

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

**حیطه کاربرد :**

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. آنفلوانزای A و B از مهم ترین انواع آنفلوانزای انسانی می باشند.

کیت طراحی شده جهت سنجش کیفی و تفرق RNA ویروس کرونا و آنفلوانزای 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 آنفلوانزا و کرونا و تفرق این دو از یکدیگر به منظور انتخاب درمان مناسب مورد استفاده قرار بگیرد. این کیت قادر به تفرق آنفلوانزای A و B از یکدیگر می باشد.

نتایج حاصل از این کیت فقط برای شواهد بالینی استفاده 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 قادر به شناسایی ناحیه ORF1ab ویروس کرونا، ژن M1 ویروس آنفلوانزا A و ژن NS1 ویروس آنفلوانزا B می باشد.

با استفاده از مخلوط واکنش ارائه شده در کیت، تکثیر این الگوها می تواند به صورت کیفی و از طریق افزایش سیگنال فلورسانس توسط دستگاههای Real Time PCR اندازه گیری شود.

**محتویات کیت :**

این کیت شامل مخلوط های آزمایش Real Time PCR با فرمت 100 تستی به شرح زیر می باشد:

| ردیف | مخلول         | میزان          |
|------|---------------|----------------|
| ۱    | بافر          | ۱۴۰۰ میکرولیتر |
| ۲    | پرایمر و پروب | ۷۰۰ میکرولیتر  |
| ۳    | مخلوط آنزیمی  | ۱۴۰ میکرولیتر  |
| ۴    | کنترل مثبت    | ۵۰۰ میکرولیتر  |
| ۵    | کنترل منفی    | ۵۰۰ میکرولیتر  |

**تجهیزات مورد نیاز :**

سمپلر ۱۰-۱ میکرولیتری و سرسمپلر فیلتردار متناسب با سمپلر، دستگاه Real time PCR با حداقل ۴ کانال، استریپ مناسب دستگاه.

**شرایط نگهداری :**

- مدت زمان مفید استفاده این کیت ۹ ماه بوده که تاریخ انقضا نیز روی کیت درج شده است.
- این کیت باید در دمای  $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$  نگهداری شود.
- ویال مربوط به پرایمر و پروبها دور از نور نگهداری گردد.
- از ذوب و فریز کردن مکرر مخلول ها تا حد امکان جلوگیری شود.

**ابزار هماهنگ با کیت :**

این کیت قابلیت انجام در تمامی دستگاه های Real time PCR دارای کانالهای FAM, HEX/VIC, ROX را دارا می باشد.

**مشخصات نمونه :**

- نوع نمونه: سواب گلو و بینی
- شرایط نگهداری نمونه: جمع آوری بر اساس شرایط و نوع نمونه طبق پروتکل های موجود انجام گیرد.
- نگهداری و انتقال نمونه: نمونه 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  $70^{\circ}\text{C}$  برای مدت زمان طولانی نگهداری شود. از ذوب و فریز شدن مکرر جلوگیری شود. نمونه ها در زمان ارسال به آزمایشگاه باید در محفظه بسته و در مجاورت یخ انتقال داده شوند.

**آماده سازی پیش از آزمایش :**

ابتدا با استفاده از راهنمای کیت استخراج اسید نوکلئیک ویروسی، RNA ویروس را به عنوان الگو از نمونه استخراج کنید. RNA استخراج شده می تواند به صورت مستقیم برای آزمایش PCR استفاده شود. در غیر این صورت در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  نگهداری شود. این محصول شامل کیت استخراج نیوده و با کیت های استخراج RNA ویروسی دارای مجوز سازگار است.

**انجام آزمایش :**

محتویات کیت را از داخل بسته بندی خارج کرده و اجازه دهید ذوب شود. پس از رسیدن دمای محلول به دمای اتاق، اقدام به آماده سازی واکنش کنید:

| مواد مورد نیاز برای هر تست | میزان برای هر تست |
|----------------------------|-------------------|
| بافر                       | ۱۲/۵ میکرولیتر    |
| پرایمر-پروپ                | ۶/۳ میکرولیتر     |
| مخلوط آنزیمی               | ۱/۲ میکرولیتر     |
| الگو (RNA)                 | ۵ میکرولیتر       |
| حجم نهایی                  | ۲۵ میکرولیتر      |

با توجه به تعداد نمونه های مورد آزمایش و تعداد کنترل های مثبت و منفی، مقدار مورد نیاز مخلوط واکنش را آماده نمایید.

**اضافه کردن الگو :**

پس از آماده سازی محلول ها، مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه به مخلوط واکنش اضافه کنید. سپس درب ویال ها را بسته و اسپین کنید.

**انجام آزمایش :**

تیوب ها را داخل دستگاه ترمال سایکلر قرار دهید. نام هر نمونه را وارد نمایید.

**انتخاب کانال دستگاه :**

کانال FAM برای تشخیص ویروس کرونا، ROX برای ویروس آنفلوانزای A و HEX/VIC برای ویروس آنفلوانزای B و کانال CY5 برای کنترل داخلی انتخاب شود. شرایط انجام آزمایش طبق جدول زیر می باشد:

| مرحله | سیکل | دما | زمان (ثانیه:دقیقه) |
|-------|------|-----|--------------------|
| ۱     | ۱    | ۴۲  | ۰۵:۰۰              |
| ۲     | ۱    | ۹۵  | ۰۰:۱۰              |
| ۳     | ۴۵   | ۹۵  | ۰۰:۰۵              |
|       |      | ۵۸  | ۰۰:۳۰              |

پس از ذخیره کردن تنظیمات، فایل را ذخیره و برنامه واکنش را راه اندازی کنید.

**تحلیل نتایج :**

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

- برای کنترل منفی و نمونه بدون الگو نباید هیچ منحنی S شکل تیپیکالی در کانالهای FAM, HEX/VIC, ROX مشاهده شود. در کانال CY5 برای نمونه ی بدون الگو نباید منحنی مشاهده شود. Ct کانال CY5 برای کنترل منفی باید کمتر از ۳۵ باشد.
- برای کنترل مثبت Ct تمامی کانالهای FAM, HEX/VIC, ROX و CY5 باید کمتر از ۳۵ باشد.

ملزومات بالا باید در هر آزمایش به طور همزمان برقرار باشد، در غیر این صورت آزمایش بی نتیجه بوده و ملزم به تکرار است.

- برای همه نمونه ها باید Ct کانال CY5 که مربوط به کنترل داخلی است، کمتر از ۳۵ باشد. اگر منحنی S شکل تیپیکال در کانال های مربوط به تشخیص ویروس ها مثبت باشد اما شاهد منحنی S شکل تیپیکال در کانال CY5 نباشیم، تست همچنان معتبر است.
- اگر یک منحنی S شکل تیپیکال در کانال FAM رسم شده باشد و Ct نیز کمتر از ۳۷ 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 تیپیکال در کانال HEX/VIC رسم شده باشد و Ct نیز کمتر از ۳۶ باشد نشان دهنده این امر است که ویروس آنفلوانزا B در نمونه حضور داشته و نتیجه آزمایش برای ویروس آنفلوانزا B مثبت است.

- اگر یک منحنی S شکل تیپیکال در کانال ROX رسم شده باشد و Ct نیز کمتر از ۳۶ باشد نشان دهنده این امر است که ویروس آنفلوانزا A در نمونه حضور داشته و نتیجه آزمایش برای ویروس آنفلوانزا A مثبت است.

در صورتیکه منحنی S شکل تیپیکال به طور همزمان در کانال های مربوط به تشخیص ویروس ها رسم شود، نمونه مورد آزمون برای هر دو نوع ویروس مثبت می باشد.

- اگر منحنی S شکل تیپیکال در کانال CY5 با Ct کمتر از ۳۵ رسم شد و منحنی در هیچ یک از کانالهای دیگر مشاهده نشد، نتیجه تست برای هر سه ویروس کرونا، آنفلوانزا A و B منفی است.

- این محصول تنها قابلیت استفاده in-Vitro دارد.
- پرسنل می‌بایست آموزش دیده بوده و با خطرات احتمالی آشنایی کامل داشته باشند.
- تمامی نمونه‌ها می‌بایست به صورت عفونی در نظر گرفته شوند.
- آزمایش می‌بایست در زیر هود کلاس II انجام شود.

۱- اختصاصیت تست: این کیت بر اساس توالی ژنومی ویروس SARS-CoV-2 و آنفلوآنزا طراحی شده و قابلیت تشخیص بالایی برای توالی ژنهای مورد اشاره دارد. این کیت هیچ واکنش متقاطع با دیگر نمونه‌های مثبت کرونا ویروس، human adenovirus, 1,2,3 rhinovirus, human parainfluenza viruses، HPV، HCV، CMV، enterovirus، staphylococcus، HBV، HCV، CMV نشان نداده است. میزان تشخیص نمونه‌های منفی تجاری رفرنس، ۱۰۰ درصد بود که نشان دهنده اختصاصیت ۱۰۰ درصدی است.

۲- حساسیت تست: حداقل تعداد کپی قابل تشخیص در این تست برای هر سه ویروس کرونا، آنفلوآنزا A و ویروس آنفلوآنزا B، ۲۰۰ کپی در میلی لیتر می باشد.

۳- اندازه گیری میزان دقت: نتایج مطالعه ای که به منظور بررسی دقت سنجش کیت SARS-FLU Plus OneStep RT-PCR تولید شده توسط شرکت پیشتاز به صورت intra و inter 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           | 34.24        | 1.83 | 5.34 |
| Positive        | 20           | 23.76        | 0.58 | 2.44 |

مربوط به نمونه آنفلوآنزا A

| Sample          | No. of Tests | Mean Ct      | SD   | CV%  |
|-----------------|--------------|--------------|------|------|
| Negative        | 20           | undetectable | -    | -    |
| Weakly Positive | 20           | 33.75        | 1.62 | 4.80 |
| Positive        | 20           | 22.62        | 0.43 | 1.90 |

مربوط به نمونه آنفلوآنزا B

| Sample          | No. of Tests | Mean Ct      | SD   | CV%  |
|-----------------|--------------|--------------|------|------|
| Negative        | 20           | undetectable | -    | -    |
| Weakly Positive | 20           | 32.11        | 1.61 | 5.01 |
| Positive        | 20           | 22.43        | 0.45 | 2.00 |

## Intra Assay

مربوط به نمونه کرونا

| Sample          | No. of Tests | Mean Ct      | SD   | CV%  |
|-----------------|--------------|--------------|------|------|
| Negative        | 20           | undetectable | -    | -    |
| Weakly Positive | 20           | 33.1         | 1.8  | 5.43 |
| Positive        | 20           | 24.06        | 0.54 | 2.24 |

مربوط به نمونه آنفلوآنزا A

| Sample          | No. of Tests | Mean Ct      | SD   | CV%  |
|-----------------|--------------|--------------|------|------|
| Negative        | 20           | undetectable | -    | -    |
| Weakly Positive | 20           | 32.53        | 1.24 | 3.81 |
| Positive        | 20           | 24.55        | 0.37 | 1.50 |









مربوط به نمونه آنفلوآنزا B

| Sample          | No. of Tests | Mean Ct      | SD   | CV%  |
|-----------------|--------------|--------------|------|------|
| Negative        | 20           | undetectable | -    | -    |
| Weakly Positive | 20           | 33.26        | 1.57 | 4.72 |
| Positive        | 20           | 24.11        | 0.66 | 2.73 |

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.

## 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](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/](http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_9/en/). Accessed 5 August 2020

|   |   |                           |
|---|---|---------------------------|
|  | Use by                                  | تاریخ انقضاء              |
|  | Batch code                              | شماره سری ساخت            |
|  | Date of manufacture                     | تاریخ تولید               |
|  | Catalog number                          | شماره کاتالوک             |
|  | Caution, consult accompanying documents | توجه به مدارک همراه       |
|  | Manufacturer                            | تولید کننده               |
|  | Contains sufficient for <n> tests       | محتویات برای n تست کافیست |
|  | 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@pish tazteb.com www.pish tazteb.com

