هانا ژن
www.hanagene.com

smarttect

SARS-CoV-2, Flu A, and Flu B Multiplex RT-qPCR Kit

Ref Number:HG-MCF-203 | **1×100 tests/ kit**

❖ مقدمه:

کیت تشخیصی مالتیپلکس ریل تایم آنفلوانزای A ، B و کـــرونا ویـــروس جـــدید (عامـــل COVID 19) به روش Real-timePCR (RT-qPCR) ، به منظور تشخیص افتراقی ویروسهای SARS-CoV-2 ، آنفلوانزا A و آنفـــلوانزا B و یک کنترل داخلی اندوژن، در نمونه های سواب اروفارنژیال، سواب نازوفارنژیال در چهار کانال فلئورسانس سبز، زرد، نارنـجی و قرمز در دستگاه Real-time cycler استفاده می شود.

❖ اساس روش :

تشخیص بوسیله کیت مالتیپلکس ریل تایم آنفلوانزای A,B و کرونا ویروس جدید بصورت تشـخیص کیفی عامل COVID19 ، آنفلوانزا Aو آنفلوانزا B به روش Probe based Reverse-transcription یاReal-timePCR (RT-qPCR)انجام می شود. این واکنش بصورت یک Multiplex TaqMan Assay می باشد که با بهره گیری از چهار رنگ فلوروسانس مختلف قادر به تمایز محصـول حاصل از تکثیر سه ویروس مذکور و یک ژن کنترل داخلی میباشد. در این تســت سیگنال اختصـــاصی ویروس SARS-CoV-2 در کانالهای نارنجی و سبز، ویروسهای آنفلوانزا A و آنفلوانزا B در کانال زرد و کنترل داخلی اندوژن در کانال قرمز قرائت می شـوند. لازم به ذکر اسـت که برای تشـخیص ویروس SARS-CoV2، توالیهای الیگونوکلئوتیدی برای ژنهای N و RdRp این ویروس و برای آنفلوانزا A ژن M2 و آنفلوانزا B ژن NP طراحی شده اند. به علت توان قرائت چهار رنگی اکثر دستگاه های Real-time cycler، پروب های اختصـــاصی هر دو نوع انفلوانزا با یک رنگ (HEX/JOE/VIC)، لیبل شده اند.

❖ **آماده سـازی نمونه:** ماده ژنتیکی ویروس که بعنوان الگو در واکنش RT-Real Time PCR مورد اسـتفاده قرار می گیرد را با استفاده از کیتهای ستونی و یا مگنتیک استخراج RNA ویروسی که مورد تایید آزمایشـگاه مرجع سلامت و اداره کل تجهیزات پزشکی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی می باشد استخراج و تخلیص نمایید.

❖ محتویات کیت:

محتویات کیت به شرح جدول ذیل می باشد.

نام محلول	رنگ لیبل	تعداد ویال در کیت ۹۶ تستی	حجم (میکرولیتر)
qPCR Mix	آبی	۱	۱۱۰۰
Enzyme Mix	سبز	۱	۱۰۰
Positive Control	قرمز	۱	۱۰۰
Negative Control	زرد	۱	۱۰۰

❋شرایط نگهداری:

۱.این کیت می بایست در C° ۱۵- تا C° ۲۵- نگهداری شود.

۲.مدت زمان استفاده این کیت ۱۲ ماه بوده که تاریخ انقضاء بر روی کیت درج گردیده است.

۳.در حین مراحل حمل و نقل، کیت را می بایست در کنار یخ خشک یا Ice pack حمل نمود و بلافاصله پس از دریافت کیت در دمای C°۱۵- تا C° ۲۵- نگهداری شوند.

* نکات:

۱. محلول‌های هر کیت را در واکنش‌های مجزا استفاده نمایید و محتویات کیت ها با لات نامبر متفاوت را میکس ننمایید.

۲. از استفاده کیت بعد از اتمام تاریخ انقضاء خودداری کنید.

❋دستگاه های Real-time cycler:

دستگاههای Real-time Cycler مورد نیاز برای بکار گیری کیت، باید دارای چهار کانال رنگی مجزا باتوانایی قرائت سیگنالهای فلئورسانس در طیف های سبز، زرد، نارنجی و قرمز باشد. این کیت بر روی دستگاه های Rotor-Gene Q (Qiagen، المان)، LightCycler®96 (Roche، المان) و MIC (Bio Molecular Systems، استرالیا) مورد ارزیابی و تایید قرار گرفته است.

❋سایر مواد و وسایل مورد نیاز:

- کیت استخراج RNA
- PCR workstation و BSLII biosafety cabinet
- سانتریفیوژ رو میزی
- سمپلرهای متغیر در محدوده های ظرفیتی مختلف
- سر سمپلرهای فیلتر دار RNase/DNase Free در محدوده های مختلف
- میکروتیوب/پلیت/استریپ های مخصوص دستگاه Real-time cycler
- میکروتیوب های ۱/۵ میلیلیتری RNase/DNase Free
- دستکش بدون پودر استریل

❖ اقدامات احتیاطی :

نکته مهم: استفاده از این محصول تنها برای افراد آموزش دیده برای کار در آزمایشگاه تشخیص مولکولی مجاز می‌باشد.

۱. این کیت تنها برای in Vitro Diagnosis می باشد. الزاماً قبل از استفاده دستورالعمل کیت را با دقت مطالعه فرمایید.

۲. از روپوش مخصوص و دستکش لاتکس بدون پودر در هنگام انجام کلیه فرایندها استفاده شود. و در مرحله PreAnalytic عینک محافظ، گان یک تکه، ماسک N95 استفاده شود.

۳. در کلیه مراحل کار اعم از استخراج و یا انجامRT-qPCR، آزمایش از نوک سمپلرهای فیلتر دار عاری از DNase و RNase استفاده شود.

۴. اصول ایمنی زیستی مربوطه جهت کار در قسمت Pre-PCR رعایت شود.

۵. کلیه نمونه‌های عفونی و نیز مواد شیمیایی بر اساس دستورالعمل دفع پسماند آزمایشگاه حاضر، دفع گردند.

۶. در صورت پاشیدن مواد و یا معرفها بر روی سطوح، با استفاده از محلول‌های دیسنفکت همچون هیپوکلریت ۰/۵ درصد گند زدایی گردند.

۷. از تماس پوست، چشم و غشاء مخاطی با نمونه‌ها و معرفها جداً پرهیز شود و در صورت رخ دادن تصادفی چنین اتفاقی، محل مربوطه را با مقادیر فراوان آب شستشو داده و بلافاصله اقدامات پزشکی مورد نیاز را دنبال نمایید.

❖ دستورالعمل استفاده:

○ شرایط نمونه های مورد نیاز

نمونه مورد نیاز برای این آزمایش، نمونه های تنفسی شامل: سوابهای اروفارنژیال/ نازوفارنژیال (در محیط VTM) می باشد. نمونه های اخـذ شده را میتوان تا ۲۴ ساعت در ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

نمونه می بایست در زمانی کمتر از ۱۲ ساعت از نمونه گیری به آزمایشگاه ارجاع شود. برای مدت زمان طولانی تر نمونه ها باید در ۲۰- تا ۸۰- درجه سانتیگراد فریز شوند و در حالت فریز شده به آزمایشگاه انتقال یابند.

○ دستورالعمل نمونه برداری نازوفارنژیال (Nasopharyngeal swab)

ابتدا سوآب را به آرامی وارد بینی کرده تا به سطح نازوفارنکس خلفی برسید. سوآب را به مدت ۲-۳ ثانیه در جای خود بگذارید و سپس به مدت ۱۰-۱۵ ثانیه کاملا دور خود بچرخانید. پس از اتمام بلافاصله سوآب را داخل محلول VTM قرار دهید. اطمینان حاصل کنید سوآب کاملا داخل محلول غوطه ور باشد.

○ دستورالعمل نمونه برداری اروفارنژیال (Oropharyngeal swab)

سوآب را در ناحیه خلفی حلق و نواحی لوزه قرار دهید. سوآب را روی هر دو ستون لوزه و ناحیه خلفی حلق بمالید (از لمس دندان ها ، زبان و لثه خودداری کنید). سپس سوآب را بلافاصله داخل محلول VTM منتقل کنید.

○ آماده سازی مواد و انجام تست RT-qPCR

یک ست از مواد مورد نیاز را از فریزر خارج نموده و پس از ذوب کردن بوسیله ورتکس، مخلوط و سپس بطور مختصر سانتریفیوژ نمایید.

مخلوط واکنش (Reaction Mix) را بصورت زیر تهیه کنید:

○ به منظور تهیه مخلوط اصلی واکنش (MasterMix) به ازای هرنمونه، مقدار ۱۱ میکرولیتر از qPCR Mix و ۱ میکرولیتر از Enzyme Mix را به یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری RNase/DNase free بیافزایید. سپس محتویات تیوب را بمدت ۳ تا ۵ ثانیه ورتکس نموده و سپس بطور مختصر به مدت ۵ تا ۷ ثانیه‌سانتریفیوژ کنید.

- تیوب، استریپ، یا پلیتهای مختص دستگاه Real-time cycler مورد استفاده را بر روی Cooling Block مخصوص قرار داده و به هر تیوب واکنش مقدار۱۲ میکرولیتر از مخلوط فوق را اضافه نمائید.
- مقدار ۸ میکرولیتر از RNA استخراج شده مربوط به هر بیمار و ۸ میکرولیتر کنترل‌های مثبت و ۸ میکرولیتر کنترل منفی را به تیوبهای مربوط به خود بیفزائید.
- درب میکروتیوب های واکنش را ببندید و در میکروفیوژ مخصوص استریپ، Spin کنید. سپس نمونه ها را در داخل Real-time Cycler قرار داده و پروفایل دمایی را اعمال کنید.

نکات زیر را جهت بازده بیشتر فرایندکاررعایت نمایید

- از فریز و دفریز کردن نمونه پرهیز کنید.
- ذوب و یخ زدن های متوالی و بیش از ۳ بار محتویات کیت میتواند منجر به کاهش کیفیت مواد و واکنشگرهای شیمیایی شود و نتایج نهایی را تحت تاثیر قرار دهد.
- ملزومات مصرفی DNase-Free و RNase-free را استفاده نمایید.
- از بافر های منقضی شده استفاده نکنید.
- استفاده از الزامات ایمنی مانند ماسک و عینک محافظ و دستکش در حین کار ضروری می باشد.

پروفایل دمایی انجام واکنش

- به منظور برنامه دهی به دستگاه، به بروشور اختصاصی نرم افزار دستگاه مراجعه نمائید.
- چهار کانال فلئورسانس مربوط به رنگهای سبز، زرد، نارنجی وقرمز دستگاه را فعال نموده و پروفایل دمایی زیر را اعمال نمائید:

#	مرحله	دما	مدت زمان	تعداد سیکلها
۱	نسخه برداری معکوس	۵۰ درجه سانتیگراد	۱۰ دقیقه	۱
۲	دناتوراسیون	۹۵ درجه سانتیگراد	۳ دقیقه	۱
	دناتوراسیون	۹۵ درجه سانتیگراد	۱۰ ثانیه	
	اتصال/ساخت محصول	۶۱ درجه سانتیگراد	۳۰ ثانیه	۳
	دناتوراسیون	۹۵ درجه سانتیگراد	۱۰ ثانیه	
۳	اتصال/ساخت محصول	۶۰ درجه سانتیگراد	۲۵ ثانیه	۴۲ قرائت فلئورسانس
۴	خنک سازی	۳۷ درجه سانتیگراد	۳۰ ثانیه	۱

❖ تفسیر نتایج :

با استفاده از نرم افزار دستگاه Real-time PCR نتایج حاصل را به نحو ذیل آنالیز نمائید:

- سیگنال فلئورسانس ویروس SARS-CoV-2 در کانال نارنجی (TexasRed/ROX) برای ژن اصلی (N) و کانال سبز (FAM) برای ژن تایپیدی (RdRp) مشاهده می شود. در صورتی که نمونه دارای سیگنال فلئورسانس نارنجی و سبز با Cq<36 باشد، نمونه از نظر SARS-CoV-2 مثبت تلقی می شود.
- سیگنال فلئورسانس ویروس آنفلوانزاA و B در کانال زرد (HEX/JOE/VIC) شناسایی می شود: در صورتی که نمونه دارای سیگنال فلئورسانس زرد با Cq<36 (Cycle of quantification) باشد، آنفلوانزا مثبت تلقی می شود.
- سیگنال فلئورسانس کنترل داخلی (IC) اندوژن در کانال قرمز (Cy5) شناسایی می شود. شاخص Cq مربوط به کنترل داخلی یک نمونه نباید بیش از ۳۳ باشد. در صورت Cq > ۳۳، انجام واکنش از مرحله استخراج می بایست تکرار گردد و در صورت تکرار نتیجه ضعیف IC، نمونه گیری مجدد از بیمار نیاز است.
- قرائت سیگنال فلئورسانس کانال های نارنجی، سبز و زرد نشان دهنده عفونت هم زمان ویروس های آنفلوانزا و کرونا است.

نکته: به دلیل پایین بودن شدت فلورسانس ناشی از رنگ Cy5، در برخی از پلتفرمهای دستگاه های Real-time Cycler ممکن است سیگنال فلورسانس این رنگ در محدوده زیر ۳۳ دیده شود و Curve واضح دهد، اما عدد Cq منظور نگردد. در این موارد به شکل منحنی دقت شود و Cq بطور چشمی بررسی گردد که زیر ۳۳ باشد.

*نمونه کنترل مثبت باید دارای شاخص Cq کمتر از ۳۰ در هر سه کانال رنگی سبز، زرد، نارنجی و قرمز باشد (Cq<30)، در غیر اینصورت ران کاری نیازمند تکرار است.

*نمونه کنترل منفی باید فاقد Cq در هر چهار کانال رنگی باشد و یا شاخص Cq مربوط به کنترل منفی در کانالهای مذکور باید Cq > 36 باشد. در غیر اینصورت ران کاری نیازمند تکرار است.

نوع ویروس	سیگنال فلئوروسانس	Cq مجاز
ویروس SARS-CoV-2	کانال نارنجی (TexasRed/ROX)	Cq<36
	و سبز (FAM)	
ویروس آنفلوانزا(A/B)	کانال زرد (HEX/JOE/VIC)	Cq<36
کنترل داخلی (IC) اندوژن	کانال قرمز (Cy5)	Cq<33

نکته: با عنایت به اینکه واریانت های جدید ویروس SARS-CoV-2 دارای تغییرات در ژن S هستند و پرایمر و پروب های موجود در کیت برای نواحی اختصاصی برای ژن های N و RdRp طراحی شده اند، از لحاظ علمی این کیت تمام واریانت های شناخته شده ویروس کرونا را شناسایی می‌کند. از جمله واریانت های کلاسیک، آلفا، بتا، گاما، دلتا و ...

با این حال توانایی کیت در تشخیص واریانت های جدید و شایع در دو سطح in silico و نیز آزمایشگاهی تعیین گردیده است. در حالت In silico، توالیهای الیگونوکلئوتیدی طراحی شده برای ویروس SARS-CoV-2 پایگاه نوکلئوتیدی NCBI مورد BLAST قرار گرفتند و نتایج مشخص نمود که پرایمر-پروب های طراحی شده قادر است بطور کامل و Full match به توالی های تعیین شده در تمامی واریانت های شناخته شده از جمله ووهان، D614G، آلفا، بتا، گاما و دلتا، لامدا، مو و .. متصل می شود.