کیت rRT-PCR تک مرحله ای چند منظوره CoVID-19

Ref: APCOVA (In Vitro Diagnostic, IVD)

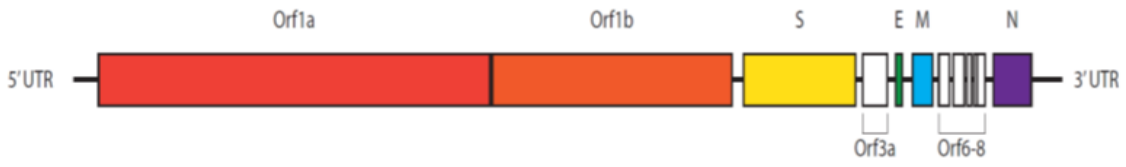
مقدمه:

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 هوبای کشور چین کشف شد و در ماه های ابتدایی سال ۲۰۲۰ منجر به همه گیر شدن عفونت دستگاه تنفسی گردید. کروناویروس ها، بزرگترین خانواده ویروسی RNA دار تک رشته اند که positive-sense بوده و دارای پوشش یا envelope می باشند. ویریون آن‌ها اکثراً کروی است و زوائد گلیکوپروتئینی (S) در پوشش ویروس قرار دارد. سایر پروتئین‌های 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 آنفلوانزا بروز می کند. افرادی که به COVID-19 مبتلا شده اند طیف گسترده‌ای 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. کیت rRT-PCR یک مرحله ای چند منظوره CoVID-19 به منظور شناسایی کیفی ویروس SARS-CoV-2 که عامل ایجاد کننده بیماری CoVID-19 می باشد در شرکت پژوهش و توسعه امیر پیوند (AP-RAD) تولید شده است.

اصول انجام آزمایش:

روش اصلی تشخیص بیماری COVID-19 بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس به روش مولکولی (RT-PCR) است. ابتدا RNA از نمونه ها استخراج می شود، سپس از روی آن رشته های مکمل DNA یا همان cDNA رونویسی می‌شود و به دنبال آن، بخش های خاصی از cDNA با استفاده از تکنیک PCR تکثیر می شوند. در آزمایش rRT-PCR چند منظوره از پروب های فلوروژنیک مبتنی بر TaqMan استفاده می شود که با استفاده از فعالیت نوکلئازی ′۵ Taq DNA polymerase هنگامی که در چرخه‌های PCR عمل می‌کند قادر به شناسایی محصولات اختصاصی می‌گردد. کیت rRT-PCR یک مرحله ای چند منظوره CoVID-19 شرکت AP-RAD از پرایمر و پروب های اختصاصی در یک ویال که دارای دو مارکر اختصاصی N (ژن پروتئین نوکلئوکپسید) و ژن Replicase Open Reading Frame (ORF) 1b است استفاده می‌کند که برای بررسی استخراج و ارزیابی آزمایش به صورت موازی با RNase P (Ribonuclease P) به عنوان کنترل داخلی، مورد سنجش قرار می گیرد. لیبل پروب هایN زرد (HEX یا VICیا JOE)، Orf1b سبز (FAM) و Rnase P قرمز (CY5) یا نارنجی(ROX) می‌باشد.

توجه: براساس کانال های موجود در دستگاه مورد استفاده و به سفارش کاربر، لیبل پروب کنترل داخلی می تواند (قرمز) CY5 یا (نارنجی) ROX باشد. (نوع لیبل پروب Rnase P بر روی بر چسب ویال پرایمر پروب مشخص شده است.)



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

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

محتویات کیت:

محتویات این کیت برای ۱۰۰ تست با حجم ۲۰ µl می باشد.

ردیف	محتویات	حجم	شرایط نگهداری
۱	ویال مسترمیکس آماده استفاده	۹۰۰ µl	۲۰- °C ≥
۲	ویال پرایمر-پروب آماده استفاده	۱۰۰ µl	۲۰- °C ≥
۳	کنترل منفی	۱۰۰ µl	۲۰- °C ≥
۴	کنترل مثبت	۱۰۰ 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 Mic، و Roche با کانال سبز (FAM)، قرمز (CY5) و زرد (HEX یا VIC یا JOE) و دستگاه های ABI Step One و ABI Step One Plus با کانال سبز (FAM)، نارنجی (ROX) و زرد (HEX یا VIC یا JOE).
- هود ایمنی زیستی کلاس II
- سمپلر در حجم های (۱۰۰۰-۱۰۰µl، ۱۰۰-۱۰µl، ۱۰-۰,۵µl)
- 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 کیت۱۲ماه 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 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 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 تکنیک RT-PCR لازم است جهت جلوگیری از بروز نتایج مثبت کاذب از عدم آلودگی محیط کار، 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 روپوش آزمایشگاه 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.

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 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 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.
- 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، مولکول های 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. ۹ میکرولیتر مسترمیکس - آنزیم و ۱ میکرولیتر پرایمر- پروب 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 بیمار 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 و یا Spin کوتاه انجام دهید.

توجه : خلاصه ای از مراحل ساخت مسترمیکس برای یک واکنش

مسترمیکس	پرایمرو پروب	نمونه
۹µl	۱µl	۱۰µl

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
رونویسی معکوس (RT)	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:** در دستگاه های Rotor-Gene Q 5plex Platform, Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform, Rotor-Gene Q 6plex Platform of Qiagen , Mic و Roche برای N Gene از کانال (HEX یا VIC یا JOE)، Orf1b Gene کانال FAM و برای ژن کنترل داخلی (RNase P) از کانال CY5 استفاده نمائید و در دستگاه ABI از کانال ROX برای ژن کنترل داخلی (RNase P) که لیبل آن ROX می باشد استفاده گردد. نوع لیبل پروب کنترل داخلی (RNase P) بر روی بر چسب ویال پرایمر پروب مشخص شده است.

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

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 Orf1b، زرد (JOE, VIC, HEX) اختصاصی ژن N , قرمز (CY5) یا نارنجی (ROX) 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 می‌شود و هنگامی که میزان Ct بیشتر از ۴۰ باشد (Ct 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 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	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	–	–	+	به جز Ct > 40 کنترل داخلی
فاقد الگو(NTC)	آلودگی معرف و یا محیط	–	–	–	Ct > 40

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
021-26422362
co.ap-rad.com
order@co.ap-rad.com

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)

RNase P	CoVID-19 N-Gene	CoVID-19 Orf1b-Gene	Result Interpretation	Report	اقدامات
±*	+	+	SARS-CoV-2یافت شد	مثبت	گزارش جواب
+	فقط یکی از دو ژن مثبت است		نتیجه غیرقطعی و غیر قابل گزارش	غیرقطعی	آزمایش را تکرار و یا مجددا استخراج را انجام داده و آزمایش را تکرار کنید
+	-	-	SARS-CoV-2 یافت نشد	منفی	نتیجه را گزارش کنید. آزمایش هایی را برای شناسایی سایر ویروس ها در نظر بگیرید
-	-	-	نتیجه نامعتبر وغیر قابل گزارش	نامعتبر	استخراج و آزمایش را تکرار کنید. اگر همچنان نامعتبر شد مجددا از بیمار نمونه بگیرید.

- 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 دو ژن منفی شد برای دیگر ژن های عفونی پیشنهاد بدهید.

*** در موارد مثبت ژن های ویروسی بخصوص در مواردی با میزان ویروس بالا (Ct پایین) ممکن است به دلیل رقابت *Rnase P* منفی گردد و یا Rise کمتری داشته باشد.**

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 در نمونه های تنفسی انسان استفاده می شود. نتایج نشان دهنده‌ی 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 AP-RAD با Qiagen 5plex and 6Plex دستگاه Real-Time PCR ، دستگاه ABI مدل Step-On و Step One Plus و Mic تصدیق شده اند. استفاده از سایر دستگاه ها باید تائید شوند.

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 را مورد هدف قرار می دهند. بروز جهش در این 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. آزمایشگاه ها 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:

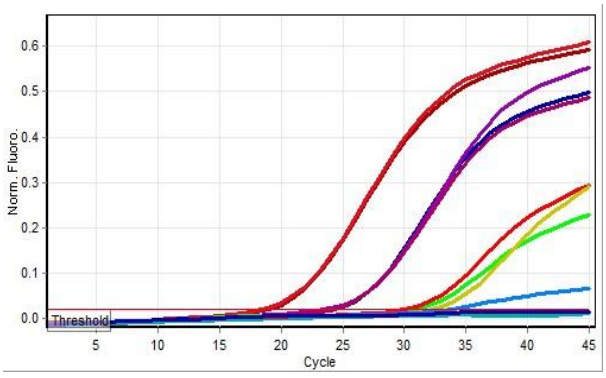
این کیت قادر به تشخیص همزمان ژن N و Orf1b به عنوان مارکر اختصاصی CoVID-19 و ژن RNase P به عنوان کنترل داخلی می باشد.

حساسیت آنالیتیکال محدوده تشخیص (LOD):

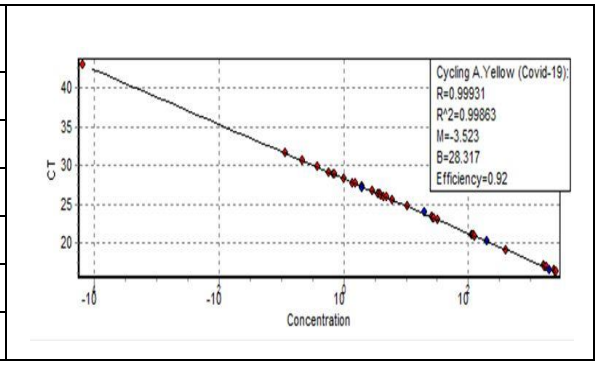
در آزمایش های حساسیت آنالیتیکال (محدوده تشخیص یا LOD) که برای تعیین کمترین غلظت SARS-CoV-2 انجام شده است، تقریبا ۹۵٪ از تمام replicates ها مثبت (مثبت حقیقی) شد. به این منظور ابتدا با استفاده از نمونه RNA با کپی مشخص، رقت‌های مختلف تهیه و حد تشخیص (LOD) ویروس محاسبه گشت. طی این روش محدوده تشخیص اولیه محاسبه شده کیت برای اندازه گیری ژن های N و Orf1b متعلق به SARS-CoV-2 به میزان ۰.۴ 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 ۲۰ مورد مثبت و برای ژن Orf1b ۱۹ مورد مثبت و ۱مورد منفی کاذب بدست آمد این غلظت به عنوان LOD نهایی تعیین می گردد. بنابراین کیت حتی در بیمارانی که غلظت ویروس نام برده پایین است نیز از حساسیت خوبی برخوردار است.

SARS-CoV-2	N Gene		Orf1b Gene	
	مثبت	منفی کاذب	مثبت	منفی کاذب
	۲۰	۰	۱۹	۱
حساسیت آنالتیکال	٪ ۱۰۰		٪ ۹۵	

نتایج منحنی استاندارد و گراف مربوط به حساسیت آنالتیکال:



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 و Orf1b متعلق به SARS-CoV-2 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، Human parainfluenza virus 4a، Human parainfluenza virus 4b، Human Influenza A virus، Influenza B virus، Rice stripe tenuvirus، Chlamydia pneumoniae، Haemophilus influenza، Legionella pneumoniae، Mycobacterium tuberculosis، Streptococcaceae، Human alphaherpevirus III، Mycoplasma، Pneumocystis و Cucumber mosaic virus.

دقت:

ضریب تغییرات (CV%) کمیت Ct 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 با استفاده از نمونه های بالینی مثبت و منفی مورد تائید ارزیابی شد. به این منظور ۳۰ نمونه منفی و ۳۰ نمونه مثبت مورد آزمایش قرار گرفت. نتیجه ارزیابی هر یک از ژن های N و Orf1b به شرح جداول ذیل می‌باشد.

N gene

		روش مرجع	
		مثبت	منفی
کیت rRT-PCR تک مرحله‌ای چند منظوره CoVID-19	مثبت	۳۰	۰
	منفی	۰	۳۰

حساسیت: ۱۰۰٪

اختصاصیت: ۱۰۰٪

Orf1b gene

		روش مرجع	
		مثبت	منفی
کیت rRT-PCR تک مرحله‌ای چند منظوره CoVID-19	مثبت	۳۰	۰
	منفی	۰	۳۰

حساسیت: ۱۰۰٪

اختصاصیت: ۱۰۰٪

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. عمدتا 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 منشاء 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.; 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 ۰۲۱-۲۶۴۲۲۹۴۰ تماس بگیرید.

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

021-26422362

co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com