KIAGENE FANAVAR

(KIA COV)

کیت تشخیص کیفی ویروس کرونا

(SARS-CoV–2 One-Step RT-qPCR Detection Kit)

For In Vitro Diagnostics (IVD)

کد کاتالیتیک: FPKF119.0100

نگهداری: دمای ۲۰°C-

محتویات کیت:

اجزا	حجم
مخلـوط آنزیمـی RT PCR	1000 µl
مخلوط پرایمر و پروب	300 µl
کنترل مثبت	500 µl
کنترل منفی	1000 µl

توضیحات:

SARS-CoV–2 عضوی از خانواده بزرگ Coronaviridae بوده و دارای ساختار ژنومی RNA تک رشته ای با سنس مثبت است، ذرات این ویروس عموماً به شکل کروی و تاج دار با قطر ۸۰ تا ۱۲۰ نانومتر هستند. این خانواده از ویروس ها توانایی آلوده سازی مهره دارانی مانند خفاش ها، شترها، گربه ها را دارند. ویروس کرونا جدید در سال ۲۰۱۹ به‌عنوان عامل جدید پاتوژن شناسایی شد که می‌تواند باعث ایجاد ذات‌الریه (پنومونی) و تنگی نفس در انسان شود. کیت حاضر بر مبنای شناسایی RNA ویروس کرونا و ارزیابی کیفی حضور یا عدم حضور این ویروس با استفاده از Real-time PCR طراحی شده است و نتایج این کیت می تواند به عنوان کمکی برای تشخیص بیماری COVID-19 مورد استفاده قرار گیرد. نباید توجه داشت که تایج این تست نباید به عنوان تنها استاندارد تشخیصی این بیماری استفاده شود و لازم است تشخیص با ترکیب سایر نتایج آزمایشگاهی و شواهد بالینی بیمارصورت پذیرد.

شرایط نگهداری کیت:

-این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شود. در این شرایط معرف ها به مدت یک سال از تاریخ تولید پایدار هستند.

- مخلـوط آنزیمـی RT PCR به مدت دو هفته در دمای یخچال پایدار می باشد

– ساز ذوب و فریز شدن مکرر محتویات کیت تا حد امکان پرهیز کنید.

دستورالعمل:

کیت KIA COV بر مبنای بررسی سه ژن کرونا ویروس و یک ژن انسانی بعنوان کنترل داخلی طراحی شده است. ژنهای ویروسی شامل ژن RdRp (Hex) در کانال زرد،E (Fam) در کانال سبز و N (Cy5) در کانال قرمز می باشد. تشخیص به صورت کیفی و از طریق تکثیر الگو و افزایش سیگنال فلورسانس توسط دستگاهها Real Time PCR صورت می گیرد. همچنین ژن انسانی RNase P (ROX) در کانال نارنجی مورد بررسی قرار میگیرد که نتایج این کنترل باعث افزایش دقت پروسه نمونه گیری و استخراج جهت پرهیز از نتایج منفی کاذب می شود.

مشخصات نمونه:

۱. نوع نمونه: سواب گلو و بینی

۲. شرایط نمونه گیری: جمع آوری براساس شرایط و نوع نمونه طبق پروتکلهای موجود انجام گیرد(رجوع شود به دستور العمل نمونه گیری معاونت درمان وزارت بهداشت).

۳. نگـهداری و انتقـال نمونـه: نمونـه ی دریافـت شـده میتوانـد بلافاصلـه بـرای آزمایـش مـورد اسـتفاده قـرار گیـرد و یـا در دمـای ۲۰- °C بـرای سـه مـاه و در دمـا ۷۰- °C بـرای مـدت زمـان طولانـی نگـهداری شـود. از ذوب شـدن و فریـز شـدن مکـرر جلوگیـری شـود. نمونه هـا در زمـان ارسـال بـه آزمایشـگاه بایـد در محفظـه ی بسـته و در مجـاورت یـخ انتقـال داده شـوند.

آماده سازی پیش از آزمایش:

ابتـدا بـا اسـتفاده از راهنمـای کیـت اسـتخراج اسـید نوکلئیـک ویروسـی، RNA ویـروس را بعنـوان الگـو از نمونـه اسـتخراج کنیـد. این محصول دارای کیت استخراج RNA نبوده و استفاده از کیتهای Qiagen DSP Vrial RNA و High Pure Viral Nucleic Acid Rocheو تمامی کیت های استخراج RNA ویروسی که دارای مجوز اداره کل تجهیزات پزشکی می باشند بلامانع است. RNAاسـتخراج شـده میتوانـد مسـتقیما بـرای آزمایـش PCR اسـتفاده شـود و یـا در غیـر ایـن صـورت در دمـای۷۰- °C نگـهداری شـود. از ذوب شـدن و فریـز شـدن مکـرر الگـو RNA خـودداری کنیـد.

انجام آزمایش:

آماده سازی محلول ها در محل مناسب و استریل انجام شود :

۱. محتویـات کیـت را از داخـل بسـته بنـدی خـارج کـرده و اجـازه دهیـد تـا در دمـای اتـاق ذوب شـود.

۲. آمـاده سـازی مخلـوط واکنـش: حجـم نمونـه مـورد اسـتفاده شـده در ایـن تسـت می تواند ۵ یا ۷ میکرولیتـر باشـد. نمونـه مـورد آزمایـش را مطابق جـدول آمـاده سـازی کنیـد:

نوع ماده	مقادیر(۱ واکنش)	
مخلـوط آنزیمـی RT PCR	۱۰ میکرولیتر	۱۰ میکرولیتر
پرایمر و پروب	۳ میکرولیتر	۳ میکرولیتر
آبDEPC	۲ میکرولیتر	–
الگوRNA	۵ میکرولیتر	۷ میکرولیتر
حجم نهایی	۲۰ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر

۳. اضافه کردن الگو(RNA)

پس از آماده سازی محلول ها، مخلوط حاصل را به محل انجام آزمایش منتقل کنید.

در نظر داشته باشید که براساس میزان الگو مورد نظر، مقدار ۵ یا ۷ میکرولیتر از نمونه الگو، کنترل منفی و کنترل مثبت به محلول واکنش در دو واکنش مجزا اضافه کنید. حجم نهایی باید ۲۰میکرولیتر در هر ویال باشد .

٤. انجام آزمایشPCR

تیوب ها را داخل دستگاه ترمال سایکلر قرار دهید. نمونه مورد آزمایش، کنترل های مثبت و منفی را وارد کنید.

تنظیم دستگاه و انتخاب کانال Real Time :

ژن RdRp در کانال زرد (Hex, yellow) ، E (Fam, green) در کانال سبز و N (Cy5, red) در کانال قرمز را برای تشخیص ویروس COVID ۱۹-انتخاب کنید و کانال ROX یا نارنجی را برای تشخیص کنترل داخلی RNase P تنظیم کنید.

تنظیمات مراحل در دستگاههای Rotor Gene 6000، Biomolecular Systems (MIC)، Light Cycler Roche و ABI مشابه جدول ذیل می باشد اما لطفا رنگ رفرنس داخلی Reference Passiveرا بر روی تنظیمات none قرار دهید.

شرایط پیشنهادی انجام آزمایش بر طبق جدول پیشنهادی زیر میباشد:

سیکل	مرحله	زمان	دما°C
1	Reverse Transcription	15 min	50
1	cDNA Initial Denaturation	3 min	95
45	Denaturation	10 sec	95
	Annealing, Extension &Fluorescence measurement	40 sec	58

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 می شوند. آنالیز نتایج بر اساس جدول ارائه شده صورت می پذیرد.

نتیجه	نارنجی (Rox)	قرمز (Cy5)	زرد (Hex)	سبز (Fam)
مثبت	Ct < 40	Ct < 40	Ct < 40	Ct < 40
مثبت	-	Ct < 40	Ct < 40	Ct < 40
مثبت	Ct < 40	Ct < 40	-	Ct < 40
مثبت	Ct < 40	-	Ct < 40	Ct < 40
مثبت	-	-	Ct < 40	Ct < 40
مثبت	-	Ct < 40	-	Ct < 40
مثبت	Ct < 40	-	Ct < 40	-
مثبت	Ct < 40	Ct < 40	-	-
مثبت	Ct < 40	-	-	Ct < 40
منفی	Ct < 40	-	-	-
تکرار**	-	-	-	-

*در صورت تکرار آزمایش و حاصل شدن نتیجه مشابه مثبت تایید شده گزارش می شود.

** احتمال خطا در نمونه گیری و یا مراحل استخراج وجود دارد، لذا تکرار یک یا هر دو مرحله الزامی است.

معیار کنترل کیفی واکنش:

۱. حد آستانه مثبت (Threshold) برای ژن های ویروسی کمتر از ٤٠ در نظر گرفته می شود.

۲. کنترل منفی تا قبل از سیکل ٤٠ نباید نموداری داشته باشد در غیر این صورت واکنش آلوده بوده و نیاز به تکرار آزمایش پس از بررسی مراحل می باشد.

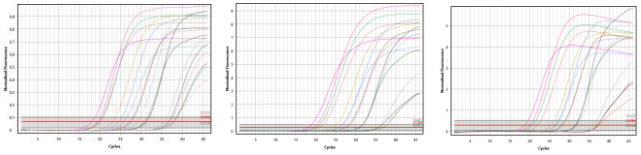
۳. نمودار کنترل مثبت در تمامی کانال ها باید زودتر از Ct ۳۰ قابل مشاهده باشد در غیراین صورت واکنش به درستی انجام شده و نیاز به تکرار می باشد.

خطرات و پیشگیری ها:

- لطفا پیش از استفاده 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 تشخیص مولکولی انجام شود.
- تمام وسایل باید پیش از استفاده استریل شده باشند. تمام وسایل و امکانات نیز باید به هر مرحله ی آزمایش به صورت مجزا اختصاص داده شده و قابل انتقال به بخش دیگری نباشند.
- تمام نمونه ها 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 دستکش های یک بار مصرف، عینک، گان یا روپوش آزمایشگاه میشود. دستکشها بین هر نمونه باید مرتبا تعویض شده تا از ایجاد آلودگیهای مهارکننده در روند آزمایش جلوگیری شود.
- آزمایشهای بالینی مربوط به نمونه هایی با احتمال عفونی بودن باید در یک کابینت(هود) کلاس۲ انجام شوند. تستهای تشخیصی باید از شرایط استاندارد آزمایشگاه شامل رعایت پیشگیری های استاندارد در زمان کار با نمونه ی بیمار پیروی کنند. برای دفع زباله ها از روند استاندارد پاتوژنهای تنفسی دیگر پیروی کنید.

حساسیت آنالیتیکال و LOD:

از یک نمونه Pool تعداد ۲۰ ویال تکرار ساخته و توسط کیت حاضر و کیت مرجع تست شدند و مقدار Ct انها بدست آمد، نتایج تمامی ۲۰ تکرار با Ct نمونه Pool کاملا مطابقت داشته و Ct نزدیک به هم از ۲۰ تکرار حاصل شد، در واقع می توان بیان کرد که، نتایج همبستگی ۱۰۰درصد نشان دادند، در تصاویر ذیل گراف سیگموئیدی مرتبط به هر ۳ ژن را مشاهده می کنید. همچنین در ادامه توسط محاسبات دقیق پایین ترین حد قابل تشخیص توسط کیت حاضر محاسبه شد و برابر با ۱۲۰ کپی در میلی لیتر بود و میزان Ct Cut Off کوچکتر مساوی ٤٠ گزارش می شود.



منحنی تکثیر ژن E — منحنی تکثیر ژن N — منحنی تکثیر ژن RDRP

KIAGENE FANAVAR

اختصاصیـــت آنالیتیکال:

ایـن کیـت بـر اسـاس توالـی ژنـی ویـروس CoV-SARS-۲ طراحـی شـده و قابلیـت تشـخیصی بالینی بـرای توالـی ژنـی مـورد اشـاره دارد در همین ویروس را دارا می باشد و ایـن کیـت هیـچ واکنـش متقاطعـی بـا دیگـر نمونه هـای مثبـت کروناویـروس،influenza; virus A Influenza viruses parainfluenza human; OC43, 229E, NL63 coronaviruses manhu; rhinovirus human; virus B influenza ; H3N2 and virus) H1N1(A, pneumonia Mycoplasma; parechovirus human; enterovirus; novirusadehuman; B/A viruses syncytial respiratory human; 4 and 3, 2, 1 Influenza haemophilus, Staphylococcus و همچنیـن نمونـه هـای مثبـت انسـانی HPV ،2,HSV1 ،CMV ،EBV ،HCV ،HBV ،HIV نشـان نـداده اسـت.

همچنین ، اختصاصیت تمامی پرایمر و پروبها بصورت بیوانفورماتیکی و با استفاده از نرم افزار BLAST Primer و پایگاه داده باکتری و ویروسی NCBI بررسی و تایید گردید

دقت عملکرد کیت:

دقت کیت با بررسی سه لات نامبر مختلف و انجام ۱۰ تکرار برروی هر کدام مورد بررسی قرار گرفت که در هر ۳ لات دارای Coefficient of Variation کمتر از 1% بود.

No.	Ct RDRP	Ct E	Ct N	RNAse P Ct
1	28.31	27.53	27.01	29.05
2	28.11	27.44	27.28	29.35
3	28.41	27.74	27.58	29.51
4	28.57	27.9	27.74	29.28
5	28.34	27.67	27.51	29.75
6	28.81	28.14	27.98	29.12
7	28.18	27.51	27.35	29.9
8	28.96	28.29	27.13	29.08
9	28.14	27.47	27.31	29.29
10	28.35	27.68	27.52	29.59
CV	**1%**	**1%**	**1%**	**1%**

ارزیابی بالینی:

۴۰ نمونه بالینی بیمار با Ct ۲۰ تا ۳۹ و ۴۰ نمونه منفی به صورت موازی توسط کیت حاضر و کیت مرجع مورد آزمایش قرار گرفتند که نتایج همبستگی ۱۰۰درصد را نشان داد و به تفکیک میزان اختصاصیت و حساسیت کیت ۱۰۰درصد برآورد شد

$$Clinical\ Sensitivity = True\ Positive \setminus True\ Positive + False\ Negative \rightarrow 40 \setminus 40 = 100\%$$

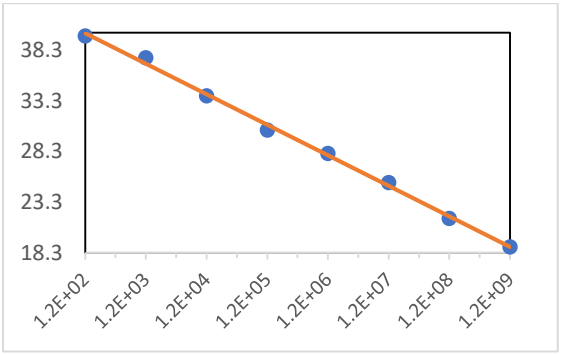
$$Clinical\ Specificity = True\ Negative\ True\ Negative + False\ Positive \rightarrow 40\ 40 = 100\%$$

منحنی استاندارد:

کارآیی واکنش: ۹۹درصد

عرض از مبدا: ۴۰

شیب نمودار: ۳,۰۰۵



منابع

1. EP25. Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostics Reagents,2009.
2. 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 SARSCOV-2, (version July 6,2020).
3. 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.
4. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus(nCoV) infection is suspected. Interim guidance. WHO.2020