

نام محصول: کیت تشخیص ویروس کرونا و آنفلوانزا با روش TaqMan Real Time PCR

مورد استفاده:

SARS-CoV-2 از خانواده کروناویروس بوده که دارای ساختار ژنومی RNA تک رشته است. این ویروس به عنوان جدیدترین عامل بیماری زای کروناویروس شناسایی شده است که می تواند باعث ایجاد پنومونی (ذات الریه) و پروسی شود.

Influenza از خانواده ارتومیکسوویروس بوده که باعث عفونت بینی، گلو و ریه می گردد. آنفلوآنزای A و B از مهم ترین انواع آنفلوآنزای انسانی می باشند.

کیت طراحی شده جهت سنجش کیفی RNA ویروس کرونا و آنفلوآنزای A و B با استفاده از روش Real-time PCR به صورت تک مرحله ای از نمونه های تنفسی فوقانی (سواب اوروفارنکس و نازوفارنکس) طراحی شده است و نتایج حاصل از این کیت می تواند به عنوان یک عامل کمک کننده برای تشخیص بیماری آنفلوآنزا و کرونا به منظور انتخاب درمان مناسب مورد استفاده قرار بگیرد. کیت توانایی تفرق بین آنفلوآنزای A و B را ندارد.

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

اصول روش کار:

مخلوط پرایمر و پروب این کیت توالی های محافظت شده ناحیه RdRp ویروس کرونا، M2 ویروس آنفلوآنزای A و NS1 آنفلوآنزای B به صورت همزمان هدف قرار می دهد که با استفاده از مخلوط واکنش PCR ارائه شده در کیت، تکثیر این الگوها می تواند 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) می باشد که نتایج این کنترل باعث افزایش دقت پروسه سمپلینگ و استخراج جهت پرهیز از نتایج منفی کاذب می شود.

محتویات کیت:

این کیت شامل مخلوط های آزمایش Real Time PCR با فرمت ۹۰ تستی به شرح زیر می باشد.

| ردیف | محتول | میزان |
|------|--|---------------------|
| ۱ | مخلوط آنزیمی (لیوفیلیزه شده) | ۹۰ تست/ ویال |
| ۲ | پرایمر- پروب | ۴۵۰ میکرولیتر/ ویال |
| ۳ | بافر Real Time PCR (5X) | ۴۰۰ میکرولیتر/ ویال |
| ۴ | کنترل مثبت PCR | ۹۰ میکرولیتر/ ویال |
| ۵ | کنترل منفی PCR (DEPC Treated H ₂ O) | ۹۰ میکرولیتر/ ویال |

تجهیزات مورد نیاز:

سمپلر ۱-۱۰ میکرولیتری و سرسمپلر فیلتردار متناسب با سمپلر، دستگاه Real time PCR با حداقل ۳ کانال، استریپ مناسب دستگاه

شرایط نگهداری:

- مدت زمان مفید استفاده این کیت ۱۲ ماه بوده که تاریخ انقضاء 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 محلول ها 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, TEXAS RED/ROX را دارا می باشد.

مشخصات نمونه:

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

آماده سازی پیش از آزمایش:

ابتدا با استفاده از راهنمای کیت استخراج اسید نوکلئیک و پروسی، RNA ویروس را به

عنوان الگو از نمونه استخراج کنید. RNA استخراج شده می تواند مستقیماً برای آزمایش PCR استفاده شود و یا در غیر این صورت در دمای 70°C - نگهداری شود. از ذوب شدن و فریز شدن مکرر الگو (RNA) خودداری کنید.

انجام آزمایش:

a - آماده سازی محلول ها (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 محلول 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

پیست کرده، تا پودر آنزیم لیوفیلیزه کامل حل شود.

*توصیه می شود که مخلوط واکنش آماده شده را پس از تهیه استفاده کنید، در غیر این صورت می توانید آن را به مدت دو هفته در دمای 2°C و یا در حجم های مناسب در دمای 20°C - نگهداری کنید.

۲. آماده سازی مخلوط واکنش: به جدول زیر برای آماده سازی مخلوط مراجعه کنید:

| میزان برای هر تست | مواد مورد نیاز برای هر تست |
|-------------------|----------------------------|
| ۱۰ میکرولیتر | مخلوط آنزیمی آماده شده |
| ۵ میکرولیتر | پرایمر- پروب |
| ۵ میکرولیتر | الگو (RNA) |
| ۲۰ میکرولیتر | حجم نهایی |

با توجه به تعداد نمونه های مورد آزمایش و تعداد کنترل های مثبت و منفی، مقدار تعیین شده از محلول ها را آماده و مخلوط کنید.

۳. اضافه کردن الگو (RNA)

• پس از آماده سازی محلول ها، مخلوط حاصل را به منطقه ای انجام آزمایش منتقل کرده و به صورت زیر عمل کنید:

مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه الگو، ۵ میکرولیتر کنترل منفی و ۵ میکرولیتر کنترل مثبت به مخلوط واکنش اضافه کنید. حجم نهایی باید ۲۰ میکرولیتر در هر ویال باشد. سپس درب ویال ها را بسته و اسپین کنید.

۴- انجام آزمایش PCR

a. تیوپ ها را داخل دستگاه ترمال سایکلر قرار دهید. نام هر نمونه (نمونه مورد آزمایش، کنترل های مثبت و منفی) را وارد کنید.

b. انتخاب کانال Real Time:

• کانال های (M2, NS1 region) ROX و (RdRp gene) FAM را برای تشخیص ویروس ها انتخاب کنید.

• کانال HEX 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 می باشد:

| برنامه روتین QPCR | | | | |
|-------------------|---|----------------------|----------|------|
| ردیف | مرحله | دما | زمان | سیکل |
| 1 | Reverse Transcription | 50°C | 20 دقیقه | 1 |
| 2 | cDNA Initial Denaturation | 95°C | 3 دقیقه | 1 |
| 3 | Denaturation | 95°C | 10 ثانیه | 45 |
| 4 | Annealing, Extension and Fluorescence measurement | 60°C | 30 ثانیه | |
| 5 | Cooling | 25°C | 10 ثانیه | 1 |

پس از ذخیره کردن تنظیمات، فایل را ذخیره کرده و برنامه واکنش را راه اندازی 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:

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

آنالیز نتایج:

- ابتدا باید منحنی تکثیر کنترل داخلی HEX آنالیز شود. اگر Ct کمتر از ۳۲ باشد، نشان‌دهنده این است که آزمایش قابل اعتماد بوده و کاربر می‌تواند به ادامه‌ی روند آنالیز نتایج بپردازد.
- اگر یک منحنی S شکل تیبیکال در کانال FAM رسم شده باشد و Ct نیز کمتر از ۳۸ باشد نشان دهنده این امر است که ویروس کرونا در نمونه حضور دارد و نتیجه آزمایش برای ویروس کرونا مثبت است.
- اگر یک منحنی S شکل تیبیکال در کانال ROX رسم شده باشد و Ct نیز کمتر از ۳۷ باشد نشان دهنده این امر است که ویروس آنفلوانزای A یا B در نمونه حضور داشته و نتیجه آزمایش برای ویروس آنفلوانزا مثبت است.
- اگر منحنی S شکل تیبیکال در هیچ یک از دو کانال FAM و ROX رسم نشده باشد و Ct نیز کمتر از ۳۸ و ۳۷ نباشد نشان دهنده این امر است که ویروس آنفلوانزا و کرونا در نمونه حضور نداشته و نتیجه آزمایش برای هر دو ویروس منفی است.
- 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 سмпلینگ و انجام آزمایش را تکرار کند (اگر نتایج همچنان قابل اتکا نبود با تولید کننده‌ی دستگاه تماس بگیرید).

محدودیت‌های روش تشخیصی:

- آنالیز احتمال نتایج منفی کاذب:
 - نمونه‌گیری نامناسب، پردازش، انتقال و همچنین غلظت کم نمونه می‌تواند باعث ایجاد نتایج منفی کاذب شود.
 - تنوع در توالی هدف ویروس SARS-CoV-2 و تغییرات توالی ایجاد شده از دلایل دیگر ایجاد نتایج منفی کاذب می‌باشد.
 - شرایط نگهداری نامناسب محلول‌ها می‌تواند باعث نتایج منفی کاذب شود.
 - دیگر مسائل مهار و محدود کننده‌ی PCR نیز می‌تواند باعث نتایج منفی کاذب شوند.
- آلودگی‌های ایجاد شده در طول پردازش نمونه نیز باعث نتایج مثبت کاذب می‌شود.
- 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 و آنفلوانزا طراحی شده و قابلیت تشخیصی بالایی برای توالی ژنهای مورد اشاره دارد. این کیت هیچ واکنش متقاطع با دیگر نمونه‌های مثبت کروناویروس، human rhinovirus; human coronaviruses NL63, 229E, OC43; human parainfluenza viruses 1, 2, 3 and 4; human respiratory syncytial viruses A/B; human adenovirus; enterovirus; human parechovirus; Mycoplasma pneumonia, Staph-HIV, ylococcus, haemophilus Influenza، و همچنین نمونه‌های مثبت انسانی، HBV، HCV، EBV، CMV، HPV، HSV1,2، Entrovirus، Chlamydia pneumonia، با توجه به محدودیت دسترسی به نمونه‌های، 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 رفرنس، 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 ۱۰۰ نمونه مثبت با Ct متفاوت و ۴۰ نمونه منفی، با استفاده از کیت پیشنهادی زمان و کیت دارای مجوز آزمایش صورت پذیرفت که نتایج حساسیت تشخیصی و اختصاصیت تشخیصی ۱۰۰٪ را نشان دادند.

لازم به ذکر است بر اساس ارزیابی آزمایشگاه مرجع غذا و دارو روی ۴۰ نمونه مثبت کرونا، ۱۰ نمونه مخلوط آنفلوانزای A و B و ۳۰ نمونه مخلوط کرونا و آنفلوانزا، حساسیت کیت برای ویروس کرونا ۹۸٫۵٪ و برای ویروس آنفلوانزای A/B ۱۰۰٪ اعلام گردید.

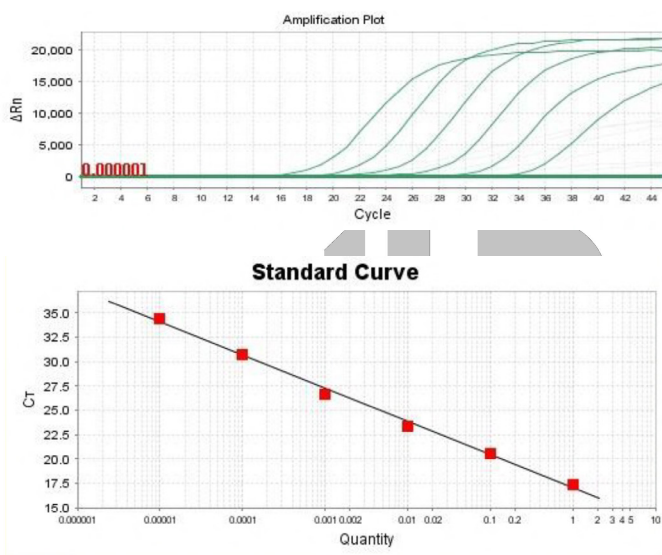
خطرات و پیشگیری‌ها:

- این محصول تنها قابلیت استفاده‌ی in-Vitro دارد. لطفاً پیش از انجام تست راهنمای استفاده را با دقت مطالعه کنید.
- 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.
- 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.
- 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 ۲ (Class II Biological Safety Cabinet (BSC)) انجام شوند. تست‌های تشخیصی باید از شرایط استاندارد آزمایشگاه 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 نگاهداری.

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

گراف تکثیر:



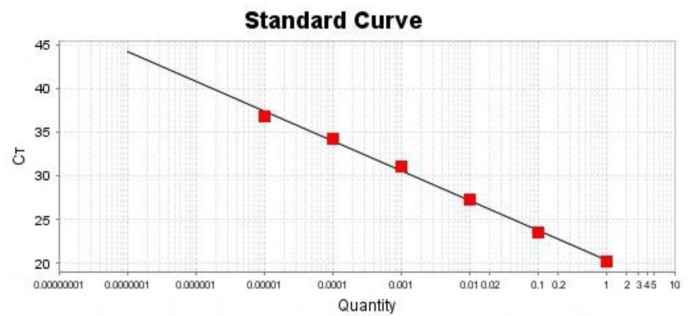
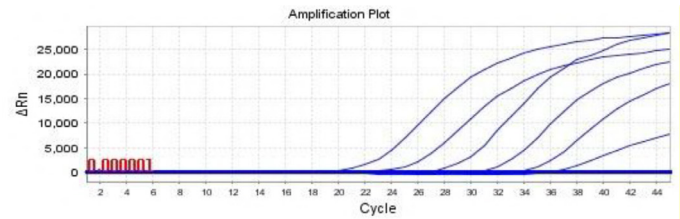
covid Standards Amplification plot

Amplification Efficiency:96%

R²:0.996

References:

1. <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/index.htm>
2. http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/collaborating_centres/list/en/index.html
3. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
4. CLSI. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods. 2nd ed. CLSI guideline MM13. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020
5. WHO. Global Alert and Response (GAR). Transport of infectious substances. http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_9/en/. Accessed 5 August 2020



Influenza A&B Standards Amplification plot

Amplification Efficiency:109%

R²:0.993

اندازه گیری میزان دقت :

نتایج مطالعه ای که به منظور بررسی دقت سنجش کیت SARS-FLU OneStep RT-PCR تولید شده توسط شرکت پیشتاز به صورت intra و inter و تکرارپذیری انجام شد، به اختصار آورده شده است.

نتایج :

Inter Assay

مربوط به نمونه کرونا

| Sample | No. of Tests | Mean Ct | SD | CV% |
|-----------------|--------------|--------------|------|------|
| Negative | 20 | undetectable | - | - |
| Weakly Positive | 20 | 34.51 | 1.61 | 4.66 |
| Positive | 20 | 24.34 | 0.56 | 2.30 |

مربوط به نمونه آنفولانزا

| Sample | No. of Tests | Mean Ct | SD | CV% |
|-----------------|--------------|--------------|------|------|
| Negative | 20 | undetectable | - | - |
| Weakly Positive | 20 | 32.86 | 1.67 | 5.08 |
| Positive | 20 | 23.72 | 0.32 | 1.34 |

Intra Assay

مربوط به نمونه کرونا

| Sample | No. of Tests | Mean Ct | SD | CV% |
|-----------------|--------------|--------------|------|------|
| Negative | 20 | undetectable | - | - |
| Weakly Positive | 20 | 33.21 | 1.63 | 4.90 |
| Positive | 20 | 23.91 | 0.44 | 1.84 |

مربوط به نمونه آنفولانزا

| Sample | No. of Tests | Mean Ct | SD | CV% |
|-----------------|--------------|--------------|------|------|
| Negative | 20 | undetectable | - | - |
| Weakly Positive | 20 | 32.43 | 1.7 | 5.24 |
| Positive | 20 | 25.89 | 0.62 | 2.39 |

نتیجه: با توجه به نتایج بدست آمده، CV حاصل از بررسی تست در رنج مشخص شده (کمتر از ۱۰) بوده و عملکرد کیت مورد نظر قابل قبول می باشد.

| | | |
|--|---|----------------------------|
| | Use by | تاریخ انقضاء |
| | Batch code | شماره سری ساخت |
| | Date of manufacture | تاریخ تولید |
| | Catalog number | شماره کاتالوگ |
| | Caution, consult accompanying documents | توجه به مدارک همراه |
| | Manufacturer | تولید کننده |
| | Contains sufficient for <n> tests | محتویات برای n تست کافیسست |
| | Temperature limitation | محدوده دمایی نگهداری |



تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نیش خیابان یاسمن، پلاک ۱
 کدپستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳ | تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) | فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
 sms ۳۰۰۷۱۴۰۲ | info@pishdazteb.com | www.pishdazteb.com



فنجیپاز