تک مرحله ای چند منظوره 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 هوای کشور چین کشف شد و در ماه های ابتدایی سال ۲۰۲۰ منجر به همه گیر شدن عفونت دستگاه تنفسی گردید. کروناویروس ها، دارای بزرگترین ژنوم RNA تک رشته ایی با پلارینه مثبت بوده و دارای پوشش یا envelope می باشند. پروتئین های Envelope (E), Matrix (M) و Nucleocapsid (N) از پروتئین های ساختمانی این ویروس به حساب می آید. بیماری CoVID-19 با علائم شبه انفلوآنزایی شروع شده و در ادامه طیف وسیع علائم بالینی شامل درگیری خفیف تا پنومونی خفیف ریوی (۸۱٪)، تنگی نفس و هیپوکسی (۵۰٪)، نارسایی تنفسی، شوک یا اختلال در عملکرد چندین عضو (۵٪) در بیماران مبتلا دیده می شود کیت CoVID-19 Dropout Multiplex One Step RT-PCR Kit بر اساس rRT-PCR تک مرحله ای در شرکت پژوهش و توسعه امیر پیوند طراحی و به منظور شناسایی کیفی ویروس SARS-CoV-2 با استفاده از شناسایی همزمان سه ژن ویروس (S, ORF1b, N) مورد استفاده قرار می گیرد. همچنین این کیت بصورت تحقیقاتی در غربالگری واریانت B.1.1.7 (اولین بار در کشور انگلیس گزارش شده است) کاربرد دارد.

اصول انجام آزمایش:

روش اصلی تشخیص بیماری COVID-19 بر اساس واکنش زنجیره ای پلیمرز معکوس به روش مولکولی (RT-PCR) است. ابتدا RNA از نمونه ها استخراج می شود، سپس از روی آن رشته های مکمل DNA (cDNA) سنتز می شود و به دنبال آن، بخش های خاصی از cDNA با استفاده از تکنیک PCR تکثیر می شوند. آزمایش rRT-PCR چند منظوره از پروب های فلوروزئیک مبتنی بر TaqMan استفاده می شود که با استفاده از فعالیت نوکلئازی ۵ پریم Taq DNA polymerase هنگامی که در چرخه های PCR عمل می کند قادر به شناسایی محصولات اختصاصی می گردد. کیت rRT-PCR یک مرحله ایی چند منظوره COVID-19 شرکت AP-RAD از پرایمر و پروب های اختصاصی در یک ویال که دارای سه مارکر اختصاصی N (ژن پروتئین نوکلئوکپسید) و ژن Replicase Open Reading Frame (ORF) 1b و ژن S (Spike) است استفاده می کند. در مورد ژن S، طراحی به شکلی است که در صورت وجود حذف HV69-70del مربوط به واریانت B.1.1.7 واکنش انجام نشده و تکثیر دیده نمی شود برای بررسی استخراج و ارزیابی آزمایش به صورت همراه با RNase P (Ribonuclease P) به عنوان کنترل داخلی، مورد سنجش قرار می گیرد. لیبل پروب های N، S، Orf1b و Rnase P به ترتیب زرد (JOE, VIC, HEX)، سبز (FAM)، نارنجی (ROX) و قرمز (CY5) می باشد. (لازم به ذکر است این مجموعه صرفاً جنبه کاربرد تحقیقاتی دارد)



SARS-CoV-2 genome (NC_004718.3). Orf, open reading frame; S, spike gene; E, envelope gene; M, membrane gene; N, nucleocapsid gene. Gene size drawn to scale

محتویات کیت:

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

ردیف	محتویات	حجم	شرایط نگهداری
۱	ویال مسترمیکس آماده استفاده	450 μl	≥ -۲۰ °C
۲	ویال پرایمر-پروب آماده استفاده	50 μl	≥ -۲۰ °C
۳	کنترل منفی	50 μl	≥ -۲۰ °C
۴	کنترل مثبت کلاسیک	50 μl	≥ -۲۰ °C
۵	کنترل مثبت جهش ژن S	50 μl	≥ -۲۰ °C

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, کانال سبز (FAM)، نارنجی (Orange)، قرمز (CY5) و زرد (JOE, VIC, HEX).
- هود ایمنی زیستی کلاس II
- سمپلر در حجم های (0.5-10μl, 10-100 μl, 100-1000 μl)

021-26422362

Co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com

شرکت پژوهش و توسعه امیر پیوند

ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸،

واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

- 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، سرسپلرهای دارای فیلتر آئروسول در حجم های 10 µl, 100 µl, 1000 µl، خودکار علامت گذاری آزمایشگاهی و رول دستمال کاغذی
- یخچال و فریزر (۲۰- سانتی گراد و ۸۰- سانتی گراد)

شرایط نگهداری کیت:

- دمای استاندارد برای نگهداری محتویات این کیت (۵ ± ۲۰- °C) می باشد. حفظ دما در مدت زمان نگهداری محصول الزامی است.
- مدت زمان مناسب برای استفاده از این کیت ۱۲ ماه بوده که تاریخ انقضا نیز بروی 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 را شناسایی و روش های مقابله را رعایت نمایند. در صورت مواجهه با بیماران مبتلا به COVID-19 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 سانتی گراد 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 ریبونوکلازها، به شدت توصیه میشود RNA ویروس فوراً بعد از جمع آوری نمونه ها استخراج شود. هنگام کار با RNA، همیشه از دستکش استفاده کنید تا از آلودگی ریبونوکلاز روی پوست دست اجتناب شود.
- (۷) با توجه به حساسیت بالای تکنیک RT-PCR لازم است جهت جلوگیری از بروز نتایج مثبت کاذب از عدم آلودگی محیط کار و ابزارها با cDNA, RNA یا محصولات PCR سایر نمونهها، اطمینان حاصل نمایید. پرسنل آزمایشگاه باید ملزومات پوشش حرفه ای را که شامل دستکش های یکبار مصرف، عینک و گان یا روپوش آزمایشگاه تمیز است را رعایت کنند. مراحل انجام کار باید بصورت یکسویه سازماندهی شوند و هیچ گاه 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 سرسپلرهای دارای فیلتر آئروسول استفاده شود. تعویض دستکش ها هنگام دست زدن به میکروتیوب های 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 انستیتو پاستور 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 نشستی 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 نمایند.
- (۱۴) سرسپلر 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 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 آلومینات 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 می توان 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 VTM تولید شده در شرکت پژوهش و توسعه امیر پیوند، حفظ سلامت نمونه را تا ۱ هفته تضمین می کند). 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 پایین تر نگهداری کنید.
- نمونه را برای انجام آزمایش در اسرع وقت به آزمایشگاه انتقال دهید. به این منظور نمونه ها را بر روی یک 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 می بایست مطابق با دستورالعمل فعلی تنظیم مقررات انجمن بین المللی حمل و نقل هوایی (IATA) تحت عنوان کالای خطرناک بسته بندی 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 تأیید قرار ندارد. (سواب خشک).
- نوع نمونه مورد تأیید 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
- نمونه های فریز نشده پس از گذشت بیش از ۷۲ ساعت از زمان جمع آوری نمونه به آزمایشگاه، رسیده اند.

روش آزمایش:

ریپونکتلیک اسیدها با استفاده از کیت معتبر استخراج RNA ویروسی از نمونه های جمع آوری شده استخراج می شوند. RNA تخلیص شده مستقیماً 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 ریبورتر از رنگ quencher شده و سیگنال فلورسنت ایجاد می کند. در هر چرخه، مولکولهای اضافی رنگ ریبورتر 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 می شود.

استخراج و تخلیص نوکلئیک اسید:

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

روش RT-PCR کیفی یک مرحله ای بر پایه TaqMan:

RT-PCR یک مرحله ای مطابق مراحل ذیل انجام می شود.

- در کلیه آزمایشات برای هر بیمار دو میکروتیوب همراه با میکروتیوب های 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.
- تمام میکروتیوب ها را بر روی رک سرد قرار دهید.
- ۹ میکرولیتر مسترمیکس - آنزیم و ۱ میکرولیتر پرایمر - پروب به تمامی میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.
- ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به میکروتیوب NTC اضافه کنید.
- ۱۰ میکرولیتر کنترل منفی به میکروتیوب که برای آن نام گذاری شده است اضافه کنید.
- ۱۰ میکرولیتر از RNA بیماران را به هر دو میکروتیوب نام گذاری شده بیمار اضافه کنید.
- ۱۰ میکرولیتر کنترل مثبت به میکروتیوب که برای آن نام گذاری شده است اضافه کنید.
- محتویات میکروتیوب ها را خوب مخلوط کرده و یا Spin کوتاه انجام دهید.

توجه: خلاصه ای از مراحل ساخت مسترمیکس برای یک واکنش

نمونه	پرایمر و پروب	مسترمیکس
10 µl	1 µl	9 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:

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

***توجه:** کانال مربوط به N gene زرد (JOE, VIC, HEX), Orf1b gene سبز (FAM), S gene نارنجی (ROX) و RNase P قرمز (CY5) می باشد.

آنالیز داده ها و گزارش آن ها:

کانال سبز (FAM) اختصاصی ژن Orf1b، زرد (JOE, VIC, HEX) اختصاصی ژن N، نارنجی (ROX) اختصاصی ژن S 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 تأیید می شود. در صورتی که گراف مربوط به هر نمونه طی ۴۵ سیکل واکنش، بصورت S شکل (سگموئیدی) با Ct کمتر یا مساوی ۴۰ ($Ct \leq 40$) باشد مثبت در نظر گرفته می شود و هنگامی که میزان Ct بیشتر از ۴۰ باشد ($Ct \text{ value} > 40$) منفی خوانده می شود.

- کیت rRT-PCR تک مرحله ای چند منظوره AP-RAD دارای کنترل های مثبت، منفی و داخلی SARS-CoV-2 است.

میزان Ct می بایست برای کنترل مثبت ≤ 40 باشد و برای کنترل منفی کاملاً "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 تأیید 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 تائید نکرده و مجدداً تکرار شود.

(جدول شماره ۱)

نام کنترل خارجی	برای نظارت بر	ژن N	ژن S	ژن Orf1b	ژن RNase P	میزان مورد انتظار
کنترل مثبت CoVID-19	عملکرد اجزای معرف نظیر پرایمر و پروبها	+	+	+	+	Ct ≤ 40
کنترل منفی CoVID-19	آلودگی معرف و یا محیط	-	-	-	+	Ct > 40 به جز کنترل 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.

(جدول شماره ۲)

اقدامات	Report	Result Interpretation	CoVID-19 Orf1b-Gene	CoVID-19 N-Gene	CoVID-19 S-Gene	RNase P
گزارش جواب	مثبت	SARS-CoV-2 (Classic) یافت شد	+	+	+	+/-
گزارش جواب	مثبت	SARS-CoV-2 مشکوک به B.1.1.7 یافت شد (کاربرد تحقیقاتی دارد).	+	+	-	+/-
آزمایش را تکرار و یا مجدداً استخراج نمونه و آزمایش را تکرار کنید	غیرقطعی	نتیجه غیرقطعی و غیر قابل گزارش	فقط یکی از سه ژن مثبت است			+
نتیجه را گزارش کنید. آزمایش هایی را برای شناسایی سایر ویروس ها در نظر بگیرید	منفی	SARS-CoV-2 یافت نشد	-	-	-	+
استخراج و آزمایش را تکرار کنید. اگر همچنان نامعتبر شد مجدداً از بیمار نمونه بگیرید.	نامعتبر	نتیجه نامعتبر و غیر 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. البته برخی موارد به دلیل مهار واکنش بواسطه تکثیر در ۳ ژن دیگر، این الگو دیده می شود
 - در صورت افزایش فلورسنت در میکروتیوب NTC (Ct < 40)، 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 ویروس منفی شد برای دیگر ژنهای عفونی پیشنهاد بدهید و در صورت شک بالا به کووید به فاصله کوتاه با نظر پزشک معالج نمونه برداری و آزمایش را تکرار کنید.
 - این کیت قابلیت افتراق B.1.1.7 را داشته، اما ارزش تشخیصی ندارد و کاربرد تحقیقاتی دارد.
- 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، داده های 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:

- تمام اطلاعات بالینی و آزمایشگاهی و اپیدمیولوژیک برای تفسیر باید در نظر گرفته شود، زیرا احتمال آلودگی وجود دارد.
- این کیت برای تشخیص کیفی وجود SARS-CoV-2 RNA در نمونه های تنفسی انسان استفاده می شود. نتایج نشان دهنده میزبان یا Load ویروس در نمونه های اصلی نیستند.
- 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.
- توصیه می شود از منجمد و ذوب کردن کیت بیش از دو مرتبه پرهیز ننمائید.
- پیشنهاد می گردد 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 مجدداً منجمد ننمائید.
- شناسایی ویروس های ذکر شده با کیت چندمنظوره AP-RAD با دستگاه Qiagen 5plex and 6 plex Real-Time PCR و دستگاه ABI تصدیق شده اند. استفاده از سایر دستگاه ها باید تائید شوند.
- محدوده تشخیص (LOD) با اطمینان ۹۴٪ 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 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 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 میکروارگانسیم های موجود در نمونه به علت جمع آوری، انتقال و رسیدگی نادرست، 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:

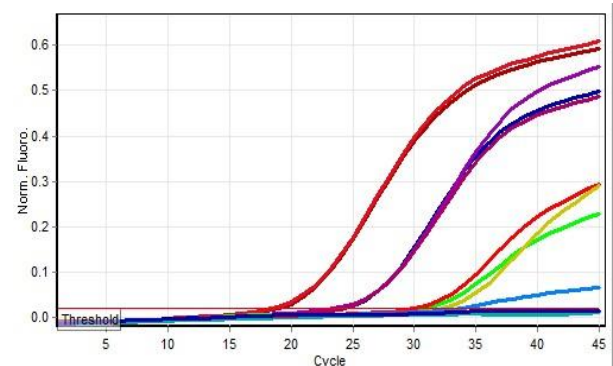
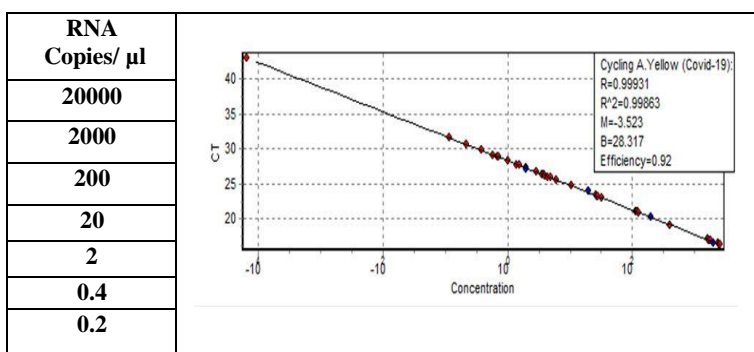
این کیت با کاربرد تحقیقاتی قدر به تشخیص همزمان ژن N، S و Orf1b به عنوان مارکر اختصاصی COVID-19 و ژن RNase P به عنوان کنترل داخلی می باشد. در عین حال با توجه به طراحی پرایمرها و پروب های ژن S که در صورت حذف HV69-70 و مثبت شدن دو ژن N و Orf1b، احتمالاً کرونا ویروس از نوع واریانت B.1.1.7 شناسایی شده است که برای اطمینان از این موضوع توالی یابی ژنوم کرونا ویروس توصیه می شود.

حساسیت آنالیتیکال (محدوده تشخیص (LOD):

آزمایش های حساسیت آنالیتیکال (محدوده تشخیص یا LOD) که برای تعیین کمترین غلظت SARS-CoV-2 انجام شده است، تقریباً ۹۵٪ از تمام replicates ها مثبت (مثبت حقیقی) شد. به این منظور ابتدا با استفاده از نمونه RNA با کپی مشخص، رقت های مختلف تهیه و حد تشخیص (LOD) ویروس محاسبه گشت. طی این روش محدوده تشخیص اولیه محاسبه شده کیت برای اندازه گیری ژن های S، N و Orf1b متعلق به SARS-CoV-2 به میزان ۰.۲ کپی در میکرولیتر می باشد. جهت ارائه LOD نهایی، تست غلظت های تعیین شده به عنوان LOD اولیه را ۲۰ مرتبه تکرار کرده و برای ژن N با گزارش ۱۹ مورد مثبت و ۱ مورد منفی کاذب، برای ژن S ۱۹ مورد مثبت و ۱ مورد منفی کاذب و برای ژن Orf1b ۱۹ مورد مثبت و ۱ مورد منفی کاذب بدست آمد این غلظت به عنوان LOD نهایی تعیین می گردد. بنابراین کیت حتی در بیماران که غلظت ویروس نام برده پایین است نیز از حساسیت خوبی برخوردار است.

Orf1b Gene		S Gene		N Gene		SARS-CoV-2
منفی کاذب	مثبت	منفی کاذب	مثبت	منفی کاذب	مثبت	
۱	۱۹	۱	۱۹	۱	۱۹	حساسیت آنالیتیکال
٪ ۹۵		٪ ۹۵		٪ ۹۵		

نتایج منحنی استاندارد و گراف مربوط به حساسیت آنالیتیکال:



حد آستانه مثبت:

با توجه به مطالعه مقدار مرجع، Ct مرجع برای ژن های مورد هدف کمتر از ۴۰ مثبت و ژن کنترل داخلی این کیت معمولاً Ct بین ۲۰ الی ۳۰ دارد

اختصاصیت آنالیتیکال:

این کیت منحصراً قادر به شناسایی ژن های S، N و Orf1b متعلق به SARS-CoV-2 می باشد. پرایمرها و پروب ها به گونه ای طراحی شده اند که با ویروس های بیماری زای دیگر هیچگونه واکنش متقاطع نداشته باشند. به منظور تأیید اختصاصیت کیت rRT-PCR تک مرحله ای چند منظوره شرکت پژوهش و توسعه امیرپویوند، اختصاصیت کیت به دو روش آنالیز آزمایشگاهی (WET) و آنالیز بیوانفورماتیک (In-Silico PCR) مورد ارزیابی قرار گرفت.

نکته: برای میکروارگانسیم‌های باکتریایی غلظت استفاده شده 10^6 CFU/ml می‌باشد و با توجه به عدم دسترسی به تمام میکروارگانسیم‌های باکتریایی با غلظت مشخص (CFU/ml) و میکروارگانسیم‌های ویروسی با غلظت مشخص (PFU/ml)، از کیت حاضر با نمونه‌هایی با Ct بین ۲۰-۳۵ و مورد تایید آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند استفاده شده است. سایر میکروارگانسیم‌ها 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.

میکروارگانسیم‌های یاد شده عبارتند از: Adenovirus, Enterovirus, RSV, VZV, HSV-I, HSV-II, CMV, Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae, Human parainfluenza virus I, Human parainfluenza virus 4b, Human parainfluenza virus 4a, Adenoviridae, Alphaherpesvirus I, Legionella, Haemophilus influenzae, Chlamydia pneumoniae, Rice stripe tenuivirus, Influenza B virus, Influenza A virus, Human parainfluenza virus 4b, virus 4a, Pneumocystis, Mycoplasma, Human alphaherpesvirus III, Streptococcaceae, Mycobacterium tuberculosis, pneumoniae, و Cucumber mosaic virus.

دقت:

ضریب تغییرات (CV%) کمیت Ct در یک run کاری دارای دقت کمتر از ۵٪ است.

مطالعات بالینی:

عملکرد بالینی کیت RT-PCR یک مرحله‌ای چندمنظوره کیفی شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند برای ویروس SARS-CoV-2 با استفاده از نمونه‌های بالینی مثبت و منفی مورد تأیید، ارزیابی شد. به این منظور ۲۰ نمونه منفی و ۵۶ نمونه مثبت SARS-CoV-2 مورد آزمایش قرار گرفت و ۸ نمونه مثبت واریانت B.1.1.7 (کاربرد تحقیقاتی) نیز برای تایید نهایی با روش توالی‌یابی سکانس گردید. نتیجه ارزیابی ژن‌های N, Orf1b و S در جداول زیر آورده شده است.

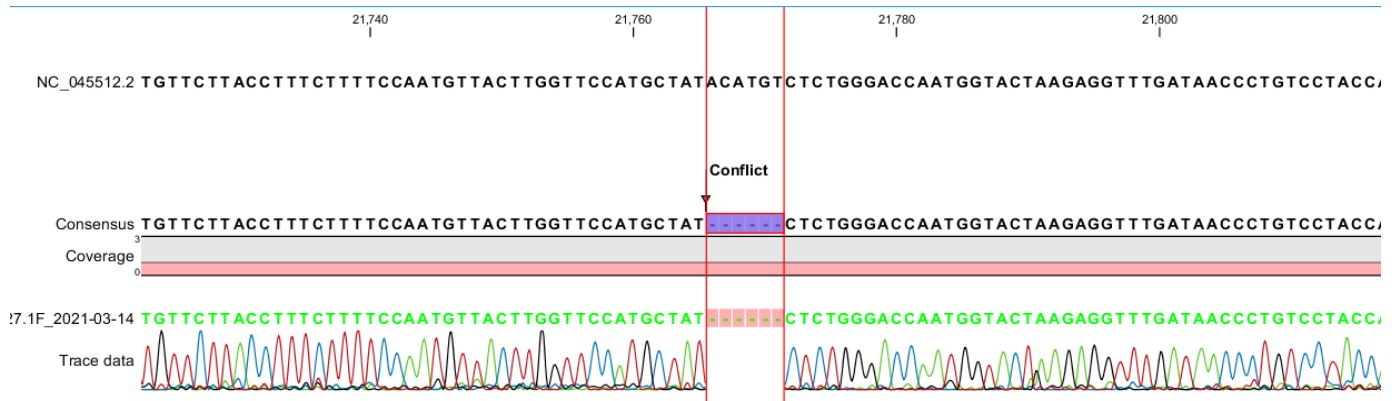
Classic Coronavirus

		روش مرجع Sansure Biotech	
		مثبت	منفی
CoVID-19 Dropout Multiplex One Step RT-PCR Kit (Triple Genes)	مثبت	۲۶	۰
	منفی	۰	۲۰

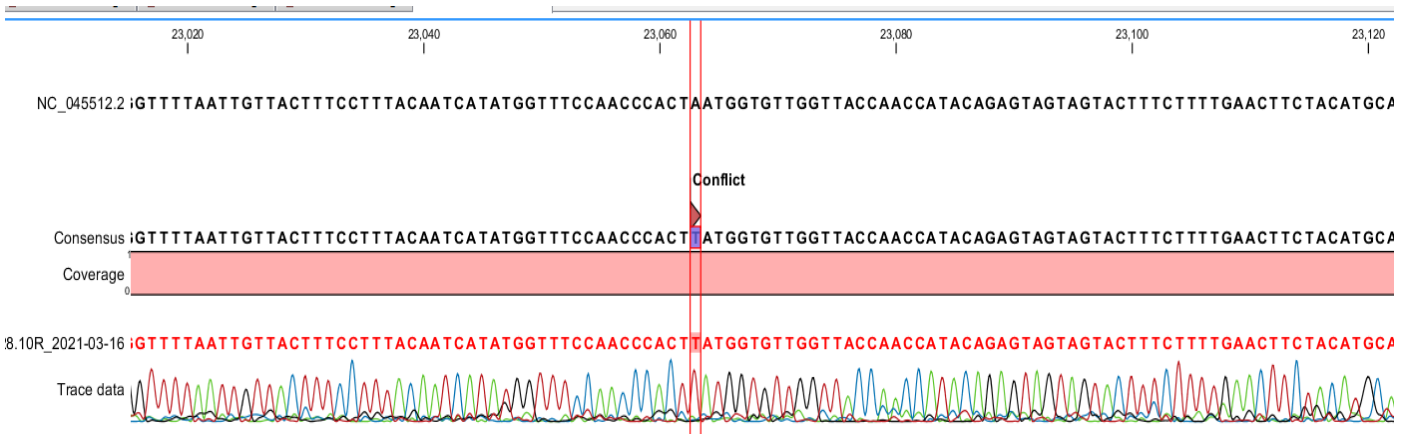
Variant Coronavirus (B.1.1.7)

		روش مرجع ارزیابی با کمک توالی‌یابی (Sequencing)	
		مثبت	منفی
CoVID-19 Dropout Multiplex One Step RT-PCR Kit (Triple Genes)	مثبت	۸	۰
	منفی	۰	۲

نمونه ای از گراف دو موتاسیون مربوط به توالی یابی ژن S با واریانت S Gene (B.1.1.7)



c.21767-72 del p.HV69-70 del



c.23063 A>T p.N501Y

کنترل کیفیت:

در این آزمایش (RNase P (Ribonuclease P) به عنوان کنترل داخلی یا ژن رفرنس در همان میکروتیوب عمل خواهد کرد و باید در تمامی میکروتیوب ها 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 آزمایش 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. با زباله های با منشأ انسانی به ویژه لوله های VTM به دلیل احتمال حضور میکروارگانیسم های پاتوژنیک انواع مختلفی از ویروس ها نظیر SARS-CoV-2 و ... باید همانند زباله های زیستی برخورد شود. ابتدا اتوکلاو شوند سپس با احتیاط دفع 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.; Bokharai, 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
	شماره رفرنس
	تاریخ تولید
	تاریخ انقضا
	مطالعه بروشور
	استفاده در موارد تشخیصی و بالینی
	شرایط نگهداری
	آدرس شرکت
	دور از تابش آفتاب

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