

راهنمای کیت تشخیص کیفی
SARS-CoV-2/FluA/FluB One-Step RT-PCR

شرکت فناوری سلامت دیا



www.dibahitech.com



021-26417546



مواد و تجهیزات مورد نیاز

موارد زیر برای انجام تست لازم بوده و به همراه کیت ارائه نمی گردد. قبل از شروع کار آن‌ها را فراهم نمایید.

- هود بیولوژیک/ PCR Work Station
- Vortex
- Cryo /Cool BOX
- دستکش یکبار مصرف (بدون پودر)
- یخچال و فریزر
- Microcentrifuge (16,000 x g)
- Real time PCR system
- لوله (پلیت) های Real time PCR reaction
- میکرو پیپت (0.5 µl – 1000 µl) فیلتر دار و RNase/DNase Free
- میکروتیوب های RNase/DNase Free
- Biohazard waste container
- Tube racks

شرایط نگهداری

- این کیت باید در تاریکی و در دمای $20 \pm 5^\circ\text{C}$ - نگهداری شود.
- مدت زمان مفید استفاده از کیت ۱۲ ماه بوده که تا تاریخ انقضای درج شده بر روی کیت قابل استفاده می باشد.
- از ذوب و فریز شدن مکرر محلول ها (بیشتر از ۳ مرتبه) خودداری کنید.
- تمام محلول ها را در طی مراحل کار خنک نگه دارید.
- مخلوط آنزیمی باقی مانده به مدت دو هفته در دمای یخچال پایدار می باشد.

دستگاه هماهنگ با کیت

این کیت در تمامی دستگاه های Real Time PCR دارای کانال های FAM, HEX/VIC/JOE, ROX/TEXAS, RED و CY5 قابل استفاده است.

مشخصات نمونه

نوع نمونه: نازوفارنکس، اوروفارنکس و بافر نگهدارنده ویروس
شرایط نمونه گیری، نگهداری و انتقال نمونه: نمونه گیری براساس شرایط و نوع نمونه طبق پروتکل های موجود انجام گیرد. 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°C - برای مدت زمان طولانی نگه داری شود. از ذوب 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.

راهنمای کیت تشخیص کیفی

SARS-CoV-2/FluA/FluB One-Step RT-PCR

نام محصول

کیت تشخیص کیفی همزمان COVID-19 و آنفلوآنزای نوع A و B با روش TaqMan Real Time PCR

مورد استفاده

این کیت برای شناسایی کیفی و همزمان ویروس SARS-CoV-2، FluA، FluB و آنفلوآنزای نوع A و B استفاده از روش Real-time PCR به صورت تک مرحله ای طراحی شده است و نتایج حاصل از این کیت می تواند بعنوان عامل کمک کننده برای تشخیص و افتراق بیماری کووید-۱۹، آنفلوآنزای نوع A و B استفاده شود. نتایج حاصل از این کیت به تنهایی برای تشخیص کافی نبوده و علائم بالینی بیمار نیز باید بررسی شود.

اصول روش کار

این کیت شامل مخلوطی از پروب ها و پرایمر ها می باشد که برای ویروس SARS-COV-2 توالی های ژنومی محافظت شده RdRp، برای ویروس آنفلوآنزای نوع A توالی ژنومی M و برای ویروس آنفلوآنزای نوع B توالی ژنومی HA را به صورت همزمان هدف قرار می دهد. با استفاده از محلول واکنش PCR ارائه شده در کیت، تکثیر این الگوها می تواند به صورت کیفی و از طریق افزایش سیگنال فلورسانس توسط دستگاه های Real-Time PCR اندازه گیری شود. پرایمر کنترل داخلی در این کیت RNase P می باشد که نتایج این کنترل باعث افزایش دقت نمونه برداری و استخراج جهت پرهیز از نتایج منفی کاذب می شود.

محتویات کیت

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

REF.: FSD (100 Tests)			
No.	Type of Reagent	Presentation 100 Rxns	REF.
1	Master Mix (MM)	1vial, 600µl	MM600
2	Primer/Probe Mix (PP)	1vial, 400µl	PP400
3	Negative Control (NC)	1vial, 50µl	NC50
4	positive Control (PC)	1vial, 50µl	PC50

آماده سازی پیش از آزمایش

ابتدا RNA ویروس را با استفاده از کیت های استخراج اسیدنوکلئیک ویروسی و طبق راهنمای آن استخراج کنید. سپس می توانید RNA استخراج شده را مستقیماً برای آزمایش PCR استفاده کنید و یا در غیر این صورت در دمای 70°C - نگهداری شود. از ذوب و فریز شدن مکرر RNA خودداری کنید.

توجه: این محصول شامل کیت استخراج RNA نبوده و با کیت های High Pure و Qiagen DSP Viral RNA و Viral nucleic Acid Roche و دیگر کیت های استخراج RNA مورد تایید اداره کل تجهیزات پزشکی سازگار می باشد.

انجام آزمایش

تمام مراحل انجام آزمایش باید در محل مناسب و استریل و توسط کاربر حرفه ای و مسلط به qPCR انجام شود. برای انجام آزمایش ابتدا محتویات کیت را از داخل بسته بندی خارج کرده و اجازه دهید در دمای اتاق ذوب شود. با توجه به تعداد نمونه های مورد آزمایش و تعداد کنترل های مثبت و منفی، مقدار تعیین شده از محلول ها را به شرح زیر آماده کنید.

حجم مورد نیاز برای هر تست (IX)	ماده مورد نیاز
۱۰ میکرو لیتر	الگو (RNA) / کنترل مثبت / کنترل منفی
۶ میکرو لیتر	مستر میکس (MM)
۴ میکرو لیتر	پرایمر/پروب (PP)

- حجم مسترمیکس (MM) و پروب/پرایمر (PP) در هر واکنش با تعداد نمونه ها ضرب می شود که شامل کنترل ها، استانداردها و نمونه های تهیه شده است. با توجه به احتمال خطا در روند پیتینگ همواره یک نمونه اضافی در نظر بگیرید. مواد را به طور کامل مخلوط کرده و به مدت کوتاهی در دستگاه سانتریفیوژ قرار دهید.
- با استفاده از پیت تجهیز شده به سری فیلتردار مقدار ۶ میکرو لیتر از MM و ۴ میکرو لیتر از PP برداشته شود و در لوله (پلیت) های واکنش Real Time PCR قرار داده شود. سپس به طور مجزا ۱۰ میکرو لیتر از الگو (یا کنترل منفی یا کنترل مثبت) در لوله ها (پلیت) های مختلف واکنش اضافه کنید. بلافاصله لوله (پلیت) ها را ببندید تا از آلودگی جلوگیری شود.

- به منظور جمع آوری اجزای واکنش در قسمت انتهایی لوله ها می بایست حول محور طولی به آرامی گردانده شود.
- تیوب ها را داخل دستگاه قرار دهید. کانال FAM (ژن HA) برای ویروس Influenza B، کانال HEX/VIC/JOE (ژن Rdrp) برای SARS-COV-2، کانال ROX/TEXAS RED (ژن M) برای ویروس Influenza A و کانال CY5 برای کنترل داخلی (ژن RNase P) انتخاب کنید.
- اگر از دستگاه های شرکت ABI استفاده می کنید لطفاً رنگ رفرنس داخلی (Passive Reference) را بر روی تنظیمات none قرار دهید. شرایط پیشنهادی انجام آزمایش طبق جدول زیر می باشد:

مرحله	دما	زمان	سیکل
Reverse Transcription	50°C	۲۰ دقیقه	۱
cDNA Initial Denaturation	95°C	۱۰ ثانیه	۱
Denaturation	95°C	۱۵ ثانیه	۴۵
Annealing, Extension and Fluorescence measurement	58°C	۳۰ ثانیه	

تحلیل نتایج

کنترل کیفی: کنترل منفی و مثبت باید به درستی انجام شود در غیر این صورت نتایج نمونه ها نامعتبر است.

کانال	Ct Value			
	FAM (FLU B)	HEX (SARS-COV-2)	ROX (FLU A)	CY5 (IC)
کنترل منفی	UNDET	UNDET	UNDET	UNDET
کنترل مثبت	≤ 30	≤ 30	≤ 30	≤ 30

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

حد آستانه مثبت:

حد آستانه (Threshold) بالای تمام Negative Control و نویزها قرار داده شود. با توجه به مطالعه مقدار Ct مرجع برای ژن های مورد هدف و ژن کنترل داخلی این کیت ۴۰ است.

تفسیر نتایج:

آزمایش باید براساس قوانین Good Laboratory Practice (GLP) انجام شود. پراتور باید دقیقاً براساس راهنمای کیت آزمایش را انجام دهد.

عملکرد محصول

اختصاصیت آنالیتیکال تست:

اختصاصیت کیت هم بصورت انجام تست در آزمایشگاه و بر روی نمونه‌های سویه‌های مختلف و هم بصورت بیوانفورماتیک بررسی گردید.

این کیت هیچ واکنش متقاطع با سایر عوامل عفونت‌زای تنفسی از جمله *Klebsiella pneumoniae*، *Haemophilus pneumoniae*، *Streptococcus pneumoniae*، *Pseudomonas aeruginosa*، *influenza aureus*، *Pertussis*، *Legionella pneumophila*، *Staphylococcus*، *ADV*، *PIV* و *RSV* ندارد. تست بر روی نمونه استاندارد یا بالینی عوامل فوق صورت پذیرفته است.

همچنین، اختصاصیت تمامی پرایمر و پروب‌ها بصورت بیوانفورماتیکی و با استفاده از نرم افزار Primer BLAST پایگاه داده NCBI بررسی و تایید گردید. BLAST برای تمامی توالی‌ها و با استفاده از Database مربوط به nr (bacteria (taxid:10239، viruses (taxid:9605)) انجام گرفت. بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان دهنده اختصاصیت ۱۰۰٪ پرایمر و پروب‌ها برای شناسایی گونه‌های مورد نظر (آنفلوآنزای تایپ A و B و SARS-COV-2) می‌باشد. پرایمر و پروب طراحی شده برای شناسایی SARS-COV-2 بر اساس سویه (Gene Bank (nCoV_2019) accession:MN908947) می‌باشد و در بررسی‌های بیوانفورماتیکی قابلیت شناسایی سویه‌های B.1.1.7 (سویه انگلیسی)، B.1.1.28 (سویه برزیلی)، B.1.35.1 (سویه آفریقای جنوبی) و B.1.617 (سویه هندی) را نیز دارا بود ولی قابلیت افتراق بین آن‌ها را دارا نمی‌باشد.

حساسیت آنالیتیکال تست

در صورت استفاده صحیح از کیت، حداقل تعداد قابل تشخیص (LOD) در این تست، 5×10^2 ویروس در نمونه می‌باشد.

	Ct Value				تفسیر نتایج
	FAM	HEX	ROX	CY5	
1	UNDET	UNDET	UNDET	25-30	منفی یا زیر حد تشخیص
2	UNDET	UNDET	UNDET	30-40	میزان RNA بسیار کم و نیاز به نمونه گیری مجدد می باشد
3	UNDET	UNDET	UNDET	UNDET	عدم وجود RNA / محدودیت دستگاه / عدم تشخیص
4	≤35	UNDET	UNDET	----	آنفلوآنزای نوع B مثبت
5	UNDET	≤35	UNDET	----	کووید-۱۹ مثبت
6	UNDET	UNDET	≤35	----	آنفلوآنزای نوع A مثبت
7	35-40	----	----	----	تکرار آزمایش: اگر Ct هنوز بین ۳۵ تا ۴۰ است، تست برای کانال مثبت است.
	----	35-40	----	----	
	----	----	35-40	----	
8	≤35	≤35	----	----	نمونه نادر: آزمایش مجدداً تکرار شود و آلودگی بررسی شود. اگر نتیجه مشابه قبل بود احتمالاً فرد مبتلا به کووید-۱۹ و آنفلوآنزای می باشد.
	----	≤35	≤35	----	
9	≤35	≤35	≤35	≤35	نمونه بسیار نادر: آزمایش تکرار و آلودگی بررسی شود. اگر نتیجه مشابه قبل بود احتمالاً فرد مبتلا به کووید-۱۹ و آنفلوآنزای می باشد.

نمونه ممکن است منفی کاذب در نتایج مشاهده شود. اگر در حین آماده سازی نمونه‌ها یا آماده سازی واکنش PCR احتیاط‌های لازم جهت جلوگیری از Cross Contamination (مانند استفاده از تیپ‌های فیلتر دار) صورت نپذیرد، ممکن است باعث بروز نتایج مثبت کاذب در تست گردد.

محدودیت‌های روش تشخیصی

نتایج آزمایش این کیت فقط برای رفرنس بالینی هستند و تشخیص قطعی باید براساس علائم و بررسی‌های بالینی بیمار تعیین شود.

در صورت نمونه گیری نامناسب، پردازش، انتقال و همچنین غلظت کم نمونه ممکن است نتایج منفی کاذب حاصل شود. همچنین شرایط نگهداری نامناسب محلول‌ها می تواند باعث نتایج منفی کاذب شود. تنوع در توالی هدف ویروس SARS-CoV-2 و تغییرات توالی ایجاد شده از دلایل دیگر ایجاد نتایج منفی کاذب می باشد. دیگر مسایل مهار و محدود کننده PCR نیز می تواند باعث نتایج منفی کاذب شود. آلودگی‌های ایجاد شده در طول پردازش نمونه می تواند باعث نتایج مثبت کاذب شود.

خطرات و پیشگیری ها

لطفا پیش از استفاده راهنمای کیت را به دقت مطالعه کنید. این محصول تنها قابلیت استفاده ی برون تنی را دارد.

تمام نمونه های گرفته شده از بیمار باید به صورت بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند. از این رو، پرسنل آزمایشگاه باید ملزومات پوشش حرفه ای و محافظ (PPE) شامل استفاده از دستکش های یکبار مصرف، عینک، گان یا روپوش آزمایشگاهی را رعایت کنند. دستکش ها بین هر نمونه باید مرتبا تعویض شده تا از ایجاد آلودگی های مهار کننده در روند آزمایش جلوگیری شود. آزمایش های مربوط به نمونه های با احتمال عفونی بودن باید در یک کابینت (هود) کلاس ۲ در یک BSL-2 facility انجام شوند. پرسنل آزمایشگاه باید آموزش دیده باشند و آشنایی کامل با روند و خطرات دستگاه ها را داشته باشند. کنترل کیفی نیز برای هر آزمایش انجام شود. تست های تشخیصی باید از شرایط استاندارد آزمایشگاه شامل رعایت پیشگیری های استاندارد در زمان کار با نمونه ی بیمار پیروی کنند. برای دفع زباله از روند استاندارد پاتوژن های تنفسی دیگر پیروی کنید.

مدیریت آزمایشگاه باید طبق دستورالعمل های آزمایشگاهی PCR انجام شود. پروسه ی انجام آزمایش باید به دقت به مراحل مختلف تقسیم شود و تمام وسایل باید پیش از استفاده استریل شده باشند. از طرفی تمام وسایل و امکانات باید به هر مرحله آزمایش اختصاص داده شده و قابل انتقال به بخش دیگری نباشند. این کیت به مدت ۷ روز در بسته بندی فومی با پک های یخ قابل حمل می باشد و دمای آن نیز باید کمتر از ۲۰ درجه سانتی گراد باشد تا از نیمه عمر محصول کاسته نشود.

Concentration (copies/RXN)	Positive Detections	Total tests /time	Detection Rate
2000	20	20	100%
1000	20	20	100%
500	20	20	100%
250	18	20	90%
125	16	20	80%

دقت کیت

دقت کیت با بررسی سه لات مختلف و انجام ۹ تکرار بر روی هر کدام مورد بررسی قرار گرفت که در هر ۳ مورد دارای $CV \leq 5\%$ بود.

Samples	Test Times	RP (IC) (CY5)			
		FLU A (FAM)	SARS-COV-2 (HEX)	FLU B (ROX)	RP (IC) (CY5)
Precision Reference	1	27.33	29.37	29.12	23.21
	2	27.44	29.34	29.85	23.12
	3	27.69	29.34	29.95	23.45
	4	27.88	29.43	29.38	23.32
	5	27.59	29.34	29.56	23.91
	6	27.01	29.45	29.42	23.54
	7	27.07	29.12	29.25	23.21
	8	27.47	29.82	29.31	23.42
	9	27.38	29.54	29.35	23.43
Calculated CV:		$\leq 5\%$	$\leq 5\%$	$\leq 5\%$	$\leq 5\%$

ارزیابی بالینی کیت

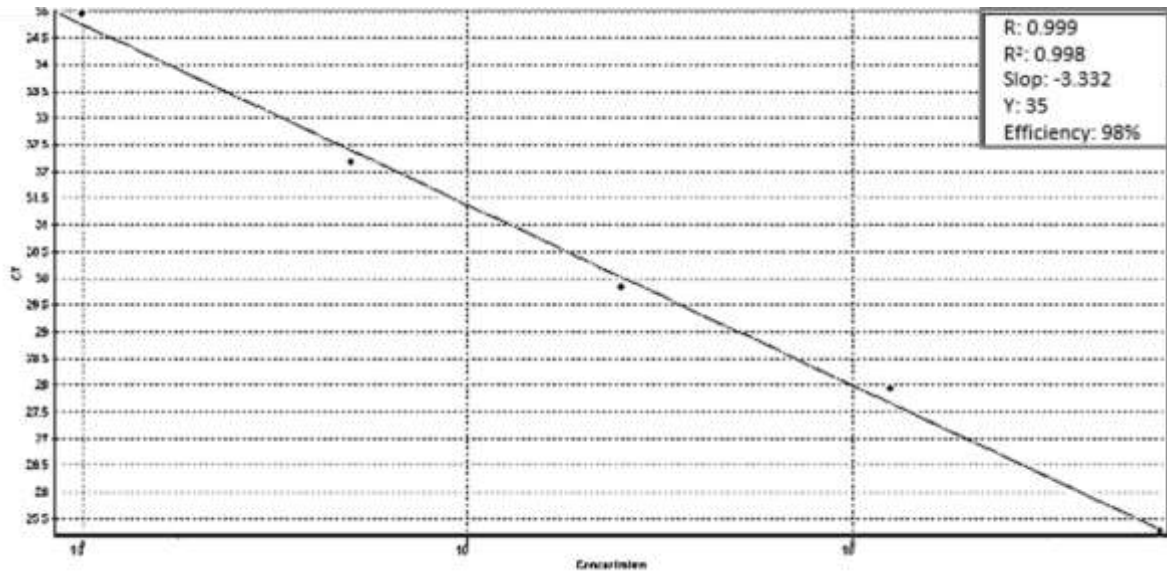
ارزیابی بالینی کیت با انجام تست بر روی ۴۰ نمونه مثبت در دامنه Ct بین ۲۰ تا ۳۸ و ۴۰ نمونه منفی و مقایسه آن ها با کیت/روش مرجع (کیت شرکت پیشتاز طب برای شناسایی SARS-COV-2 و روش مرجع WHO برای Influenza A/B صورت پذیرفته است. نتایج بدست آمده نشان دهنده حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ این کیت برای شناسایی سویه های آنفلوآنزای تایپ A و B و همچنین SARS-COV-2 می باشد.

تعداد و درصد مثبت نسبت به کیت/روش مرجع						
آنفلوآنزا تایپ B زن		آنفلوآنزا تایپ A زن		SARS-Cov-2 زن		
HA	زن	M	زن	RdRp	زن	
۱۰۰٪	۴۰/۴۰	۱۰۰٪	۴۰/۴۰	۱۰۰٪	۴۰/۴۰	مثبت (ct:20-38)
۰٪	۴۰/۴۰	۰٪	۴۰/۴۰	۰٪	۴۰/۴۰	منفی

$$\text{Clinical Sensitivity} = \frac{\text{True Positive}}{\text{True Positive} + \text{False Negative}} \rightarrow \frac{40}{40} = 100\%$$

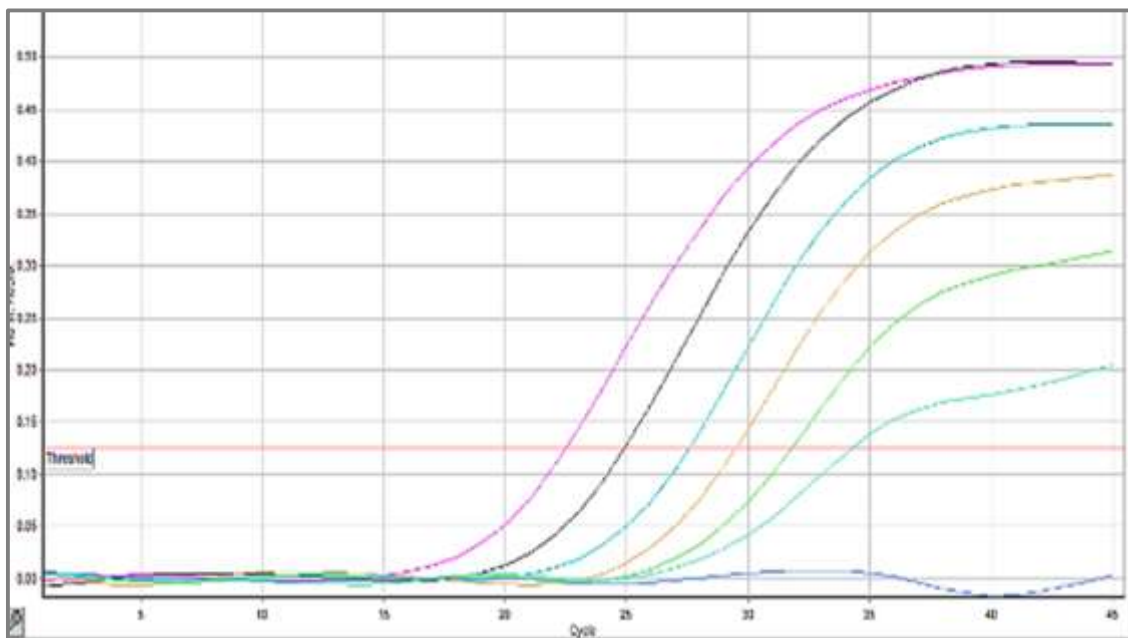
$$\text{Clinical Specificity} = \frac{\text{True Negative}}{\text{True Negative} + \text{False Positive}} \rightarrow \frac{40}{40} = 100\%$$

ارزیابی منحنی استاندارد:



بازده واکنش (Efficiency): ۹۸ درصد
 عرض از مبدا واکنش (Y-intercept): ۳۵ سیکل
 ضریب همبستگی واکنش (R^2): ۰,۹۹

گراف تکثیر:



براساس نتایج نشان داده شده در اشکال بالا، مقادیر بدست آمده از سیکل ۲۳ تا ۳۵ مشاهده شد و گراف تکثیر به صورت S می باشد. همچنین نمونه NTC نمودار تکثیری را نشان نمی دهد.



شرکت فناوران سلامت ديبا

آدرس: تهران، اوین، بلوار دانشجو، دانشکده دندانپزشکی، طبقه

پنجم، پژوهشکده علوم دندانپزشکی

شماره تماس: ۰۲۱-۲۶۴۱۹۵۲۶

شماره پشتیبانی: ۰۲۱-۲۶۴۱۷۵۴۶

وبسایت: www.dibahitech.com

منابع

1. CDC's Diagnostic Multiplex Assay for Flu and COVID-19 at Public Health Laboratories and Supplies. CDC, 2020.
2. EP25. Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostics Reagents, 2009.
3. Molecular Diagnostics Template for Commercial Manufacturers, FDA's current recommendations concerning what date and information should be submitted to FDA in support of a pre-EUA/EUA submission for a molecular diagnostic for SARS-COV-2, (version July 6, 2020)
4. Instruction and requirements for Emergency Use Listing (EUL) submission: In vitro diagnostics detecting SARS-COV-2 nucleic acid and rapid diagnostics tests detecting SARS-COV-2 antigens. WHO.PQDx-347 version 4;09 June 2020.
5. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus(nCoV) infection is suspected. Interim guidance. WHO.2020
6. Protocols_influenza_virus_detection_Feb_2021
7. Protocols_influenza_virus_detection_Jan_2020

علائم و نمادها

تاریخ تولید	
تاریخ انقضاء	
شماره اختصاصی سری تولید	LOT
شماره اختصاصی محصول	REF
آدرس محل تولید	
احتیاط مصرف	
دستورالعمل استفاده	
دمای نگهداری	
محصول آزمایشگاهی	IVD
بدور از تابش مستقیم آفتاب	
بدور از بارش باران	
جهت بالا	
محتوا	
خطر زیستی	
مقدار	QTY
معرف آماده مصرف	REAG R

DibaCo

آدرس: تهران، اوین، بلوار دانشجو، دانشکده دندانپزشکی، طبقه پنجم، پژوهشکده علوم دندانپزشکی

شماره تماس: ۰۲۱-۲۶۴۱۹۵۲۶

شماره پشتیبانی: ۰۲۱-۲۶۴۱۷۵۴۶