

# Geneova

## Always one step Ahead

### راهنمای کیت مولکولی نسل جدید تشخیص ویروس SARS-CoV-2

نام محصول: GA SARS-CoV-2 OneStep RT-PCR Kit

کد محصول: GA-SARSV.100

خرداد ۱۴۰۱

IVD

معرفی

SARS-CoV-2 که در سال ۲۰۱۹ ظهور و همه گیر شد می تواند عامل ذات الریه، تنگی نفس و مرگ در انسان شود. این ویروس از خانواده کرونا ویریده، جنس بتاکروناویروس ها بوده که دارای RNA تک رشته سنس مثبت می باشد. ساختار ذره ویروس تقریباً کروی شکل با قطر ۶۰ تا ۱۴۰ نانومتر است که دارای میخک های تاجی شبیه به خورشید (کرونا) است<sup>۱</sup>. این کیت تشخیص کیفی ویروس SARS-CoV-2 را به روش TaqMan Real Time PCR در یک مرحله انجام داده که به عنوان روش گلد استاندارد تشخیص ویروس در نمونه های مورد سنجش شناخته می شود که می تواند به همراه علائم بالینی در تشخیص بیماری کووید - ۱۹ کمک کننده باشد. همچنین به علت طولانی شدن مدت زمان همه گیری این ویروس و ایجاد واریانت های خطرناکتر نسبت به واریانت کلاسیک ویروس، تشخیص افتراقی این واریانت ها می تواند در نحوه بیماری یابی، کنترل و برنامه ریزی های پیشگیری از این ویروس کمک کننده باشد. قابل ذکر است از قابلیت های این کیت علاوه بر تشخیص ویروس SARS-CoV-2 به عنوان روش گلد استاندارد، افتراق اولیه واریانت های دلتا و Sublineages واریانت امیکرون از یکدیگر می باشد که جنبه تحقیقاتی داشته و ارزش تشخیص ندارد.

### آماده سازی الگو پیش از آزمایش

الگو مورد نیاز برای انجام این تست، RNA ویروسی بوده که می توان طبق پروتکل استاندارد کیت های معتبر استخراج ژنوم ویروسی مانند Qiagen QIAamp DSP Viral RNA و High Pure Viral Nucleic Acid Roche و دیگر کیت های استخراج ژنوم ویروسی معتبر عمل کرد. RNA استخراج شده بصورت مستقیم قابل استفاده برای انجام آزمایش می باشد و در غیر اینصورت RNA استخراج شده را در دمای ۷۰ °C - درجه نگهداری کنید. همچنین تا حد امکان از فریز و دفریز کردن مکرر نمونه RNA خودداری کنید.

### آماده سازی مخلوط واکنش

محتویات کیت را از داخل جعبه آن خارج کنید و اجازه دهید تا به دمای اتاق رسیده و کامل بصورت مایع درآیند. پس از رسیدن محلول ها به دمای اتاق، چند ثانیه ویال ها را اسپین کنید و سپس طبق موارد زیر عمل کرده و هر تیوب واکنش را آماده کنید:

۱. ابتدا به هر کدام از تیوب های واکنش ۱۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش SARS-CoV-2 Mastermix (حاوی مواد مورد نیاز واکنش و پرایمر و پروب) اضافه کنید. در صورت تعداد نمونه کم، مخلوط واکنش را حتماً الیکوت کنید

### اضافه کردن الگو (RNA) به مخلوط واکنش

۲. پس از آماده سازی مخلوط واکنش، مخلوط های حاصل را به منطقه تمیز انجام آزمایش منتقل کنید.

✦ تیوب های نمونه های مجهول: به هر کدام از تیوب های واکنش مورد سنجش، ۱۰ میکرولیتر الگو RNA اضافه کنید.

✦ تیوب کنترل منفی: به هر کدام از تیوب های واکنش کنترل منفی، ۱۰ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز اضافه کنید.

سپس درب تیوب های موارد ۲ را بسته و اسپین کنید (در صورت استفاده از دستگاه های Real Time PCR دارای روتور چرخان نیازی به اسپین کردن تیوب ها نمی باشد).

## تست

مخلوط پرایمر و پروب این کیت به صورت Triple target gene بوده که نواحی هدف از ژنهای N و ORF1a و ویروس SARS-CoV-2 را شناسایی کرده که در صورت شناسایی توسط مخلوط واکنش موجود در کیت این نواحی تکثیر شده و آزاد سازی سیگنال فلورسینس ایجاد شده توسط دستگاه Real Time PCR سنجش می شود.

کنترل داخلی در این کیت شامل یک طراحی پرایمر و پروب اختصاصی برای RNA ژن RNase P بصورت اندوژن می باشد که علاوه بر بررسی مراحل نمونه برداری و استخراج الگو، کیفیت قابل قبول RNA استخراج شده را مشخص کرده تا مانع از نتایج منفی کاذب شود.

## محتویات کیت

این کیت حاوی موارد مورد نیاز آزمایش به فرمت ۱۰۰ تستی بوده که به شرح زیر می باشد:

ردیف	محلول	مقادیر	تعداد
۱	SARS-CoV-2 Mastermix	۵۰۰ میکرولیتر در هر ویال	۲ ویال ۵۰ تستی (M1, M2)
۲	SARS-CoV-2 Positive Control	۱۰۰ میکرولیتر در هر ویال	۱ ویال
۳	SARS-CoV-2 Negative Control	۱۰۰ میکرولیتر در هر ویال	۱ ویال

## شرایط نگهداری

۱. دمای نگهداری این کیت  $20 \pm 5^{\circ}C$  می باشد.

۲. از فریز و دفریز شدن محلولهای موجود در کیت تا حد امکان خودداری کنید.

۳. مدت زمان استفاده از محتویات این کیت تا ۱ سال بعد از زمان تولید می باشد، تاریخ انقضاء کیت بر روی کیت درج شده است.

## دستگاههای هماهنگ با کیت

این کیت قابلیت انجام در تمامی دستگاههای Real Time PCR دارای کانالهای FAM, HEX, TEXAS RED, CY5 (سبز، زرد، نارنجی و قرمز) را دارد.

## مشخصات نمونه

۱. نمونه مورد استفاده در این کیت به منظور شناسایی ویروس SARS-CoV-2 بطور معمول استفاده از ترشحات تنفسی مانند نمونه اوروفارنکس و نازوفارنکس می باشد.

۲. شرایط نمونه گیری: جمع آوری نمونه بر اساس پروتکل استاندارد مطابق با نوع نمونه انجام شود.

۳. نگهداری و انتقال نمونه: نمونه های جمع آوری شده بلافاصله برای انجام آزمایش قابل استفاده هستند که باید در زمان ارسال به آزمایشگاه در محفظه ی بسته و در مجاورت یخ انتقال انجام شود. همچنین نگهداری نمونه در دمای  $4^{\circ}C$  برای ۲ روز، دمای  $20^{\circ}C$  - برای ۳ ماه و دمای  $70^{\circ}C$  - برای مدت طولانی تر قابل انجام است. تا حد امکان از فریز و دفریز کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.

\* تیوب کنترل مثبت: در یک فضای دیگر و دور از محوطه آماده سازی سایر مخلوطهای واکنش به تیوب واکنش کنترل مثبت، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط کنترل مثبت موجود در کیت اضافه کنید.

میزان مورد نیاز برای هر تست	مواد مورد نیاز برای هر تست
۱۰ میکرولیتر	مخلوط واکنش (SARS-CoV-2 Mastermix) حاوی موارد مورد نیاز برای انجام واکنش و پرایمر و پروب (N, RNase P, S and ORF1a) FAM, HEX, Texas Red and CY5
۱۰ میکرولیتر	الگو (RNA، کنترل منفی یا کنترل مثبت)
۲۰ میکرولیتر	حجم نهایی واکنش

## انجام واکنش Real Time PCR

۱. نام گذاری نمونه ها:

تیوبها را داخل دستگاه Real Time PCR قرار داده و بعد از آن هر کدام از تیوبها (نمونه های مجهول، کنترل مثبت و کنترل منفی) را نام گذاری کنید.

۲. انتخاب کانال سنجش:

کانال سبزی یا FAM را برای تشخیص نواحی N از ویروس SARS-CoV-2، کانال زرد یا HEX برای تشخیص ژن RNase P به عنوان کنترل داخلی، کانال نارنجی یا TEXAS RED برای تشخیص ناحیه S از ویروس SARS-CoV-2 و کانال قرمز یا CY5 برای تشخیص ناحیه ORF1a از ویروس SARS-CoV-2 را در دستگاه Real Time PCR انتخاب کنید

۳. برنامه دمایی و زمانی واکنش مورد نظر مطابق با شرایط جدول زیر می باشد:

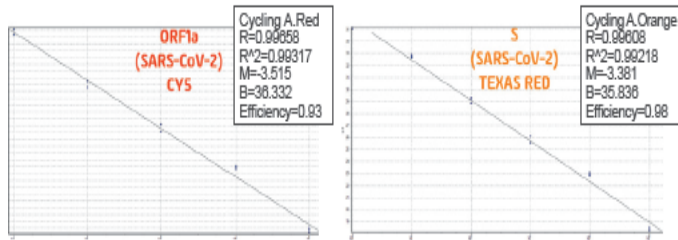
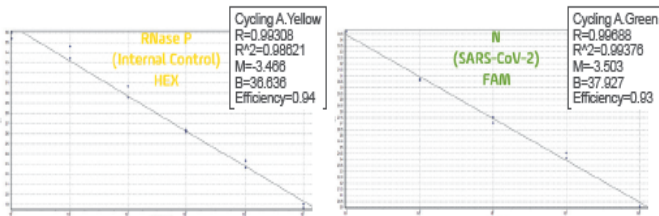
برنامه دمایی و زمانی استاندارد کیت GA SARS-CoV-2 OneStep RT-PCR			
ترتیب واکنش	مرحله	دما	زمان
۱	cDNA synthesis	$53^{\circ}C$	۱۵ دقیقه
۲	Holding	$95^{\circ}C$	۳ دقیقه
۳	Denaturation	$93^{\circ}C$	۵ ثانیه
		Anneling, Extension and fluorescence measurement	PCR cycling
۴			

پس از ایجاد برنامه و تنظیمات جدید، فایل مورد نظر را ذخیره و شروع انجام واکنش را راه اندازی کنید.

## تحلیل نتایج

پس از انجام و خاتمه واکنش، نتایج ذخیره شده را مطابق با جدول زیر آنالیز کنید:

جدول نمونه ارزیابی بالینی کیت GA SARS-CoV-2 OneStep RT-PCR		
نوع نمونه	نتیجه با کیت تجاری کمپانی X تشخیص ویروس SARS-CoV-2 به روش Onestep RT-PCR	نتیجه با کیت GA SARS CoV-2 onestep RT-PCR
نمونه منفی از نظر SARS-CoV-2	۲۰۰ نمونه منفی	۲۰۰ نمونه منفی
نمونه مثبت از نظر SARS-CoV-2	۲۰۰ نمونه مثبت	۲۰۰ نمونه مثبت (شامل ۱۵۰ نمونه با واریانت B.1.1.7 و پنجاه نمونه با واریانت کلاسیک)
نمونه های مثبت از نظر واریانت های آلفا، بتا، دلتا و امیکرون تایید شده توسط انستیتو پاستور ایران	-----	افتراقی ۱۰۰ درصدی واریانت های آلفا، بتا، دلتا و امیکرون از یکدیگر



منحنی استاندارد ژن N، RNase P و S، زرد، نارنجی و قرمز

کمترین حد تشخیص (LOD) برای ژن N برابر با ۱۰۰ کپی، برای ژن S برابر با ۵۰ کپی و برای ژن ORF1a برابر با ۲۰۰ کپی می باشد که دارای حساسیت بالای ۹۷/۹ درصد در تکرار ۴۸ تایی با حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر است. رنج دینامیک و رنج خطی کیت موجود برابر با ۱۰<sup>۱</sup> تا ۱۰<sup>۹</sup> می باشد. عرض از مبدا واکنش (میزان Cq قابل قبول در کمترین کپی) در سیکل ۴۰ بوده و ضریب همبستگی واکنش (r<sup>2</sup>) یا میزان تطابق با منحنی استاندارد در حدود ۰.۹۹ درصد می باشد. همچنین بازده واکنش در ۴ ژن برابر با ۹۳ تا ۹۸ درصد است.

★ حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰ درصدی در تشخیص و افتراق دو حذف شدگی مورد نظر در ناحیه S و ORF1a

## خطرات و پیشگیری

۱. لطفا پیش از استفاده راهنمای کیت را با دقت مطالعه کنید. پرسنل آزمایشگاه باید آموزش دیده و آشنایی کامل با روند و خطرات دستگاه ها را داشته باشند. تمام وسایل و امکانات باید پیش از استفاده استریل بوده و این وسایل جابه جایی بین بخش های مختلف PCR در آن دیده نشود. در واقع هر بخش باید وسایل و مواد مختص به خود را داشته باشد.

مراحل	حالت مورد نظر	رد یا قبول بودن واکنش
مرحله اول بررسی کنترل مثبت	بدون گراف تکثیر یا سیگنال سیگمونی با میزان فلورسنس غیرقابل قبول در هر کدام از کانال ها	قبول - عدم آلودگی مخلوط واکنش
	داشتن سیگنال سیگمونی و Cq بالاتر از ۴۰ در هر کدام از کانال ها	قبول با یک شرط - در این حالت تنها نمونه های بیمارانی دارای Cq با فاصله حداقلی ۶ سیکل از آلودگی در کانال مربوطه را می توان به عنوان نمونه های دارای ژنوم ویروس مورد قبول دانست.
	داشتن سیگنال سیگمونی و Cq بالاتر از ۳۵ در هر کدام از کانال ها	قبول با شرط - در این حالت تنها نمونه های دارای Cq با فاصله حداقلی ۶ سیکل از آلودگی در کانال مربوطه را می توان به عنوان نمونه های دارای ژنوم ویروس مورد قبول می باشد
تایید نتایج	داشتن سیگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۳۵ در هر کدام از کانال ها	رد واکنش و تکرار دوباره واکنش بعد از حذف آلودگی - هر کدام از کانال ها با داشتن آلودگی Cq کمتر از ۳۵ قابل تفسیر نمی باشند.
	داشتن سیگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۳۵ در همه کانال ها	قبول - عملکرد صحیح پرایمر و پروب، مخلوط واکنش و عدم تخریب کنترل مثبت یا دیگر اجزای واکنش که نشان از نگهداری صحیح آن دارد
	داشتن سیگنال سیگمونی اما Cq بالاتر از ۳۵ در هر کدام از کانال ها	رد واکنش - تخریب کنترل مثبت یا یکی دیگر از اجزای واکنش که نشان از عدم نگهداری صحیح آن دارد. در صورت مثبت بودن نمونه های تحت بررسی می توانید از این عیب صرف نظر کنید

۱. کانال زرد یا HEX دارای سیگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۳۵ می باشد و دیگر کانال ها دارای سیگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۴۰ نمی باشد.	قبول واکنش - استخراج RNA و انجام واکنش سنتز cDNA به درستی انجام گرفته است و واکنش از نظر وجود ویروس SARS-CoV-2 و سایر واریانت ها منفی می باشد
۲. کانال FAM دارای سیگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۴۰ می باشد و بقیه کانال های منفی می باشند.	نمونه از نظر وجود ویروس SARS-CoV-2 مثبت و احتمالاً از نوع واریانت امیکرون (زیر واریانت BA.4 یا BA.5) می باشد و جهت تایید نهایی نیازمند انجام توالی یابی است.
۳. کانال FAM و Texas Red دارای سیگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۴۰ می باشد.	نمونه از نظر وجود ویروس SARS-CoV-2 مثبت و احتمالاً از نوع واریانت امیکرون (زیر واریانت BA.2 یا BA.2.12.1) می باشد و جهت تایید نهایی نیازمند انجام توالی یابی است.
۴. کانال FAM و CY5 دارای سیگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۴۰ می باشد.	نمونه از نظر وجود ویروس SARS-CoV-2 مثبت و احتمالاً از نوع واریانت امیکرون (زیر واریانت BA.1) می باشد و جهت تایید نهایی نیازمند انجام توالی یابی است.
۵. کانال FAM و Texas Red و CY5 دارای سیگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۴۰ می باشد.	نمونه از نظر وجود ویروس SARS-CoV-2 مثبت و احتمالاً از نوع واریانت دلتا می باشد و جهت تایید نهایی نیازمند انجام توالی یابی است.
۶. فقط کانال TEXAS Red به تنهایی یا همراه با CY5 دارای سیگنال سیگمونی بوده و Cq کمتر از ۴۰ می باشد	قبول واکنش و نمونه از نظر وجود ویروس SARS-CoV-2 مثبت می باشد و احتمالاً ویروس دارای جهش در ژن N می باشد جهت تایید نهایی نیازمند انجام توالی یابی است.

★ برای تعیین احتمالی نوع واریانت حتما باید میزان Cq بدست آمده در کانال سبز کمتر از ۳۳ باشد

### حد آستانه مثبت

با توجه به مطالعه مقدار مرجع، Cq مرجع برای ژن های مورد نظر تا مقدار ۴۰ با داشتن شرایط ذکر شده قابل قبول است.

### محدودیت های روش تشخیص

۱. زمان نمونه گیری و انجام نمونه گیری نامناسب، انتقال نادرست، پردازش نامناسب نمونه، شرایط بد نگهداری کیت، عدم صحیح انجام واکنش توسط کاربر می تواند باعث ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.

۲. آلودگی نمونه به بعضی مواد یا داروهای خاص و یا آلودگی در حین پردازش نمونه می تواند باعث ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.

۲. این کیت تنها قابلیت استفاده در شرایط آزمایشگاهی را دارد و کاربرد دیگری برای آن متصور نیست. همچنین کنترل کیفی برای هر آزمایش انجام شود.

۳. مدیریت آزمایشگاه طبق دستورالعمل های آزمایشگاه های مولکولی انجام گیرد. تمام نمونه ها باید به صورت بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند و باید در یک فضا یا هود با کلاس ایمنی زیستی سطح II نمونه مورد پردازش قرار گیرد. پرسنل تمامی تمهیدات لازم مانند تجهیزات حفاظت شخصی (PPE) که شامل استفاده از دستکش های یکبار مصرف، عینک، گان یا روپوش آزمایشگاهی می شود را رعایت کند. به همراه این کیت لوازم نمونه گیری، نگهداری نمونه، استخراج ژنوم، سرسپیلر و لوازم محافظتی شخصی مورد نیاز وجود ندارد که لازم است قبل از استفاده تهیه شود.

۴. مراحل کار باید طبق شرایط استاندارد آزمایشگاه در پیشگیری از ایجاد آلودگی و عفونت انجام گیرد. همچنین شرایط دفع زباله های عفونی این تست به مانند دیگر عوامل بیماری زای تنفسی می باشد.

۵. شرایط نگهداری این کیت به مدت ۷ روز در دمای یخچال یا در پک های یخی می باشد که برای نگهداری طولانی مدت و حفظ نیمه عمر محصول آن را در دمای ۲۰°C - قرار دهید.

### عملکرد و ارزیابی محصول

پرایمر و پروب های این کیت براساس توالی ژنی اختصاصی ویروس SARS-CoV-2 طراحی شده است و توانایی بالایی در شناسایی این توالی از خود نشان داده است. همچنین طراحی انجام شده هیچ واکنش متقاطع با دیگر عوامل بیماری زای تنفسی مانند آنفلوانزا A، B، C آنفلوانزا خوکی و پرندگان، جنس های انسانی کرونا ویروس مانند OC43، MERS، NL63، 229E، HKU1، آدنو ویروس، RSV، پارا آنفلوانزا ۱ و ۲، انترو ویروس، هرپس ویروس ها و باکتری های تنفسی در تست *in silico* و به استناد ارزیابی FDA آمریکا از خود نشان نداده است.