

راهنمای کیت تشخیص کیفی Covid-19

مورد استفاده: این کیت جهت تشخیص کیفی مولکولی ویروس SARS-COV-2 به روش Real – time PCR و به صورت تک مرحله ای توسعه یافته است. نتایج این کیت نباید به تنهایی و بدون در نظر گرفتن علائم بالینی برای تشخیص بیماری کرونا در افراد مشکوک استفاده شود.

اصول روش کار: در این کیت برای تشخیص بیماری COVID 19 از دو ژن اختصاصی بنام های *RdRp* و *S gene* استفاده میشود که میتوانند بصورت همزمان در یک واکنش (بصورت Multiplex) بترتیب با فلوروکروم های FAM و ROX شناسایی گردند. همچنین برای تست کیفیت RNA استخراج شده و سنجش دقت تکسین، از ژن کنترل داخلی *RNase P* با گزارشگر JOE استفاده شده است.

محتویات کیت: (برای 100 تست)

محتویات	مقدار
مستر میکس	900 میکرولیتر
پرایمر پروب میکس (لیوفیلیزه)	1 ویال
آب عاری از نوکلئاز	200 میکرولیتر
نمونه کنترل مثبت	50 میکرولیتر

شرایط نگهداری:

- مدت زمان مفید استفاده از این کیت 12 ماه بوده و تاریخ انقضا بر روی کیت درج شده است.
- از ذوب و فریز کردن بیش از حد مستر میکس خودداری شود.
- جهت نگهداری طولانی مدت، دمای °C 15- تا °C 20- نیاز می باشد.
- مستر میکس به هیچ وجه نباید در معرض نور مستقیم آفتاب قرار گیرد.

دستگاه های سازگار با کیت:

این کیت در کلیه دستگاه های Real Time PCR سه کاناله و بالاتر که قابلیت تشخیص رنگ های سبز، زرد و نارنجی (با فلوروکروم های مربوطه) را دارا می باشند، قابل استفاده است.

مشخصات نمونه:

الف) نمونه های نازو فارنکس و اورو فارانکس میتواند مورد استفاده قرار گیرد.
ب) شرایط نمونه گیری: جمع آوری بر اساس پروتکل های وزارت بهداشت صورت گیرد.

ج) نگهداری و انتقال نمونه: نمونه دریافت شده بهتر است بلافاصله برای آزمایش مورد استفاده قرار گیرد. در غیر اینصورت نگهداری به مدت دو ماه در دمای °C 18- تا °C 20- و برای زمان طولانی مدت در دمای °C 70- تا °C 80- پیشنهاد میگردد. از ذوب شدن و فریز شدن مکرر جلوگیری شود. نمونه ها در زمان ارسال به آزمایشگاه باید در محفظه بسته و با حفظ زنجیره سرد انتقال داده شوند.

آماده سازی پیش از آزمایش:

با توجه به دستورالعمل کیت استخراج اسید نوکلئیک و بررسی انتخاب شده، RNA ویروس را به عنوان الگو از نمونه استخراج کنید.
تمامی کیت های استخراج دارای مجوز از اداره تجهیزات پزشکی جهت استخراج RNA الگو مناسب می باشد.
از RNA استخراج شده می توان مستقیماً برای آزمایش PCR استفاده کرد. در غیر این صورت RNA استخراج شده در دمای °C 70- تا °C 80- نگهداری شود. دقت گردد از ذوب و فریز شدن متوالی الگو خودداری شود.

آماده سازی مخلوط واکنش:

در ابتدا جهت تهیه میکس پرایمر پروب مقدار 100 میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز به ویال پرایمر- پروب اضافه کرده و به خوبی پایت شود.
مخلوط آزمایش جهت انجام هر واکنش 20 میکرولیتری باید مطابق جدول زیر آماده گردد.

مستر میکس	میکس پرایمر پروب	میزان الگو	حجم نهایی (μL)
9	1	10 RNA استخراج شده	20
9	1	10 کنترل مثبت	20
9	1	10 RNase Free Water	20

- مستر میکس حتماً قبل از استفاده به خوبی پایت شود.
- حتماً در هر بار استفاده از کیت، کنترل منفی و مثبت در نظر گرفته شود.

انجام واکنش ریل تایم PCR:

الف) تیوب ها را داخل دستگاه Thermal Cycler قرار دهید. نام هر نمونه، (نمونه مورد آزمایش، کنترل های مثبت و منفی) را وارد نمایید.
ب) کانال های FAM (*RdRP*) و ROX (*S gene*) را برای تشخیص ویروس کووید-19 روشن کنید. کانال JOE را برای تشخیص کنترل داخلی تنظیم کنید.
ج) در صورت استفاده از دستگاه های ABI و مشابه ، حتماً تنظیمات *passive reference* بر روی NONE قرار داده شود.
د) شرایط پیشنهادی انجام آزمایش طبق جدول زیر می باشد:

مرحله	زمان	دما	تعداد سیکل
سنتر cDNA	20 min	50°C	1
فعالسازی آنزیم	3 min	95 °C	1
Denaturation	3 S	95 °C	40
اتصال آغازگر	20 S	55 °C	
گسترش و اندازه گیری	20S	60 °C	

ه) پس از ذخیره کردن تنظیمات، برنامه واکنش را راه اندازی نمایید

تحلیل نتایج:

کنترل منفی کیت، نباید در هیچ یک از کانال های FAM، ROX و JOE ، CT نشان دهد.

در نمونه کنترل مثبت، CT ژن های اختصاصی و کنترل داخلی کمتر از 35 است.

حد آستانه مثبت:

با توجه به بررسی های صورت گرفته، CT مرجع برای ژنهای هدف مقدار ≥ 39 و برای ژن کنترل داخلی کیت > 35 می باشد.

نتیجه	<i>RNaseP</i>	<i>RdRp</i>	<i>S gene</i>
مثبت	+	+	+
منفی	+	-	-
آزمایش تکرار شود (*)	+	+	-
آزمایش تکرار شود (*)	+	-	+
استخراج مجدد	-	-	-

آنالیز نتایج:

در صورتیکه، کانال JOE، CT بالاتر از 35 را نشان دهد، احتمالاً غلظت نمونه مورد آزمایش پایین بوده و یا یک عامل محدودکننده در انجام واکنش دخیل است. در این صورت لازم است کاربر آزمایش را تکرار کند. در نمونه های کنترل منفی، کنترل داخلی باید مثبت باشد. در غیر اینصورت نتایج قابل اطمینان نیست و آزمایش باید تکرار گردد. * در صورت مشاهده نتیجه مثبت تنها در یکی از کانال های FAM و ROX، پیشنهاد میشود این آزمایش تکرار شود و در صورت نیاز همراه با مستندات بالینی تفسیر گردد.

محدودیت های روش تشخیص:

تشخیص RNA ویروسی مستقیماً نشان دهنده حضور عفونت ویروسی نمی باشد. بنابراین این کیت نباید به تنهایی و بدون در نظر گرفتن علائم بالینی برای تشخیص بیماری کرونا در افراد مشکوک استفاده شود. نتایج منفی کاذب ممکن است در نتیجه نمونه گیری و یا حمل و نگهداری نامناسب و نهایتاً تخریب RNA ویروسی اتفاق افتاده باشد. نتیجه مثبت کاذب ممکن است حاصل آلودگی های محیطی باشد.

عملکرد محصول:

اختصاصیت: بدلیل طراحی آغازگرهای کاملاً اختصاصی برای ژنهای هدف ویروس SARS-COV-2، این کیت دارای اختصاصیت بسیار بالایی می باشد. این کیت به روش *in Silico* کاملاً بررسی گردیده و هیچ واکنش متقاطع با دیگر ویروس های خانواده کرونا، آنفولانزای A و B، *Adenovirus*، *Parainfluenza*، *Staphylococcus Aureus*، *Pseudomonas Aeruginosa* و *Chlamydia pneumonia* ندارد.

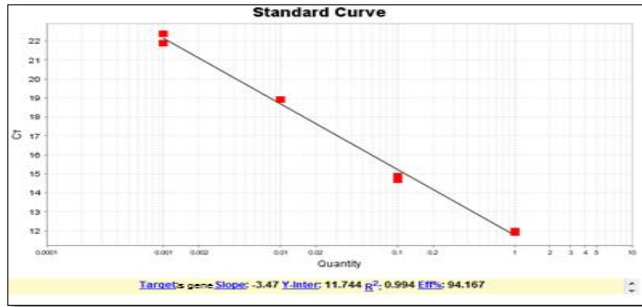
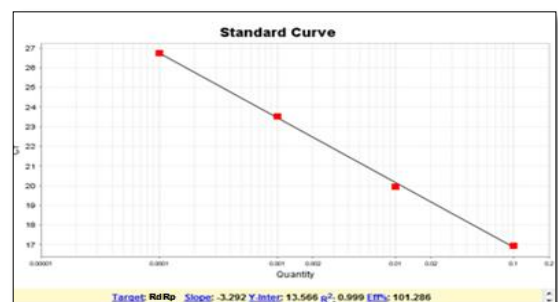
حساسیت: نتایج حاصل از آزمایش در غلظتهای مختلف، نشان میدهد که حساسیت محصول 5 کپی در هر واکنش می باشد.

خطرات و پیشگیری ها:

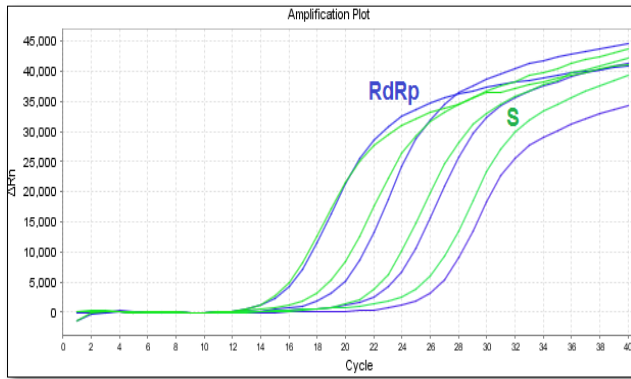
این محصول تنها در شرایط *in Vitro* مورد استفاده قرار گیرد. پرسنل آزمایشگاه باید آموزش دیده باشند و کنترل کیفی برای هر آزمایش انجام شود. تمام وسایل پیش از استفاده، استریل شده باشند. تمام وسایل و امکانات نیز باید به هر مرحله آزمایش به صورت مجزا اختصاص داده شده و قابل انتقال به بخش دیگر نباشند. در هنگام انجام آزمایش، از روپوش آزمایشگاهی، گان، عینک و دستکش استفاده شود. دستکش ها مرتباً تعویض گردد تا از ایجاد آلودگی های مهارکننده در روند آزمایش جلوگیری شود. آزمایش های بالینی مربوط به نمونه های با احتمال عفونی باید در زیرهود لامینار کلاس 2 انجام شود.

گزارش ارزیابی فنی کیت QuickCOVID:

1- منحنی استاندارد



2- منحنی تکثیر:



بازدهی واکنش (Efficiency) به صورت میانگین برای پرایمرهای دو ژن *RdRp* و *Spike*، 97/5 درصد می باشد. (درصد مجاز 90-110 درصد می باشد). ضریب همبستگی واکنش (R^2)، 0/999 می باشد. (میزان مجاز 0/999)

علائم اختصاری موجود در لیبل ها:

REF	شماره کاتالوگ		تاریخ تولید
LOT	لات نامبر		تاریخ انقضا
	تعداد تست		دمای نگهداری
IVD	صرفاً جهت تشخیص آزمایشگاهی		

منابع:

<https://www.who.int>

جهت کسب اطلاعات بیشتر و یا بروز هرگونه مشکل با شرکت دانش بنیان توپاز ژن کاوش به شماره تماس 026-34764067 و یا از طریق سایت www.topazgene.com با ما در ارتباط باشید.