کیت تک مرحله‌ای چند منظوره SARS-CoV-2، و آنفلوانزا نوع A و B (۵ ژن)

Multiplex One-step rRT-PCR kit for SARS-CoV-2, Influenza A & B (5 genes)

Ref: APCF5G (In Vitro Diagnostic, IVD)

فهرست مطالب

۱) مقدمه ۲

۲) اصول انجام آزمایش ۲

۳) محتویات کیت ۲

۴) مواد و وسایل مورد نیاز ۳

۵) شرایط نگهداری کیت ۳

۶) ایمنی زیستی ۳

۷) جمع‌آوری نمونه ۴

۸) روش انجام آزمایش ۵

۹) آنالیز داده‌ها و گزارش آن‌ها ۷

۱۰) محدودیت‌ها ۸

۱۱) ویژگی‌های عملکرد ۸

۱۲) کنترل کیفی ۱۰

۱۳) تداخل ۱۱

۱۴) دفع پسماندها ۱۱

۱۵) منابع ۱۱

۱۶) علائم و توضیحات ۱۱

شرکت دانش بنیان 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: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۹

021-22920776

co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com

۱) 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 نمونه‌های دستگاه تنفسی فوقانی بیمارانی که دارای علائم و نشانه‌های بیماری COVID-19 هستند، اقدام به طراحی و ساخت کیت rRT-PCR تک مرحله‌ای چند منظوره نموده است. عامل بیماری COVID-19 متعلق به خانواده *Coronaviridae* می‌باشد. این ویروس یک beta-coronavirus است که در دسامبر سال ۲۰۱۹ در منطقه هوبای کشور چین کشف شد و در ماه‌های ابتدایی سال ۲۰۲۰ منجر به همه گیر شدن عفونت در دستگاه تنفسی گردید. کروناویروس‌ها، بزرگترین خانواده ویروسی RNA دار تک رشته‌اند که positive-sense بوده و دارای پوشش یا envelope می‌باشند. ویریون آن‌ها اکثرا 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 می‌کند. افرادی که به COVID-19 مبتلا شده‌اند طیف گسترده‌ای از علائم را گزارش داده‌اند:. علائم خفیف تا متوسط (علائم خفیف تا پنومونی خفیف) در ٪۸۱ موارد، بیماری شدید (تنگی نفس، هیپوکسی) بیش از ٪۵۰، درگیری ریه در تصویربرداری‌ها در ٪۱۴ موارد و در ٪۵ موارد بحرانی (نارسایی تنفسی، شوک یا اختلال در عملکرد چندین عضو) گزارش شده است. ویروس آنفلوانزای انسانی، متعلق به خانواده اورتومیکسوویریده است و انواع A و B آن منجر به اپیدمی می‌شوند. با این حال، آنفلوانزای نوع B منجر به پاندمی نمی‌شود. ژنوم ویروس‌های آنفلوانزا به صورت RNA تک‌رشته‌ای negative-sense است که دارای پوشش پلی‌مورفیک (چندشکلی) بوده و قطر آن ۵۰ تا ۱۲۰ نانومتر است. آنفلوانزا عامل یک بیماری حاد تنفسی است که به شدت مسری بوده و هر ساله به میزان قابل توجهی منجر به مرگ و میر در افراد می‌شود. ویروس آنفلوانزا نوع A و B، ابتدا در نازوفارنکس و حفرات اوروفارنکس عفونت ایجاد می‌کند. اغلب، توانایی بیماری‌زایی آنفلوانزا دست کم گرفته می‌شود که این امر منجر به بالا رفتن میزان مرگ و میر ناشی از این بیماری به ویژه در افراد مسن و بیماران پرخطر نظیر نوجوانان و افرادی که سیستم ایمنی تضعیف شده دارند می‌گردد. دوره کمون عفونت‌های تیپیک آنفلوانزا در انسان ۱ تا ۲ روز است و علائم آن نظیر بروز ناگهانی تب، گلو درد، سرفه، سر درد، دردهای عضلانی و احساس بی‌قراری است که حداقل تا یک هفته به طول می‌انجامد. هنگامی که فردی به نوع شدید آنفلوانزا مبتلا می‌شود علائم ذکر شده می‌تواند به سرعت به سمت پنومونی پیشرفت کرده و حتی در برخی موارد منجر به مرگ شود. بروز پاندمیک نوع شدید آنفلوانزا، خطر جدی برای سلامت انسان و حیوانات محسوب می‌گردد, Multiplex One-step rRT-PCR kit for SARS-CoV-2, Influenza A & B (5 genes) برای تشخیص مولکولی ویروس‌های یاد شده در آزمایشگاه تشخیص پزشکی طراحی و تولید شده است. کارکنان آزمایشگاه‌های بالینی واجد شرایط که به ویژه در زمینه تکنیک‌های Real-Time PCR و روش‌های تشخیصی در محیط‌های آزمایشگاهی تعلیم دیده‌اند مسئول انجام آزمایش هستند.

۲) اصول انجام آزمایش:

سنجش اسیدهای نوکلئیک با استفاده از تکنیک Real-Time PCR یکی از حساس‌ترین، خاص‌ترین و سریع‌ترین روش‌های تشخیص ویروس‌ها است. RNA ویروسی از نمونه‌ها استخراج شده و پس از تبدیل شدن به cDNA در همان میکروتیوب، مناطق خاصی از cDNA تکثیر می‌شود. بعلاوه، در آزمایش Real-Time PCR از پروب‌های فلوروژنیک مبتنی بر TaqMan استفاده می‌شود. این پروب‌ها با استفاده از فعالیت ′۵ نوکلئازی Taq DNA polymerase در چرخه‌های PCR امکان شناسایی محصولات اختصاصی را فراهم می‌آورد. کیت PCR چند منظوره شرکت AP-RAD برای تشخیص وجود SARS-CoV-2، Influenza A و Influenza B در نمونه‌های انسانی دستگاه تنفس فوقانی مشکوک به عفونت‌های ویروسی، به طور همزمان از پرایمرها و پروب‌های اختصاصی برای سنجش ژن‌های هدف *N* و *Orf1b* (SARS-CoV-2)، *M* (Influenza A) و *NS1* (Influenza B) همراه با کنترل داخلی (*RNase P*) در یک میکروتیوب استفاده می‌کند.

۳) محتویات کیت:

در این کیت حجم نهایی هر واکنش ۲۰ µL می‌باشد.

شماره	محتویات کیت ۲۵ تستی	مقدار
۱	مسترمیکس آماده برای استفاده در RT-PCR تک مرحله‌ای A	۲۵۰ µL
۲	مسترمیکس آماده برای استفاده در RT-PCR تک مرحله‌ای B	۲۵۰ µL
۳	کنترل مثبت	۱۰۰ µL
۴	کنترل منفی	۱۰۰ µL

شرکت دانش بنیان 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: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۹

021-22920776

co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com

شماره	محتویات کیت ۵۰ تستی	مقدار
۱	مسترمیکس آماده برای استفاده در RT-PCR تک مرحله‌ای A	۵۰۰ µL
۲	مسترمیکس آماده برای استفاده در RT-PCR تک مرحله‌ای B	۵۰۰ µL
۳	کنترل مثبت	۲۰۰ µL
۴	کنترل منفی	۲۰۰ µL

۴) مواد و وسایل مورد نیاز:

- هر نوع دستگاه ارزیابی و کالیبر شده Real-Time PCR با کانال سبز (FAM)، زرد (HEX، VIC یا JOE) و نارنجی (ROX)
- هود ایمنی زیستی کلاس II و PCR workstation
- سمپلرهای متغیر در حجم‌های 0.5-10 µL، 10-100 µL و 100-1000 µL
- تجهیزاتی نظیر ورتکس و Minispin
- کیت استخراج RNA ویروسی
- ظروف پلاستیکی: میکروتیوب با حجم ۰/۱ یا ۰/۲ میلی‌لیتر عاری از DNase/RNase یا پلیت‌های مخصوص دستگاه ریل تایم
- مواد مصرفی: دستکش یکبار مصرف فاقد پودر، روپوش آزمایشگاهی، سرسمپلرهای دارای فیلتر آئروسل در حجم‌های 10 µL، 100 µL و 1000 µL، خودکار علامت‌گذاری آزمایشگاهی و رول دستمال کاغذی
- فریزر (≤ -۲۰ °C)

۵) 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 کیت و تاریخ انقضا (۱۲ ماه) نیز بر روی کیت درج شده است.

توجه:

- نگهداری کیت به مدت طولانی در دمای اتاق منجر به بروز نتایج نادرست می‌گردد. نگهداری کیت در تاریکی الزامی است.
- پایداری کیت در مقابل عمل freeze thaw (ذوب و انجماد) تا دو مرتبه کنترل شده و توصیه می‌شود تنها دو مرتبه این عمل بر روی کیت اعمال شود. 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 میکروتیوب‌های مخصوص تقسیم (Aliquot) کرده و مجددا منجمد نمائید.

۶) ایمنی زیستی:

آزمایشگاه می‌بایست یک ارزیابی خطر (risk assessment) برای تأسیسات خود و رویه‌هایی که برای بررسی بیماران مشکوک به عفونت‌های ویروسی صورت می‌پذیرد، انجام دهد. پس از انجام این ارزیابی خطر، می‌توان هنگام کار با نمونه‌های مشکوک به بیماری‌های ذکر شده، شیوه‌های ایمنی زیستی اضافی مانند PPE تقویت شده را انتخاب کرد. بدیهی است که استفاده از شیوه‌های مختلف ایمنی از جمله استفاده از وسایل حفاظت شخصی از قبیل دستکش، ماسک، روپوش و غیره حین کار الزامی می‌باشد. تمامی نمونه‌ها را آلوده و عفونی تلقی کنید.

۶-۱) موارد احتیاطی و پیشگیری:

۱) پیش از شروع آزمایش، دستورالعمل کیت را به دقت مطالعه نمایید.
۲) پیش از انجام آزمایش از تمیز و ضدعفونی (Decontamination) بودن محل انجام تست اطمینان حاصل کنید.
۳) توصیه می‌شود کیت در دمای کم تر از ۲۰ °C- صورت پذیرد.
۴) از استفاده از کیت‌های دارای نقص اجتناب نمایید.
۵) محلول‌های استفاده نشده را مطابق با قوانین و مقررات کشوری امحا نمایید.
۶) کیفیت RNA نمونه از اهمیت بالایی برخوردار است و می‌تواند نتایج آزمایش را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین استفاده از روش‌ها و کیت‌های استاندارد و صحه‌گذاری شده برای استخراج ژنوم ویروس الزامی است و استفاده از کیت‌های غیر منجر به نتایج منفی کاذب می‌گردد. هم چنین، به منظور به حداقل رساندن تخریب RNA توسط ریبونوکلئاز، توصیه می‌شود بلافاصله پس از جمع‌آوری نمونه، استخراج RNA آغاز گردد. هنگام کار با RNA، به منظور پیشگیری از آلودگی نمونه توسط ریبونوکلئاز روی پوست دست، همیشه از دستکش استفاده کنید.

۷) با توجه به حساسیت بالای تکنیک Real-Time PCR، لازم است جهت جلوگیری از بروز نتایج مثبت کاذب از عدم آلودگی محیط کار و ابزارها با RNA، cDNA یا محصول PCR سایر نمونه‌ها، اطمینان حاصل نمایید. پرسنل آزمایشگاه باید ملزومات پوشش حرفه‌ای 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 گردش یک سویه کار حفظ شده و هیچ‌گاه محصولات واکنش در خلاف جهت این مسیر انتقال پیدا نکنند

۸) تمام مراحل استخراج و آماده‌سازی معرف‌ها برای انجام آزمایش باید در فضای هود بیولوژیک کلاس II و PCR workstation انجام شود.

۹) میزهای آزمایشگاهی، سمپلرها و روپوش‌های آزمایشگاهی باید به طور منظم تمیز و آلودگی زدایی شوند.

۱۰) توصیه می‌شود در تمام مراحل انجام آزمایش از سرسمپلرهای دارای فیلتر آئروسل استفاده شود. پس از انجام PCR، باید میکروتیوب‌ها با احتیاط امحا شوند تا از ریختن محصولات تکثیر یافته جلوگیری شود.

۱۱) آزمایشگاه‌ها می‌بایست طبق پروتکل، گزارشات نتایج مثبت بحرانی خود را به مراجع تعیین شده توسط وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی گزارش دهند.

۱۲) کیت را هنگام نگهداری و حین حمل و نقل به حالت ایستاده قرار دهید.

۱۳) پیش از استفاده از کیت، ویال‌ها را از لحاظ بروز نشتی یا آسیب بررسی کنید.

۱۴) 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 شوند.

۱۵) سرسمپلرها می‌بایست پس از استفاده در یک Safety box ریخته شوند. سطوح محل کار و ابزار باید با محلول سدیم هیپوکلریت ٪۱۰ تازه تهیه شده ضدعفونی شوند، سپس با اتانول ٪۷۰ یا آب مقطر تمیز شوند و در نهایت لامپ UV به مدت ۳۰ دقیقه به منظور ضدعفونی سطوح کار، روشن شود.

۱۶) وسایلی که برای انجام آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفته‌اند، باید بر اساس دستورالعمل ذکر شده در دفترچه راهنمای دستگاه، به صورت منظم کالیبره شوند تا امکان بروز cross-contamination میان کانال‌ها از بین برود.

۷) جمع‌آوری نمونه:

تمامی آزمایش‌های SARS-CoV-2 و Influenza A & B باید تحت نظر و مشورت با پزشک معالج انجام شود. نمونه‌ها از دستگاه تنفسی فوقانی تهیه می‌شود:

الف. سواب حلق و بینی در یک لوله جمع‌آوری نمونه حاوی محیط انتقال ویروسی (AP-RAD, Ref :APVTM1)

ب. یک سواب ابتدا برای حلق و سپس برای بینی

پ. سواب‌های حلق و بینی جداگانه در لوله‌های VTM مجزا

ت. آسپیره نازوفارنژیال یا آسپیره بینی (NA)

ث. سواب تیغه میانی بینی (NMT) یا سواب عمقی بینی (عمق حدود ۲ سانتی‌متر)

ج. سواب نمونه حفره قدامی (NS)، در فاصله حداقل ۱ سانتی‌متر

نکات مهم:

- تنها از سواب‌های الیاف مصنوعی با دسته پلاستیکی استفاده شود. از سواب‌های آلژینات کلسیم یا سواب‌هایی که دسته چوبی دارند استفاده نکنید، زیرا ممکن است حاوی موادی باشند که برخی از ویروس‌ها را غیرفعال کرده و منجر به مهار آزمایش PCR شوند. سواب‌ها را بلافاصله در لوله‌های استریل حاوی محیط انتقال ویروس قرار دهید.

- به دلیل جلوگیری از خشک شدن سواب، نمونه‌ها می‌بایست در لوله‌های VTM (۲ میلی‌لیتر) استریل حمل شوند.

- اگر سواب هم از مجاری بینی و هم از حلق جمع‌آوری شده است، هر دو سواب را می‌توان در یک لوله حاوی VTM حمل کرد.

توجه: با توجه به عدم دسترسی به نمونه‌های تنفسی تحتانی متعدد، این کیت تنها با نمونه‌های دستگاه تنفسی فوقانی ارزیابی شده است. اگرچه با توجه به مشخصات کیت و آزمایش‌های حساسیت انجام شده، تشخیص ویروس در نمونه‌های تنفسی تحتانی نیز به وسیله این کیت امکان پذیر است.

۷-۱) نگهداری و دمای مناسب برای انتقال نمونه:

- نمونه جمع‌آوری شده را در لوله‌های VTM در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت پس از جمع‌آوری نمونه می‌توان نگهداری کرد (لوله‌های VTM تولید شده در شرکت AP-RAD، حفظ سلامت نمونه را تا ۱ هفته تضمین می‌کند). اگر احتمال تاخیر در انجام آزمایش یا ارسال وجود دارد، نمونه‌ها را در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا کمتر نگهداری کنید.

- نمونه را برای انجام آزمایش در اسرع وقت به آزمایشگاه انتقال دهید و به این منظور نمونه‌ها را بر روی پک‌های یخ قرار دهید. از گرما و نور مستقیم آفتاب دور نگه داشته شود.
- چنانچه نمونه‌ها طی ۲۴ ساعت به آزمایشگاه ارسال نشود، باید به سرعت در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده و برای ارسال باید بر روی مقدار مناسبی یخ خشک حمل شوند.
- نمونه‌ها 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 می‌توانید به آدرس‌های 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

۲-۷) شرایط رد نمونه:

- جمع‌آوری نمونه در ظرف غیراستریل
- انواع نمونه‌های نامعتبر مانند سواب خشک، سواب زبان و یا بزاق
- نمونه‌های با لیبل مخدوش و یا فاقد نام و مشخصات
- نمونه‌های دارای حجم ناکافی
- دریافت نمونه‌ها در دمای اتاق
- دریافت نمونه‌های فریز نشده پس از گذشت بیش از ۲۴ ساعت از زمان جمع‌آوری آن‌ها

۸) روش انجام آزمایش:

ریبونکلئیک اسیدها با استفاده از کیت معتبر استخراج RNA ویروس از نمونه‌های جمع‌آوری شده استخراج می‌شوند. اسید نوکلئیک خالص شده مستقیما با استفاده از مسترمیکس موجود در کیت در هر دستگاه Real-Time PCR تایید شده تکثیر می‌گردد. در این فرآیند، پروب به سکانس هدف ویژه‌ای که میان پرایمرهای Forward و Reverse واقع شده‌اند، متصل می‌گردد. 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، مولکول‌های اضافی رنگ ریپورتر از پروب مربوطه جدا می‌شوند و شدت فلورسانس را افزایش می‌دهند. شدت فلورسانس در هر چرخه PCR توسط دستگاه Real-Time PCR ثبت می‌شود.

۸-۱) استخراج و تخلیص نوکلئیک اسید:

RNA را می‌توان به طور مستقیم از نمونه‌های دستگاه تنفسی فوقانی انسان، جمع‌آوری و سپس به وسیله کیت‌های معتبر استخراج RNA (Qiagen DSP Viral RNA، RNJia Virus Kit و High Pure Viral Nucleic Acid Roche) و یا روش‌های دستی و دستگاهی استخراج کرد. کیت چند منظوره Multiplex One-step rRT-PCR kit for SARS-CoV-2, Influenza A & B (5 genes)، با کیت‌های استخراج RNA نامبرده سازگار می‌باشد.

۸-۲) روش rRT-PCR کیفی یک مرحله‌ای بر پایه TaqMan:

rRT-PCR کیفی تک مرحله‌ای به روش زیر انجام می‌شود.

۱. به دلیل وجود ۲ مسترمیکس جداگانه در این کیت، برای کلیه آزمایشات ۲ ست میکروتیوب را با شرایطی که در ادامه توضیح داده شده است، آماده کنید. در هر ست میکروتیوب‌های آماده استفاده را به صورت دوتایی برای هر بیمار و به صورت تکی برای کنترل مثبت، منفی و بدون الگو (NTC) مرتب و نام‌گذاری کنید.

توجه: برای دستیابی به نتایج قابل اعتماد و دقیق، بر انجام PCR به صورت دوتایی (duplicate) برای هر بیمار تأکید می‌شود.

۲. تمام میکروتیوب‌ها را بر روی رک سرد قرار دهید.

۳. ۱۰ µL از مسترمیکس آماده A را به تمامی میکروتیوب‌های مشخص شده اضافه کنید.

۴. ۱۰ µL از مسترمیکس آماده B را به تمامی میکروتیوب‌های مشخص شده اضافه کنید.

۵. ۱۰ µL از آب مقطر استریل به میکروتیوب‌های No Template Control (NTC) هر ست اضافه و سپس درب میکروتیوب‌ها را ببندید.
۶. ۱۰ µL از کنترل منفی را به میکروتیوب‌هایی که برای کنترل منفی در هر ست مشخص شده است، اضافه و سپس درب میکروتیوب‌ها را ببندید.
۷. ۱۰ µL از RNA بیمار را به هر یک از دو میکروتیوبی که برای هر بیمار در هر ست مشخص شده است، اضافه و سپس درب میکروتیوب‌ها را ببندید.
۸. ۱۰ µL از کنترل مثبت را به میکروتیوب‌هایی که برای کنترل مثبت در هر ست مشخص شده است، اضافه و سپس درب میکروتیوب‌ها را ببندید.
۹. میکروتیوب‌ها را برای مدت زمان کوتاهی اسپین کنید.
۱۰. سپس میکروتیوب‌ها را در دستگاه Real-Time PCR قرار داده و برنامه را همانگونه که در برنامه واکنش حرارتی ذکر شده است، اجرا کنید.
نکته: توجه به ترتیب اضافه نمودن نمونه‌ها، مطابق مراحل فوق به منظور جلوگیری از آلودگی به طور جدی توصیه می‌گردد.

خلاصه‌ای از مراحل انجام تست برای یک واکنش

حجم مسترمیکس آماده	حجم نمونه
۱۰ µL از مسترمیکس آماده A	۱۰ µL
۱۰ µL از مسترمیکس آماده B	۱۰ µL

۳-۸) مشخصات واکنش حرارتی معمول:

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

* به ترتیب در مسترمیکس‌های A و B، FAM برای Influenza A و Influenza B، HEX، VIC یا JOE برای ژن‌های *N* و *Orf1b* (SARS-CoV-2) و ROX برای *RNase P* (کنترل داخلی) تنظیم شود.

Master Mix	کانال سبز (FAM)	کانال زرد (HEX، VIC یا JOE)	کانال نارنجی (ROX)
A	Influenza A	*N* gene	*RNase P*
B	Influenza B	*Orf1b* gene	*RNase P*

۴-۸) مشخصات واکنش حرارتی نیمه سریع (Semi-fast):

برنامه‌ی واکنش حرارتی Semi-fast فقط برای دستگاه‌های Real-Time PCR مدل Rotor-Gene Q کیاژن مورد تایید و ارزیابی قرار گرفته است.

مرحله	دما	زمان	چرخه
رونویسی معکوس (RT)	۵۰ °C	۱۰ دقیقه	۱
فعال‌سازی اولیه	۹۵ °C	۱ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۵ °C	۲ ثانیه	۴۵
انیلینگ/گسترش	۵۵ °C	۳ ثانیه	

- روش نیمه سریع جهت تسریع در انجام واکنش قابل استفاده می‌باشد. مدت زمان کل تست از ۱۲۰ دقیقه به ۷۳ دقیقه کاهش می‌یابد.
- با استفاده از این روش، بار کار بر دستگاه کاهش می‌یابد.
- پاسخ دریافتی از این روش مشابه با پاسخ دریافتی از روش معمول می‌باشد.

۹) آنالیز داده‌ها و گزارش آن‌ها:

نتایج با استفاده از نرم افزار دستگاه‌های Real-Time PCR با مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت که از خط Threshold (آستانه) عبور می‌کند، در دستگاه Rotor-Gene کیاژن، برای ژن‌های اصلی و کنترل داخلی ۰/۰۵ می‌باشد و یا مطابق دستورالعمل‌های دستگاه تفسیر می‌شود و در دستگاه های دیگر مطابق دستورالعمل‌های دستگاه تفسیر می‌شود. فرآیند انتخاب آستانه باید با روندی ثابت برای تمامی نمونه‌ها انجام شود. تنظیم دقیق خط آستانه می‌تواند برای دستگاه‌های مختلف، متفاوت باشد و نیاز است که بر اساس نمودار امپلیفیکیشن تعریف شود. اگر از تنظیم خودکار خط آستانه استفاده می‌کنید، حتما درستی آن را بررسی نمایید. به طور معمول، خط آستانه باید منحنی‌های امپلیفیکیشن فلورسنت به شکل S (سیگموئیدی) را برای کنترل و نمونه‌های مثبت قطع کند و نباید بر روی خط پایه قرار گیرد. در غیر این صورت خط آستانه را به صورت دستی (manually) بالای خط فلورسنت پایه و در فاز خطی تقویت نمایی (exponential amplification) تنظیم کنید.

۹-۱) تفسیر:

- آنالیز نتایج با استفاده از میزان Cycle of threshold (Ct) اندازه‌گیری شده برای هر هدف تعیین می‌شود. در صورتی که منحنی امپلیفیکیشن سیگموئیدی باشد و میزان Ct برای هر هدف طی ۴۵ سیکل کمتر یا مساوی ۴۰ (Ct value ≤ 40) باشد مثبت خوانده می‌شود و هنگامی که منحنی امپلیفیکیشن به شکل سیگموئیدی نباشد و میزان Ct بیشتر از ۴۰ باشد (Ct value > 40) منفی خوانده می‌شود.
- کیت Multiplex One-step rRT-PCR kit for SARS-CoV-2, Influenza A & B (5 genes) چند منظوره تشخیصی AP-RAD دارای کنترل‌های مثبت، منفی برای SARS-CoV-2 و Influenza A & B و همچنین کنترل داخلی می‌باشد.
- میزان Ct می‌بایست برای کنترل مثبت، مساوی یا کمتر از ۳۵ (≤ 35) باشد و برای کنترل منفی کاملا مسطح یا Flat و بدون افزایش سیگموئیدی باشد. میزان Ct برای کنترل داخلی (*RNase P*) در کنترل مثبت و منفی، می‌بایست مساوی یا کمتر از ۳۵ (≤ 35) باشد.
- تمامی کنترل‌های آزمایش باید پیش از تفسیر نتایج بیمار، بررسی شوند (جدول شماره ۱).
- اگر کنترل‌ها مورد تائید نیستند، نباید نتایج آزمایش بیماران تفسیر گردد. در صورتیکه کنترل‌ها عملکرد مورد انتظار را آن گونه که شرح داده شد، نشان نمی‌دهند، ممکن است نحوه انجام آزمایش نادرست باشد، یا خرابی در معرف یا نقص در تجهیزات رخ داده باشد. در این صورت، آزمایش را تایید نکرده و مجددا تکرار نمایید.

(جدول شماره ۱)

نام کنترل خارجی	برای نظارت بر	A			B			میزان مورد انتظار
		Influenza A	*N* gene	*RNase P*	Influenza B	*Orf1b* gene	*RNase P*	
کنترل مثبت	عملکرد اجزای معرف نظیر پرایمر و پروب‌ها	+	+	+	+	+	+	Ct ≤ 35
کنترل منفی	آلودگی معرف و یا محیط	-	-	+	-	-	+	Ct > 40 به جز کنترل داخلی
فاقد الگو (NTC)	آلودگی معرف و یا محیط	-	-	-	-	-	-	Ct > 40

۹-۲) تفسیر نتایج بیمار:

تفسیر نتایج بیمار با خواندن Ct هر یک از نمونه‌ها مشخص می‌گردد و اگر میزان آن کمتر یا بیشتر از ۴۰ باشد، تشخیص داده می‌شود. خلاصه‌ای از تفسیر نتایج در جدول شماره ۲ وجود دارد.

(جدول شماره ۲)

اقدامات	Report	Result Interpretation	A			B		
			Influenza A	*N* gene	*RNase P*	Influenza B	*Orf1b* gene	*RNase P*
گزارش جواب	SARS-CoV-2 مثبت	**SARS-CoV-2 Detected**	-	+	±	-	+	±
گزارش جواب	Influenza A مثبت	**Influenza A Detected**	+	-	±	-	-	±
گزارش جواب	Influenza B مثبت	**Influenza B Detected**	-	-	±	+	-	±
نتیجه را گزارش کنید. آزمایش هایی را برای شناسایی سایر میکروارگانیسم‌ها در نظر بگیرید.	منفی	**SARS-CoV-2, Influenza A & B Non-Detected**	-	-	+	-	-	+
استخراج و آزمایش را تکرار کنید. اگر همچنان نامعتبر شد مجددا از بیمار نمونه بگیرید.	نامعتبر	**Invalid result**	-	-	-	-	-	-

- در غیاب *RNase P* یا کنترل داخلی، اگر افزایش فلورسنت در هر یک از میکروتیوب‌ها (به جز میکروتیوب NTC) اتفاق بیفتد، نتایج نباید گزارش شوند.
- در نمونه‌هایی که نتیجه منفی می‌شود Ct برای کنترل داخلی (*RNase P*) می‌بایست مساوی یا کمتر از ۳۵ باشد. Ct > ۳۵ در کنترل داخلی برای نمونه‌هایی که پاسخ مثبت با میزان بالا در ژن اصلی بروز می‌کند وجود دارد (±).
- در صورت افزایش فلورسنت در میکروتیوب NTC، می‌بایست آزمایش تکرار شود و احتمال وجود آلودگی وجود دارد.
- در صورت افزایش فلورسنت در میکروتیوب کنترل منفی (به جز کنترل داخلی)، می‌بایست آزمایش تکرار شود و احتمال بروز آلودگی وجود دارد.
- ممکن است عفونت همزمان رخ دهد و افزایش فلورسنت در همه‌ی کانال‌ها و یا دو کانال به غیر از کانال کنترل داخلی مشاهده شود (این اتفاق نادر است و ممکن است در بیماران دارای نقص در سیستم ایمنی مشاهده شود).
- در صورت منفی شدن نتایج هر چهار ژن، پیشنهاد بررسی ژن سایر ارگانیسم‌های مولد عفونت داده می‌شود.

نکته مهم:

- **از نتایج این کیت نباید به تنهایی جهت تشخیص (تائید یا رد ویروس) استفاده نمود و می‌بایست در تفسیر نتایج و اتخاذ تصمیم به کلیه یافته‌های بالینی، داده‌های آزمایشگاهی و اپیدمیولوژی توجه شود.**
- **به علت احتمال حضور عفونت همزمان، تفسیر نتایج باید با توجه به تمام داده‌های بالینی و آزمایشگاهی انجام شود.**

۱۰) محدودیت‌ها:

۱. این کیت برای تشخیص کیفی وجود SARS-CoV-2 RNA و Influenza A & B در نمونه‌های دستگاه تنفس فوقانی انسان استفاده می‌شود. نتایج نشان‌دهنده‌ی میزان ویروس در نمونه‌ها نمی‌باشد.

۲. تمام اطلاعات بالینی، آزمایشگاهی و اپیدمیولوژیک برای تفسیر باید در نظر گرفته شود، زیرا احتمال آلودگی وجود دارد.

۳. نمونه‌های مورد آزمایش باید مطابق با شرایط مشخص شده در دستورالعمل جمع‌آوری، پردازش، نگهداری و حمل شده باشند. زیرا ممکن است آماده‌سازی نمونه و انجام آزمایش به شیوه غلط منجر به دریافت نتایج نادرست شود.

۴. استخراج اسید نوکلئیک از نمونه‌های بالینی باید توسط کیت استخراج معتبر انجام شود. سایر روش‌های استخراج و سیستم‌های پردازش ارزیابی نشده‌اند.

۵. تقویت و شناسایی ویروس‌های ذکر شده با کیت چندمنظوره تشخیصی AP-RAD با دستگاه Real-Time PCR، Rotor-Gene Q 5plex (Qiagen) و ABI Step One Plus تصدیق شده است. استفاده از سایر دستگاه‌ها باید تائید شود.

۶. محدوده تشخیص (LOD) با اطمینان ۹۵٪ تعیین می‌شود. هنگامی که ویروس‌های مورد نظر با غلظتی مشابه با LOD در نمونه آزمایش وجود داشته باشند، احتمال پاسخ منفی کاذب کم است. هنگامی که ویروس در نمونه مورد آزمایش در غلظتی کمتر از LOD وجود داشته باشد، نیز احتمال یافتن آن‌ها وجود دارد.

۷. پرایمرها و پروب‌های این کیت، مناطق بسیار محافظت شده در ژنوم SARS-CoV-2 و Influenza A & B را مورد هدف قرار می‌دهند، که احتمال تشخیص متقاطع را منتفی می‌کند. بروز جهش در این مناطق بسیار حفاظت شده (اگرچه بسیار نادر است) می‌تواند منجر به غیر قابل تشخیص شدن RNA ویروس شود.

۸. نتایج منفی، نشان دهنده عدم ابتلا به ویروس‌های مورد نظر نیست و نباید تنها مبنای درمان یا سایر تصمیمات مدیریتی قرار گیرد.

۹. کارکنانی که مسئول بررسی و آنالیز هستند، می‌بایست پیش از انجام آزمایش با روند انجام آزمایش و تفسیر نتایج آشنایی داشته و آموزش دیده باشند.

۱۰. چنانچه تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه به علت جمع‌آوری، انتقال و استخراج نادرست به مقدار کافی نباشد، ممکن است جواب آزمایش منفی کاذب شود.

۱۱. چنانچه مقدار خیلی زیادی از الگوی RNA در واکنش وجود داشته باشد، ممکن است جواب آزمایش، منفی کاذب شود.

۱۱) ویژگی‌های عملکرد:

این کیت قادر به تشخیص همزمان ژنوم SARS-CoV-2 و Influenza A & B به عنوان مارکر اختصاصی و ژن *RNase P* به عنوان کنترل داخلی می‌باشد.

شرکت دانش بنیان 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: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۹

021-22920776

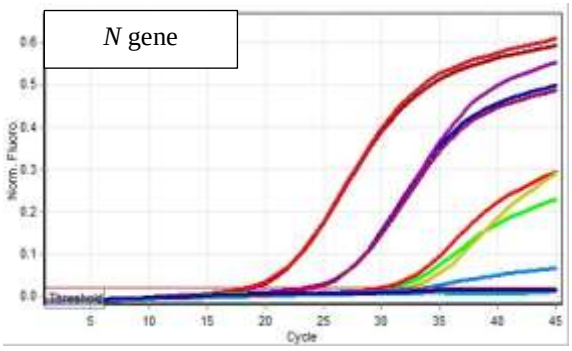
co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com

۱-۱۱) حساسیت آنالیتیکال (محدوده تشخیص یا LOD):

آزمایش‌های حساسیت آنالیتیکال (محدوده تشخیص یا LOD) برای تشخیص و تعیین کمترین غلظت SARS-CoV-2 و Influenza A & B انجام شد است که ۱۰۰٪ از replicate ها مثبت (مثبت حقیقی) شد. محدوده تشخیص (LOD) محاسبه شده کیت برای اندازه‌گیری SARS-CoV-2، ۰/۴ copy/µL، برای Influenza A، ۱ copy/µL و برای Influenza B، ۱/۷ copy/µL می‌باشد، که این امر، نشان‌دهنده حساسیت تشخیصی بالای کیت حتی در بیماران با اندک میزان ویروس نامبرده است، که این حالت به خصوص در بیمارانی که تحت درمان قرار دارند، غیر معمول نیست.

Multiplex One-step rRT-PCR kit for SARS-CoV-2, Influenza A & B (5 genes)	*Orf1b* gene		*N* gene		Influenza A		Influenza B	
	مثبت	منفی کاذب	مثبت	منفی کاذب	مثبت	منفی کاذب	مثبت	منفی کاذب
	۲۰	۰	۲۰	۰	۲۰	۰	۲۰	۰
حساسیت آنالتیکال	۱۰۰٪		۱۰۰٪		۱۰۰٪		۱۰۰٪	



شکل ۱) گراف مربوط به حساسیت آنالیتیکال *N* gene

۲-۱۱) حد آستانه مثبت:

با توجه به مطالعه‌ی مقدار مرجع، Ct مرجع برای ژن‌های هدف این کیت ≥ ۴۰ و برای کنترل داخلی ≥ ۳۵ می‌باشد.

۳-۱۱) اختصاصیت آنالیتیکال:

این کیت منحصراً قادر به شناسایی ژنوم SARS-CoV-2 و Influenza A & B می‌باشد. پرایمرها و پروب‌ها به گونه‌ای طراحی شده‌اند که با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای دیگر هیچگونه واکنش متقاطعی نداشته باشند. به منظور تائید اختصاصیت کیت Multiplex One-step rRT-PCR kit for SARS-CoV-2, Influenza A & B (5 genes) 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.

* میکروارگانیسم‌های ارزیابی شده در روش آنالیز آزمایشگاهی (WET) و آنالیز بیوانفورماتیک (In-Silico PCR) شامل موارد زیر می‌باشند:

Varicella zoster virus (VZV), Herpes simplex virus type I, Herpes simplex virus type II, *Mycoplasma pneumonia*, Respiratory syncytial virus (RSV), *Mycobacterium tuberculosis*, Cytomegalovirus (CMV), *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, Enteroviruses, *Pneumocystic Jirovecii*, *Candida Albicans*, *Aspergillus* SSP., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus haemolyticus*, Adenovirus, Human Alphaherpesvirus I, Human metapneumovirus, Human respirovirus III, Human parainfluenza virus I, Human Alphaherpesvirus II, Human parainfluenza virus 4a, Human parainfluenza virus 4b, Rice stripe tenuvirus, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Streptococcaceae*, Human alphaherpevirus III, Pneumocystis, and Cucumber mosaic virus.

۴-۱۱) دقت (Precision):

تست سنجش میزان تکرارپذیری (repeatability) این کیت انجام شد، که در ۱۰۰-۹۵ درصد موارد، نتایج تکرارهای همه نمونه‌ها با نتایج آزمایشگاه مرجع همخوانی داشت.

۵-۱۱) مطالعات بالینی:

جهت ارزیابی بالینی حساسیت و اختصاصیت کیت Multiplex One-step rRT-PCR kit for SARS-CoV-2, Influenza A & B (5 genes)، بر روی ۱۱۵ نمونه بالینی با نتیجه منفی و ۵۳ نمونه بالینی با نتیجه مثبت (۳۲ نمونه مثبت برای SARS-CoV-2، ۸ نمونه مثبت برای Influenza A و ۱۳ نمونه مثبت برای Influenza B) که از نمونه‌های دستگاه تنفسی فوقانی به دست آمده‌اند، آزمایش PCR انجام و نتایج به دست آمده با روش مرجع مقایسه و مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تمامی نمونه‌های مثبت، مثبت و نمونه‌های منفی، منفی گزارش شد و مطابقت ۱۰۰ درصدی داشت.

Orf1b gene

		روش مرجع	
		مثبت	منفی
Multiplex One-step rRT-PCR kit for SARS-CoV-2, Influenza A & B (5 genes)	مثبت	۳۲	۰
	منفی	۰	۲۴

حساسیت: ٪۱۰۰
اختصاصیت: ٪۱۰۰

N gene

		روش مرجع	
		مثبت	منفی
Multiplex One-step rRT-PCR kit for SARS-CoV-2, Influenza A & B (5 genes)	مثبت	۳۲	۰
	منفی	۰	۲۴

حساسیت: ٪۱۰۰
اختصاصیت: ٪۱۰۰

Influenza A

		روش مرجع	
		مثبت	منفی
Multiplex One-step rRT-PCR kit for SARS-CoV-2, Influenza A & B (5 genes)	مثبت	۸	۰
	منفی	۰	۴۸

حساسیت: ٪۱۰۰
اختصاصیت: ٪۱۰۰

Influenza B

		روش مرجع	
		مثبت	منفی
Multiplex One-step rRT-PCR kit for SARS-CoV-2, Influenza A & B (5 genes)	مثبت	۱۳	۰
	منفی	۰	۴۳

حساسیت: ٪۱۰۰
اختصاصیت: ٪۱۰۰

۱۲) کنترل کیفیت:

در این آزمایش، *Ribonuclease P* (*RNase P*) به عنوان کنترل داخلی یا ژن housekeeping در همان میکروتیوب تکثیر می‌شود و باید در تمامی میکروتیوب‌ها به جز میکروتیوب NTC در کانال نارنجی افزایش یابد.

۱۳) تداخل:

- ممکن است در اثر حمل یا انتقال آلودگی از سایر نمونه‌های مثبت به نمونه در حال آزمایش، نتیجه مثبت کاذب شود.
- عمدتا نتایج منفی کاذب، ناشی از روش‌های نادرست جمع‌آوری نمونه است.

۱۴) دفع پسماندها:

- دفع پسماندها را مطابق با استانداردهای ابلاغی و با توجه به روش‌های توصیه شده موجود انجام دهید.
- پسماندهای با منشاء انسانی به ویژه نمونه‌های مورد استفاده برای تشخیص مولکولی SARS-CoV-2 و Influenza A & B ممکن است احتمال آلودگی توسط میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را که در نمونه‌های بالینی وجود دارند افزایش دهند و باید همانند زباله‌های زیستی، ابتدا اتوکلاو شده و سپس با احتیاط امحا گردند. هنگام برخورد و دفع چنین نمونه‌هایی، اقدامات احتیاطی جهانی را به کار گیرید.

۱۵) 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

۱۶) 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	
قرارگیری به سمت بالا	
علائم خطر	

جهت ارتباط با واحد پشتیبانی با شماره ۰۹۰۲۴۳۲۲۴۱۳ تماس بگیرید.

تاریخ آخرین بازبینی ۱۴۰۳/۰۵

شرکت دانش بنیان 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: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۹

021-22920776

co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com