

نام محصول: کیت تشخیص COVID-19 با روش TaqMan Real Time PCR

مورد استفاده:

انجام آزمایش:

SARS-CoV-2 از خانواده کروناویروس بوده که دارای ساختار ژنومی RNA تک رشته سنس مثبت است. ذره ویروس معمولاً به شکل کروی با قطر ۸۰ تا ۱۲۰ نانومتر با میخک‌های تاجی روی سطح ویروس (تشبیه به تاج خورشید و علت نامگذاری) دیده می‌شود. این خانواده‌ی بزرگ از ویروس‌ها به طور معمول در بین مهره‌دارانی چون خفاش، شتر، گربه و ... گردش می‌کند. ویروس SARS-CoV-2 به عنوان جدیدترین عامل بیماری‌زای کروناویروس شناسایی شده است که می‌تواند باعث ایجاد پنومونی (ذات‌الریه) ویروسی و تنگی نفس در انسان شود. این کیت جهت سنجش کیفی RNA ویروس کرونا با استفاده از روش Real-time PCR بصورت تک مرحله ای در نمونه های تنفسی فوقانی (سواب نازوفارنکس و اوروفارنکس) طراحی شده است و نتایج حاصل از این کیت می‌تواند به عنوان یک عامل کمک کننده برای تشخیص بیماری COVID-19 حاصل از SARS-CoV-2 مورد استفاده قرار بگیرد.

نتایج حاصل از این کیت باید فقط برای شواهد بالینی استفاده شود و نباید به عنوان تنها استاندارد تشخیصی بیماری مورد استفاده قرار گیرد. پیشنهاد می‌شود که تشخیص بیماری از ترکیب نتایج آزمایشگاهی و معاینه‌ی فیزیکی بیمار به دست آید.

اصول روش کار:

مخلوط پروب و پرایمر این کیت به روش dual-target gene طراحی شده که توالی های ژنومی محافظت شده ناحیه RdRp و نوکلئوکسید پروتئین N را بصورت همزمان هدف قرار می‌دهد که با استفاده از مخلوط واکنش PCR ارائه شده در کیت، تکثیر این الگو می‌تواند به صورت کیفی و از طریق افزایش سیگنال فلورسانس توسط دستگاهها Real Time PCR اندازه گیری شود.

همچنین این کیت تشخیصی شامل یک مخلوط حاوی پروب و پرایمر کنترل داخلی (RNase P) می‌باشد که نتایج این کنترل باعث افزایش دقت پروسه سمپلینگ و استخراج جهت پرهیز از نتایج منفی کاذب می‌شود.

محتویات کیت:

این کیت شامل مخلوط های آزمایش Real Time PCR با فرمت ۱۰۰ تستی به شرح زیر می باشد.

ردیف	مخلوط	میزان
۱	مخلوط آنزیمی COVID-19 (لیوفیلیزه شده)	۱۰۰ تست/ ویال
۲	پرایمر-پروپ COVID-19	۱۲۰ میکرولیتر/ ویال
۳	بافر Real Time PCR (5X)	۴۵۰ میکرولیتر/ ویال
۴	کنترل مثبت PCR برای COVID-19	۹۰ میکرولیتر/ ویال
۵	کنترل منفی PCR برای COVID-19 (DEPC H <sub>2</sub> O)	۹۰ میکرولیتر/ ویال

شرایط نگهداری:

- مدت زمان مفید استفاده این کیت ۱۲ ماه بوده که تاریخ انقضای نیز بر روی کیت درج شده است.
- این کیت باید در تاریکی و در دمای  $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$  نگهداری شوند.
- مخلوط آنزیمی باقی مانده به مدت دو هفته در دمای یخچال پایدار می باشد.
- از ذوب و فریز شدن دوباره مخلوط‌ها تا حد امکان خودداری کنید.

ابزار هماهنگ با کیت:

این کیت قابلیت انجام در تمامی دستگاههای Real Time PCR دارای کانال های سایر FAM, HEX/VIC, RED/ROX را دارا می باشد.

مشخصات نمونه:

- نوع نمونه: سواب گلو و بینی
- شرایط نمونه‌گیری: جمع آوری براساس شرایط و نوع نمونه طبق پروتکل های موجود انجام گیرد.
- نگه‌داری و انتقال نمونه: نمونه‌ی دریافت شده می‌تواند بلافاصله برای آزمایش مورد استفاده قرار گیرد و یا در دمای  $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$  برای سه ماه و در دمای  $-70^{\circ}\text{C}$  برای مدت زمان طولانی نگه‌داری شود. از ذوب شدن و فریز شدن مکرر جلوگیری شود. نمونه‌ها در زمان ارسال به آزمایشگاه باید در محفظه‌ی بسته و در مجاورت یخ انتقال داده شوند.

آماده‌سازی پیش از آزمایش:

ابتدا با استفاده از راهنمای کیت استخراج اسید نوکلئیک ویروسی، RNA ویروس را بعنوان الگو از نمونه استخراج کنید. RNA استخراج شده می‌تواند مستقیماً برای آزمایش PCR استفاده شود و یا در غیر این صورت در دمای  $-70^{\circ}\text{C}$  نگه‌داری شود. از ذوب شدن و فریز شدن مکرر الگو (RNA) خودداری کنید.

توجه: این محصول شامل کیت استخراج RNA نبوده و با کیت Qiagen DSP Viral RNA و High Pure Viral Nucleic Acid Roche سازگار می‌باشد.

a-آماده‌سازی مخلوط‌ها (لطفاً در محل مناسب و استریل انجام شود):  
۱.آماده سازی مخلوط آنزیمی مایع: محتویات کیت را از داخل بسته بندی خارج کرده و اجازه دهید تا در دمای اتاق ذوب شود. پس از رسیدن دمای مخلوط به دمای اتاق، موارد ذیل را آماده کنید.

• به ویال حاوی آنزیم لیوفیلیزه، ۴۰۰ میکرولیتر مخلوط بافر آنزیمی و ۵۰۰ میکرولیتر آب (RNase Free) را اضافه کنید. محتویات را به آرامی و بدون ایجاد حباب، حداقل ۳ بار پیپت کرده، تا پودر آنزیم لیوفیلیزه کامل حل شود. درب ویال بطری را بسته و به مدت ۱۵ دقیقه آنکوباسیون در دمای اتاق انجام شود.

\*توصیه می‌شود که مخلوط واکنش آماده شده را پس از تهیه استفاده کنید، در غیر این صورت می‌توانید آن را به مدت دو هفته در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  و یا در حجم‌های مناسب در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  -نگه داری کنید.

۲.آماده سازی مخلوط واکنش: حجم نمونه مورد استفاده شده در این تست باید ۵ یا ۱۰ میکرولیتر باشد که براساس این حجم نمونه مورد آزمایش به یکی از ستون های جدول زیر برای آماده سازی مخلوط مراجعه کنید:

مواد مورد نیاز برای هر تست (۱x)	مواد مورد نیاز برای هر تست
میزان الگو (RNA)	برای میزان الگو ۵ میکرولیتر برای میزان الگو ۱۰ میکرولیتر
مخلوط آنزیمی آماده شده	۹ میکرولیتر
پرایمر-پروپ RdRp/N/ICON (FAM/HEX/ROX)	۱ میکرولیتر
آب (RNase Free)	۵ میکرولیتر
حجم نهایی	۱۵ میکرولیتر

با توجه به تعداد نمونه‌های مورد آزمایش و تعداد کنترل‌های مثبتی و منفی، مقدار تعیین شده از مخلوط‌ها را آماده و مخلوط کنید.

۳.اضافه کردن الگو (RNA)

• پس از آماده‌سازی مخلوط‌ها، مخلوط حاصل را به منطقه‌ی انجام آزمایش منتقل کنید و براساس میزان الگو مورد نظر طبق موارد زیر عمل کنید:

• میزان الگو ۵ میکرولیتری: براساس میزان الگو مورد نظر، مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه الگو، کنترل منفی و کنترل مثبت به مخلوط واکنش اضافه کنید. حجم نهایی باید ۲۰ میکرولیتر در هر ویال باشد.

• میزان الگو ۱۰ میکرولیتری: براساس میزان الگو مورد نظر، مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه الگو، ۱۰ میکرولیتر کنترل منفی و ۱۰ میکرولیتر کنترل مثبت به مخلوط واکنش اضافه کنید. حجم نهایی باید ۲۰ میکرولیتر در هر ویال باشد. سپس درب ویال‌ها را بسته و اسپین کنید.

۴- انجام آزمایش PCR

a. تیوپ‌ها را داخل دستگاه ترمال سایکلر قرار دهید. نام هر نمونه (نمونه مورد آزمایش، کنترل‌های مثبت و منفی) را وارد کنید.

b.انتخاب کانال Real Time:

• کانال‌های FAM (RdRp region) و HEX (N gene) را برای تشخیص ویروس COVID-19 انتخاب کنید.

• کانال ROX را برای تشخیص کنترل داخلی (RNase P gene) تنظیم کنید.

• لطفاً رنگ رفرنس داخلی (Passive Reference) را بر روی تنظیمات none قرار دهید (در صورت استفاده از دستگاههای شرکت ABI و مشابه).

c. شرایط پیشنهادی انجام آزمایش بر طبق جدول پیشنهادی زیر می‌باشد:

برنامه روتین QPCR				
ردیف	مرحله	دما	زمان	سیکل
۱	Reverse Transcription	$50^{\circ}\text{C}$	۲۰ دقیقه	۱
۱	cDNA Initial Denaturation	$95^{\circ}\text{C}$	۳ دقیقه	۴۵
	Denaturation	$94^{\circ}\text{C}$	۱۰ ثانیه	
۱	Annealing, Extension and Fluorescence measurement	$55^{\circ}\text{C}$	۴۰ ثانیه	۱
	Cooling	$25^{\circ}\text{C}$	۱۰ ثانیه	

پس از ذخیره کردن تنظیمات، فایل را ذخیره کرده و برنامه واکنش را راه‌اندازی کنید.

## تحلیل نتایج:

پس از پایان واکنش، نتایج به صورت اتوماتیک ذخیره شده و منحنی تکثیر تشخیص RNA هدف و کنترل داخلی به صورت جداگانه آنالیز می‌شوند.

### ۱- کنترل کیفی:

a. کنترل منفی COVID-19 PCR: تمام کانال‌های FAM، HEX و ROX (کنترل داخلی) نباید CT از خود نشان داده یا CT بالاتر از ۴۰ باشد.  
b. کنترل مثبت COVID-19 PCR: تمام کانال‌های FAM، HEX و ROX (کنترل داخلی) باید کمتر و یا مساوی از ۳۵ باشد.  
c. ملزومات بالا باید در هر آزمایش به طور همزمان برقرار باشد، در غیر این صورت آزمایش بی‌نتیجه بوده و ملزم به تکرار است.

### حد آستانه‌ی مثبت:

با توجه به مطالعه‌ی مقدار مرجع، CT مرجع برای ژن مورد هدف و ژن کنترل داخلی این کیت ۴۰ است.

### آنالیز نتایج:

۱- ابتدا باید منحنی تکثیر کنترل داخلی ROX آنالیز شود. اگر Ct کمتر از ۴۰ باشد، نشان‌دهنده‌ی این است که آزمایش قابل اعتماد بوده و کاربر می‌تواند به ادامه‌ی روند آنالیز نتایج بپردازد:

a. اگر یک منحنی S شکل تپیکال در هر دو کانال FAM و HEX یا یکی از آنها رسم شده باشد و Ct نیز کمتر از ۴۰ باشد نشان دهنده‌ی این امر است که ویروس SARS-CoV-2 در نمونه حضور دارد و نتیجه‌ی آزمایش مثبت است.

b. اگر یک منحنی S شکل تپیکال توسط کانال‌های FAM و HEX رسم نشده باشد یا Ct کمتر از ۴۰ نباشد نشان دهنده‌ی این امر است که ویروس SARS-CoV-2 در نمونه حضور نداشته و نتیجه‌ی آزمایش منفی است.

۲- اگر کنترل داخلی کانال ROX نتواند Ct را مشخص کند و یا Ct بیشتر از ۴۰ باشد، نشان‌دهنده‌ی این امر است که غلظت نمونه‌ی مورد آزمایش خیلی پایین است و یا یک واکنش محدود کننده در انجام آزمایش مداخله کرده است. در این صورت کاربر باید آزمایش را تکرار کند.

۳- برای نمونه‌های منفی، کنترل داخلی باید مثبت باشد، اگر کنترل داخلی منفی است نتایج قابل اتکا نمی‌باشد. دلیل این مسئله باید کشف و رفع شود. کاربر باید سمولینگ و انجام آزمایش را تکرار کند (اگر نتایج همچنان قابل اتکا نبود با تولید کننده‌ی دستگاه تماس بگیرد)

۴- مشخص کردن نتایج نامشخص (منطقه خاکستری): اگر سیگنال فلورسانس یک نمونه، افزایش قابل توجهی در کانال‌های FAM و HEX داشته باشد اما مقدار Ct بیشتر از ۴۰ باشد، نمونه در محدوده‌ی نامشخص است و باید آزمایش را تکرار کرد. اگر شرایط تغییری نکند باید نتیجه‌ی آزمایش را مثبت قلمداد کرد.

### محدودیت‌های روش تشخیصی:

۱- نتایج آزمایش این کیت فقط برای فرزنس بالینی هستند. تشخیص قطعی و درمان بیماران باید بر اساس علائم سابقه‌ی پزشکی و نتایج آزمایشگاهی دیگر و همچنین پاسخ به درمان تعیین شود.

۲- آنالیز احتمال نتایج منفی کاذب:

a. نمونه‌گیری نامناسب، پردازش، انتقال و همچنین غلظت کم نمونه می‌تواند باعث ایجاد نتایج منفی کاذب شود.

b. تنوع در توالی هدف ویروس SARS-CoV-2 و تغییرات توالی ایجاد شده از دلایل دیگر ایجاد نتایج منفی کاذب می‌باشد.

c. شرایط نگهداری نامناسب محلول‌ها می‌تواند باعث نتایج منفی کاذب شود.

d. دیگر مسائل مهار و محدود کننده‌ی PCR نیز می‌تواند باعث نتایج منفی کاذب شوند.

e. آلودگی‌های ایجاد شده در طول پردازش نمونه نیز باعث نتایج مثبت کاذب شود.

f. آزمایش باید بر اساس قوانین Good Laboratory Practice (GLP) انجام شود. اپراتور باید دقیقاً بر اساس راهنمای تولید کننده آزمایش را انجام دهد.

### عملکرد محصول:

۱- اختصاصیت تست: این کیت بر اساس توالی ژنی ویروس SARS-CoV-2 طراحی شده و قابلیت تشخیصی بالایی برای توالی ژنی مورد اشاره دارد. این کیت هیچ واکنش متقاطع با دیگر نمونه‌های مثبت کروناویروس، influenza A virus; influenza A(H1N1) virus and H3N2; influenza B virus; human rhinovirus; human coronavirus NL63, 229E, OC43; human parainfluenza viruses 1, 2, 3 and 4; human respiratory syncytial viruses A/B; human adenovirus; enterovirus; human parechovirus; Mycoplasma pneumoniae, Staphylococcus, haemophilus Influenza و همچنین نمونه‌های مثبت انسانی HIV, HBV, HCV, EBV, CMV, HPV, HSV1,2

با توجه به محدودیت دسترسی به نمونه‌های، Enterovirus, Chlamydia pneumoniae, Legionella pneumophila, Mycobacterium tuberculosis, Human Metapneumovirus, Steptococcus pyrogenes, Bordetella pertussis, Pneumocystis jirovecii, Candida albicans SARS- coronavirus, Mers-Coronavirus, تست اختصاصیت انجام نشد

\* میزان تشخیص نمونه‌های منفی تجاری فرنس ۱۰۰ درصد بودند که با توجه به

نتایج به دست آمده میزان اختصاصیت تست ۱۰۰ درصد می‌باشد.

۲- حساسیت تست: حداقل تعداد کپی قابل تشخیص (Limit of detection) در این تست ۲۰۰ کپی در میلی‌لیتر می‌باشد.

حساسیت تشخیصی و اختصاصیت تشخیصی: به طور همزمان روی ۴۰ نمونه مثبت با Ct های متفاوت و ۴۰ نمونه منفی، با استفاده از کیت پشتاز طب زمان و کیت دارای مجوز آزمایش انجام شد که نتایج همبستگی ۱۰۰٪ را نشان میداند.

### خطرات و پیشگیری‌ها:

۱- این محصول تنها قابلیت استفاده‌ی in-Vitro دارد. لطفاً پیش از استفاده راهنمای استفاده را با دقت مطالعه کنید.

۲- پرسنل آزمایشگاه باید آموزش دیده باشند و آشنایی کامل با روند و خطرات دستگاه‌ها داشته باشند. کنترل کیفی نیز باید برای هر آزمایش انجام شود.

۳- مدیریت آزمایشگاه باید طبق دستورالعمل‌های آزمایشگاه‌های PCR انجام شود. پرسنل آزمایشگاه باید به طور حرفه‌ای آموزش دیده باشند و پروسه‌ی آزمایش نیز باید به دقت به مراحل مختلف تقسیم شود. تمام وسایل نیز باید پیش از استفاده استریل شده باشند. تمام وسایل و امکانات نیز باید به هر مرحله‌ی آزمایش به صورت مجزا اختصاص داده شده و قابل انتقال به بخش دیگری نباشند.

۴- تمام نمونه‌ها باید به صورت بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند. پرسنل آزمایشگاه باید ملزومات پوشش حرفه‌ای و محافظ (PPE) را رعایت کنند که شامل استفاده از دستکش‌های

یک بار مصرف، عینک، گان یا روپوش آزمایشگاه می‌شود. دستکش‌ها بین هر نمونه باید مرتباً تعویض شده تا از ایجاد آلودگی‌های مهارکننده در روند آزمایش جلوگیری شود.

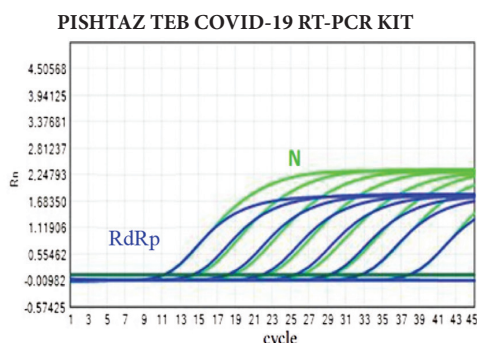
آزمایش‌های بالینی مربوط به نمونه‌هایی با احتمال عفونی بودن باید در یک کابینت (هود) کلاس 2 Class II Biological Safety Cabinet (BSC) in a BSL-2 facility انجام شود.

تست‌های تشخیصی باید از شرایط استاندارد آزمایشگاه BSL-2 facility شامل رعایت پیشگیری‌های استاندارد در زمان کار با نمونه‌ی بیمار پیروی کنند. برای دفع زباله‌ها از روند استاندارد پاتوژن‌های تنفسی دیگر پیروی کنید.

۵- این کیت به مدت ۷ روز در بسته‌بندی فومی با پک‌های یخ قابل حمل می‌باشد و دمای آن نیز باید کمتر از ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بوده تا از نیمه‌عمر محصول نکاهد.

### گزارش ارزیابی فنی کیت تشخیص ویروس SARS-CoV-2 با روش RT-PCR

گراف تکثیر:



براساس نتایج نشان داده شده در شکل بالا، مقادیر بدست آمده از سیکل ۱۱ تا ۴۰ مشاهده شد و گراف تکثیر بصورت S می‌باشد.

\* بازده واکنش (Efficiency): ۹۵ درصد

\* عرض از مبدا واکنش (Y-intercept): سیکل ۳۹

\* ضریب همبستگی واکنش ( $r^2$ ): ۰/۹۹۹

نسخه ششم - خرداد ۱۴۰۰

Use by	تاریخ انقضاء
LOT	شماره سری ساخت
SN	شماره سریال
Date of manufacture	تاریخ تولید
REF	شماره کاتالوک
Caution, consult accompanying documents	توجه به مدارک همراه
Manufacturer	تولید کننده
Contains sufficient for <n> tests	محتویات برای n تست کافیست
IVD	فراورده تشخیصی
Temperature limitation	محدوده دمای نگهداری



تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نیش خیابان یاسمن، پلاک ۱  
کدپستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳ تلفن ۰۰۰ ۱۹۷ ۴۲ (خط ویژه) پشتیبانی فنی ۱۹۷ ۱۹۷ ۴۲  
sms۳۰۰۰۷۱۴۰۲ info@pish tazteb.com www.pish tazteb.com

