Gene Precision Medicine Group

کیت تشخیصی ویروسCovid-19

IraGen

SARS-CoV-2 multiplex qRT-PCR Detection Kit

مقدمه:

ویروس *SARS-CoV-2* سویه ای از کرونا ویروس ها است که سبب ایجاد سندرم حاد تنفسی شدید می شود. این ویروس دارای ژنوم *RNA* تک رشته ای و در دسته ی بتا کرونا ویروس‌ها قرار میگیرد. کیت *Covid-19 Real-Time PCR* جهت شناسایی ویروس کرونای جدید *nCoV-2019* در نمونه‌های انسانی طراحی شده است. روش شناسایی این کیت مبتنی بر استاندارد های اعلام شده توسط سازمان جهانی بهداشت می‌باشد. این محصول با روش *Real-Time RT-PCR* و بطور اخصاصی ژن های ویروسی *E* و *N* و *ORF1* را طی یک مرحله در نمونه ی تنفسی آلوده شناسایی می کند.

اساس روش :

در این کیت ژن های ویروسی *E* و*N* توسط پروب *FAM* و *Orf1* با پروب *Cy5* نشاندار شده اند و ژن کنترل داخلی *RNaseP* توسط پروب اختصاصی که با فلوروکروم *HEX* نشان دار شده است به روش *Real-Time RT-PCR* شناسایی می‌شوند. در این روش سنتز *cDNA* ویروسی و تکثیر و شناسایی توالی هدف در یک واکنش و به صورت *one-step RT-PCR* انجام می‌شود. این کیت با تمامی دستگاه های *Real-Time PCR* که قابلیت شناسایی سه رنگ فلوروسنت *FAM* (کانال سبز) و *HEX* (کانال زرد) و *Cy5* (قرمز) را داشته باشند سازگار است.

نمونه مورد استفاده:

نمونه های به دست آمده از بخش فوقانی دستگاه تنفس شامل سواب بینی – حلقی و نیز نمونه بخش تحتانی دستگاه تنفسی مانند خلط ، نمونه آسپیره بینی- حلقی یا مایع لاواژ برونکو آلوئولار نمونه مناسب جهت شناسایی ویروس *SARS-CoV-2* هستند.

هشدار های ایمنی:

•پرسنل بخش باید آموزش دیده باشند و به تمام پروتکل‌های ایمنی زیستی مرتبط با بخش *PCR* آشنایی داشته باشند.

• تمامی مراحل آزمون باید در محیط *Biosafety Level-2* و یا سطوح ایمنی بالاتر انجام شود.

• تمامی پرسنل بخش باید پوشش مناسب بخش عفونی شامل روپوش، گان، دستکش لاتکس بدون پودر، ماسک *N95* عینک محافظ را داشته باشند، تمامی موارد مصرفی باید *Molecular Grade* و *DNase-RNase Free* باشند.

• تمامی نمونه‌های مورد آزمون باید به عنوان نمونه‌های عفونی در نظر گرفته شوند، بنابراین در تمامی مراحل پردازش و آزمون باید نکات ایمنی زیستی با بالاترین درجه اطمینان رعایت شوند.

• جهت ضدعفونی کردن سطوح و محیط از محلول‌های ضد عفونی کننده مورد تائید استفاده شود.

• غیر فعال سازی و امحاء نمونه‌ها باید بر اساس پروتکل‌های دفع و امحاء نمونه‌های زیستی انجام شود.

• هنگام استفاده از کیت تاریخ انقضاء کیت را بررسی کرده و از محصول منقضی شده استفاده نکنید.

استخراج *RNA*:

عملکرد و صحت روش‌های مبتنی بر *Real-Time RT-PCR* بستگی به کیفیت و کمیت *RNA* استخراج شده دارد. بنابراین مرحله استخراج *RNA* نمونه از اهمیت بالایی برخوردار است. جهت استفاده از این کیت می‌توان از روش ها و کیت های مختلفی استفاده کرد. برخی از کیت های تجاری با کیفیت و مورد تائید اداره تجهیزات پزشکی عبارت اند از:

RNJia Virus Kit (cat. No. RN983072 ROJE Technologies, Yazd, Iran(

AmitisGen SARS-CoV-2 Viral RNA Extraction kit (Cat No: AVE012021 AmitisGen MedTECH Group, Tehran, Iran(

DynaBio™ Viral Nucleic Acid (DNA\RNA) Extraction Mini Kit (cat No: KI0025)

نگهداری کیت و نمونه:

•کیت باید در دمای ۲۰-±۵ نگهداری شود و در صورت نیاز به حمل همراه با یخ خشک جابجا شود.

•نمونه‌های تنفسی باید پس از نمونه گیری به دمای ۴ درجه انتقال یابند، در صورت نگهداری طولانی مدت قبل از استخراج باید به فریزر ۲۰- منتقل شوند.

•استخراج *RNA* باید روی یخ و یا بلوک های سرد انجام شود، در بهترین حالت ممکن نمونه باید پس از استخراج مورد بلافاصله مورد آزمون قرار گیرد، در صورت نیاز به نگهداری، نمونه باید به فریزر ۸۰- منتقل شود.

تجهیزات مورد نیاز:

جهت استخراج نمونه، تهیه میکس واکنش، و انجام واکنش نیاز به سه فضای مجزا می‌باشد.

تجهیزات مورد نیاز شامل:

۱.هود لامینار کلاس *II*

۲.کابینت مخصوص *PCR* یا *workstation*

۳.سانتریفیوژ

۴.ورتکس

۵.بلوک سرد

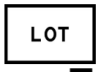
۶.سمپلر های متغییر

۷.دستگاه *Real-Time PCR* (تمامی دستگاه های *Real-Time PCR* که قابلیت شناسایی سه رنگ فلوروسنت *FAM* (کانال سبز) و *HEX* (کانال زرد) و *Cy5* (قرمز) را داشته باشند.

۸.میکروتیوب های *RNase-DNase Free*

۹.سر سمپلر های فیلتر دار *RNase-DNase Free*

Used by



Lot number

Manufacturer

Date of manufacture

Reference number

In Vitro Diagnostic

Temperature limitation

Consult instructions for use

Do not re-use

Do not use if package is damage

Contains sufficient for <N> tests

تهران، خیابان فلسطین، ابتدای خیابان ایتالیا، پلاک۲، گروه توسعه فناوری پزشکی فرادقیق ژن

۰۲۱-۸۸۹۸۵۲۹۱

محدودیت های تشخیصی:

- در مواردی که تعداد نسخه ویروس در نمونه کم تر از حد تشخیص کیت (*50copy/ul*) باشد امکان دارد نتیجه تست منفی کاذب اعلام شود.
- در مواردی که نمونه گیری به درستی انجام نشده باشد امکان دارد نتیجه تست منفی کاذب اعلام شود، در این موارد نمونه گیری باید تکرار شود.
- در صورتی که در فرآیند استخراج یا تهیه مخلوط واکنش آلودگی ایجاد شود، امکان دارد نتیجه تست مثبت کاذب اعلام شود، در این موارد آزمون باید تکرار شود.

***در نظر داشته باشید نتیجه این تست معیار تشخیص قطعی ابتلا به ویروس *SARS-CoV-2* نیست و برای اعلام نتیجه قطعی باید جنبه های بالینی بیمار و تست های تکمیلی نیز در نظر گرفته شوند.**

محتویات کیت:

اجزای کیت	حجم
Real-Time PCR MIX	*1ml*
Positive Control	*50 ul*

دستورالعمل انجام آزمون:

۱. محتویات کیت را از فریزر خارج کرده روی یخ قرار داده تا ذوب شوند

۲. به تعداد بیماران و کنترل مثبت و کنترل *NTC* میکروتیوب روی بلوک سرد قرار داده

۳. به هر میکروتیوب *10 µl* از محلول *Real-Time PCR MIX* اضافه کرده

۴. به میکروتیوب بیماران *5 µl* از *RNA* استخراج شده اضافه کرده و به میکروتیوب های کنترل مثبت و *NTC* به ترتیب *5 µl Positive control* و آب اضافه کنید

۵. حجم نهایی واکنش *15 µl* می باشد

۶. درب میکروتیوب ها را بسته به مدت ۳-۵ ثانیه میکروفیوژ کنید

۷. نمونه ها را به دستگاه *Real-Time PCR* انتقال داده و برنامه دمایی زیر را اجرا نمائید.

	Stage	***Cycle Repeat***	***Acquisition***	***Temperature***	***Time***
Revers transcription	***Hold***	***1***	**-**	***50 ℃***	***10 min***
Denaturation	***Hold***	***1***	**-**	***95 ℃***	***3min***
Denaturation	***40 Cycle***		**-**	***95 ℃***	***10 sec***
Amplification			**** On FAM & HEX& Cy5***	***60 ℃***	***30 sec***

آنالیز نتایج:

• کانال *FAM* دستگاه مربوط به ژن ویروسی *N&E* ، کانال *Cy5* مربوط به ژن ویروسی *Orf1* و کانال زرد *HEX* مربوط ژن کنترل داخلی *RNaseP* می باشد

• نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و در این حالت *ct* معتبر بوده و قابل تفسیر است. در صورت سیگموئیدی نبودن منحنی ، نمونه منفی محسوب می شود.

• میزان *cut off* صحیح کیت بر اساس مقادیر مرجع *ct<35* می باشد. و مقادیر *ct* کمتر از ۳۵ در هر دو کانال مثبت در نظر گفته می شود.

• نمونه کنترل مثبت باید در هر سه کانال *FAM* و *Cy5* و *HEX* مثبت شود و کنترل *NTC* در هر سه کانال منفی باشد.

۱. در صورتی که نمونه در کانال *HEX* مثبت و در یکی از کانال‌های *FAM* یا *Cy5* مثبت و *ct* کمتر از ۳۵ باشد نمونه مثبت در نظر گرفته می شود.

۲. در صورتی که نمونه در کانال‌های *FAM* و *Cy5* منفی ولی در کانال *HEX* مثبت و *ct* کمتر از ۳۵ باشد نمونه منفی در نظر گرفته می شود.

۳. در صورتی که نمونه فقط در کانال *FAM* و *Cy5* مثبت و دارای *ct* کمتر از ۳۵ باشد ولی در کانال *HEX* منفی باشد نمونه مثبت

در نظر گرفته می شود.

۴. در مواردی که نتیجه کنترل *NTC* در هر کدام از کانال های *FAM* یا *Cy5* مثبت شود، نشان دهنده آلودگی در فرایند آزمون است و آزمون باید تکرار شود.

۵. در مواردی که در کانال *FAM* و *Cy5* میزان *ct* بیشتر از ۳۵ باشد آزمون باید تکرار شود.

۶. در صورتی که نمونه در هر سه کانال *FAM* و *Cy5* و *HEX* منفی باشد، آزمون باید تکرار شود، در صورت تکرار نتایج فرآیند استخراج باید تکرار شود.

کنترل مثبت	+	+	+	+	+	❋	+
کنترل *NTC*	−	−	−	−	−	❋	−
کانال *FAM*	+	+	−	−	❋	*ct>35*	−
کانال *Cy5*	+	−	+	−	❋	*ct>35*	−
کانال *HEX*	+	+	+	+	−	❋	−
نتیجه	+	+	+	−	+	تکرار	

حساسیت آنالیتیک:

آزمون بررسی حساسیت *LOD* در غلظت های مشخصی از *RNA* ویروسی با کیت *Covid-19 Real-Time PCR* انجام شد. نتایج این آزمون نشان داد کمترین مقدار *RNA* ویروسی قابل تشخیص (*LOD*) توسط کیت ۵۰ *copy/ul* در هر واکنش می باشد.

آزمون های ذوب-انجماد نشان داد که این فرآیند بیش از ۳ مرتبه باعث کاهش کارایی آنزیم بکار رفته در محصول میگردد.

بنابراین توصیه می شود مراکزی با تعداد نمونه کم *MasterMix* محصول را در مقادیر مختلف تقسیم کنند تا از ذوب و انجماد متوالی اجتناب شود.