



Instruction for Use
MultiStar-2 SARS-CoV-2 RT-PCR
Detection Kit

For in vitro Diagnostic (IVD) Use

Cat-No: BONCOV-100 (100 Tests)



Doc. #: IFU-COV-01 Doc. Version: 08 Revision Date: 1403-08-23

۳	شماره رفرانس
۳	شرح کیت
۴	دامنه کاربرد
۵	محتویات کیت
۵	نگهداری و انتقال کیت
۷	هشدارها و محدودیت‌ها
۹	کنترل‌ها
۹	نمونه‌گیری و نگهداری
۱۰	تاریخ انقضای کیت
۱۰	کنترل داخلی (Internal Control)
۱۱	خالص‌سازی نوکلئیک اسید
۱۱	آماده‌سازی و اضافه کردن الگو
۱۳	برنامه ریزی دمایی
۱۴	تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌ها
۱۵	آنالیز نتایج
۱۷	جدول تفسیر نتایج
۱۸	رفع مشکل
۲۰	ارزیابی آنالیتیکال
۲۱	ارزیابی کلینیکال
۲۲	پشتیبانی فنی
۲۲	نشانه‌ها

خواهشمند است دفترچه راهنما را به خوبی مطالعه کرده و در نظر داشته باشید در قسمت اضافه کردن الگو، کیت تشخیصی دارای دو پلتفرم می باشد! لطفا توجه نمایید!

شماره فرانس

- BONCOV-100

شرح کیت

کیت حاضر به روش Real-time PCR و به صورت تک مرحله ای نه تنها قادر به تشخیص صحیح و اختصاصی ویروس SARS-CoV-2 است، بلکه می تواند میزان پایین ویروس در افراد ناقل بدون علامت را شناسایی کند. این کیت در قالب یک پلتفرم مولتی پلکس شامل سه ست پرایمر و پروب طراحی شده است. این کیت قادر به تشخیص همزمان دو ژن RdRp و N ویروسی به ترتیب با فلوروفورهای Texas Red (Orange) و FAM (Green) و همچنین ژن Rnase P انسانی به عنوان کنترل داخلی با فلوروفور HEX (Yellow) است.

نتایج حاصل از آزمایش این کیت تنها در کنار شواهد بالینی، برای تشخیص مستند است. تشخیص قطعی و درمان بیماران باید بر اساس ترکیب نتیجه این آزمایش با نتایج آزمایش های دیگر و سابقه پزشکی و همچنین نحوه پاسخ دهی به درمان صورت گیرد.

اصول روش کار

طراحی پروب و پرایمر به گونه ای صورت گرفته که در یک مرحله و به طور همزمان قابلیت هدف قرار دادن دو ژن N و $RdRp$ برای SARS-CoV-2 را دارد. مشاهده شدت فلوروسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به باز کردن مجدد لوله های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می سازد.

دامنه کاربرد

شناسایی و سنجش کیفی RNA ویروس کووید-۱۹ با روش Real-time PCR برای شناسایی ویروس SARS-CoV-2 در نمونه‌های بالینی بیماران دارای علائم (یا حتی بدون علائم) و نشانه‌های ویروس کووید کاربرد دارد.

شرح پاتوزن

ویروس SARS-CoV-2 یک بتاکورونایروس متعلق به زیرجنس Sarbecovirus است. آنها عمدتاً به چهار جنس α ، β ، γ و δ براساس ساختار ژنومی شان تقسیم می‌شوند. کروناویروس‌های α و β فقط پستانداران را آلوده می‌کنند. گسترش جهانی SARS-CoV-2 و هزاران مرگ ناشی از بیماری کروناویروس (COVID-19) باعث شد سازمان بهداشت جهانی در ۱۲ مارس ۲۰۲۰ آن را یک بیماری همه گیر اعلام کند. تا به امروز، جهان تلفات زیادی را در این بیماری همه گیر پرداخت کرده است. ویروس SARS-CoV-2 در درجه اول بر سیستم تنفسی تأثیر می‌گذارد، اگرچه سایر سیستم‌های دیگر بدن نیز درگیر هستند. علائم مرتبط با عفونت حاد دستگاه تنفسی فوقانی (شامل تب، خستگی، سرفه، گلودرد، آبریزش بینی، عطسه) یا علائم گوارشی (شامل تهوع، استفراغ، درد شکم، اسهال) به عنوان علائم خفیفی از عفونت توسط این ویروس گزارش شده‌اند. علاوه بر این، سردرد، سرگیجه، ضعف عمومی در افراد مبتلا به عفونت این ویروس مشاهده می‌شود. همچنین، این عفونت در موارد شدیدتر میتواند منجر به پنومونی به همراه هیپوکسمی با درگیری بالای ریه‌ها شود.

Title	100 Tests
	Volume per Vial
5x CAPITAL Buffer	400 μ l/tube $\times$ 1
20x RTase	100 μ l/tube $\times$ 1
MultiMix(N,Rdrp,Rp)	300 μ l/tube $\times$ 1
Positive Control	100 μ l/tube $\times$ 1
Nuclease-Free Water	700 μ l/tube $\times$ 1

جدول ۱. محتویات کیت

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری گردد، همچنین به منظور انتقال و جابه جایی کیت از یونولیت با درب و یخ خشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی گراد هیچ گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل بر روی بسته های یخ زده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان طور که روی برچسب بسته بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخه های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و در نتیجه عدم کارایی کیت می شود.
- ✓ از قراردادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
- ✓ معرف ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله ها را به طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به طور یکنواخت مخلوط شده اند.

مواد و تجهیزات مورد نیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود؛

۱. سوab داکرون به همراه محفظه و محیط VTM/UTM برای نمونه گیری
 ۲. کیت استخراج RNA
 ۳. سمپلر قابل تنظیم در اندازه‌های مختلف و نوک سمپلر فیلتردار
 ۴. سانتریفوژ رومیزی
 ۵. بلوک خنک‌کننده
 ۶. وایتکس ۱۰ درصد
 ۷. گان و دستکش
 ۸. دستگاه Rotor-Gene و MIC یا دیگر دستگاه‌ها کانال‌های فلوروسنت مخصوص Green، Orange و Yellow و یا فلورفورهای FAM، Texas Red و HEX.
 ۹. نرم‌افزار Rotor-Gene Q نسخه ۱/۷/۹۴، نرم‌افزار Rotor-Gene 6000 نسخه ۱/۷/۶۵، ۱/۷/۸۷، ۱/۷/۹۴ و نرم‌افزار Rotor-Gene 3000 نسخه ۶/۰/۲۳ و یا بالاتر.
- استریپ و کپ 0.1 ml برای استفاده در روتور ۷۲ چاهکی یا لوله های 0.2 ml برای استفاده در روتور ۳۶ چاهکی

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. کلیه نمونه‌ها عفونی بوده بنابراین تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP^۱ توسط پرسنل آموزش‌دیده دارای پوشش حرفه‌ای و محافظ (PPE^۲) انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 انجام شود. از دستورالعمل زیر می‌توانید استفاده کنید:

Interim Laboratory Biosafety Guideline for Handling and Processing Specimen Associated

۲. پیشنهاد می‌شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همین‌طور بعد از کار لامپ UV زده شود.
۳. پیشنهاد می‌شود محل استخراج RNA و محل آماده سازی مخلوط واکنش از فضای اضافه کردن نمونه و نمونه استاندارد جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید.
۴. پس از آماده سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

نکات احتیاط عمومی

۱. لطفاً دستورالعمل را با دقت بخوانید و قبل از استفاده محصول با تمام اجزای کیت آشنا شوید و در حین کار دستورالعمل را دقیقاً دنبال کنید.
- لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرایند را با آن‌ها جلو ببرید.
- از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضا استفاده نکنید.
- در کیت از ماده دیگری استفاده نکنید.
۲. از سرسپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free استفاده نمایید.

^۱ Good Laboratory Practice

^۲ Personal Protective Equipment

۳. طراحی این کیت با هدف شناسایی تمامی توالی‌های گزارش شده با اختصاصیت بالا صورت گرفته است. ژن RNase P به عنوان کنترل داخلی در کیت استفاده می‌شود، که به منظور کنترل فرایند استخراج RNA و PCR کاربرد دارد.
۴. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای SARS-CoV-2 نمونه‌های گرفته‌شده از مریض، کنترل‌ها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده سازی و مخلوط کردن محتویات MasterMix صورت پذیرد.
۵. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.
۶. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد را به خوبی پیپتاژ نمایید و به طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد در طی زمان به طور کامل توصیه می‌شود.
۷. تمام مراحل مربوط به تهیه MasterMix باید بر روی یخ یا جعبه‌های سرد (Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی محتویات کیت را بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل نمایید.
۸. هنگام کار با مواد شیمیایی، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یکبار مصرف و عینک محافظ داشته باشید.
۹. کیت حاوی کنترل مثبت است. برای جلوگیری از آلودگی که ممکن است باعث ایجاد مثبت کاذب شود، کنترل مثبت را از سایر مواد موجود در کیت کاملاً جدا کنید.
۱۰. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرایند کار را با دقت انجام دهید.
۱۱. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها تعویض شوند.
۱۲. از تیپ‌های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ‌های فیلتر دار برای جلوگیری از ورود آلودگی نوکلئیک اسید استفاده نمایید.
۱۳. لطفاً لوله‌های PCR را با نایلون یکبار مصرف بسته‌بندی کرده و به درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR را پس از اмпیلیفای باز نکنید.
۱۴. همه مواد یکبار مصرف هستند، مجدداً استفاده نکنید.
۱۵. مواد موجود در کیت که بلااستفاده هستند، کیت استفاده‌شده و زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.

۱۶. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیت‌ها و تجهیزات را با اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ اسپری کنید.

کنترل‌ها

۱. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک RNA حاصل از استخراج نمونه استفاده شود.
۲. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب RNase-DNase Free بجای نمونه استفاده شود.
۳. کنترل مثبت (PTC): از کنترل مثبت کیت به جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

نمونه‌گیری و نگهداری

۱. نمونه‌های قابل استفاده برای کیت، نمونه‌های سیستم تنفسی شامل: ترشحات یا مایع حاصل از شست و شوی مربوط به انتهای بینی (nasopharyngeal) یا حلق (oropharyngeal)، سوآب از انتهای بینی یا حلق، مایع حاصل از شست و شوی ریه‌ها (bronchoalveolar lavage)، ترشحات نای (tracheal aspirates)، و خلط (sputum) می‌باشد.
۲. نتایج منفی کاذب می‌توانند به دلیل حضور افزایش غلظت مهارکننده‌های واکنش PCR، نمونه‌گیری نامناسب، استخراج RNA غیراستاندارد، انتقال نامناسب نمونه باشد و یا از غلظت کم نمونه ناشی گردد.
۳. نگهداری نمونه‌ها در شرایط نامناسب و یا حضور مهارکننده‌های واکنش PCR در نمونه می‌تواند منجر به نتایج منفی کاذب گردد.
۴. اگر احتمال تأخیر در استخراج نمونه‌ها وجود دارد، آن‌ها را در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین‌تر نگهداری نمایید.
۵. نمونه‌های سوآب باید فقط توسط سوآب‌های دارای نوک سنتزی (مانند پلی استر یا داکرون) و دسته آلومینیومی یا پلاستیکی جمع‌آوری شوند. سوآب‌های دارای نوک کلسیم آلزینات یا پنبه و دسته چوبی مورد قبول نیستند.
- نمونه‌های سرم خون، فقط در افرادی که load ویروس بالاست، ممکن است مثبت باشد.

- طبق مشاهدات حتی در صورت منفی بودن نمونه های مجرای تنفسی، نمونه های مدفوع نیز می تواند آلودگی فرد را به کروناویروس نشان دهد.
- ۶. نمونه ها را می توان در دمای ۴ درجه سانتیگراد، تا ۷۲ ساعت پس از جمع آوری نگهداری نمود.
- ۷. اگر احتمال تاخیر در استخراج نمونه ها وجود دارد، آنها را در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایینتر نگهداری نمایید.
- ۸. نوکلئیک اسیدهای استخراج شده باید در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایینتر نگهداری شوند.
- ۹. نمونه ای که ۴ روز یا بیشتر در دمای ۴-۲ درجه سانتیگراد نگهداری نشده یا در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایینتر فریز نشده است قابل استفاده برای آزمایش نمی باشد.
- گایدلاین های مورد استفاده حین جمع آوری، استخراج و تست نمونه های بیمارستانی از بیماران مشکوک به کروناویروس جدید ۲۰۱۹ (nCoV-2019) را مطالعه فرمایید.

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html>

- ایمنی زیستی در آزمایشگاه های میکروبیولوژی و زیست-پزشکی چاپ پنجم را مطالعه فرمایید.

<http://www.cdc.gov/biosafety/publications>

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

کنترل داخلی (Internal Control)

کنترل داخلی کیت به صورت درون زاد (اندوژن) می باشد و برای انجام تست و فرآیند استخراج نیاز به اضافه کردن کنترل داخلی به صورت جداگانه نمی باشد. با کمک پرایمر و پروب طراحی شده برای کنترل داخلی، موجود در Super Mix، می توان صحت فرآیند استخراج و PCR را کنترل نمود.

عوامل تداخلی

حضور EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه‌های سیلیس (1μl)، خون (1μl)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و بافر لیز موجب مهار واکنش PCR می‌شود. وجود مهارکننده در واکنش با ژن کنترل داخلی قابل ردیابی است

خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسیدنوکلئیک باید توسط کیت‌های جداسازی موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود. نمونه‌ها باید با کیسه یخ زیر صفر درجه سانتی‌گراد منتقل شده و استخراج شوند تا بلافاصله RNA به دست آید. کیت استخراج RNA در این کیت گنجانده نشده است.

آماده‌سازی و اضافه کردن الکو

به منظور انجام تست طبق جدول ۲ (بسته به نوع پلتفرم مورد استفاده) از محتویات درون کیت به تیوب‌های واکنش که به تعداد واکنش مورد نظر چیده‌اید، اضافه نمایید. در مرحله بعد، پس از آماده‌سازی محلول‌ها و انتقال آن به تیوب‌های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی را برای بررسی NTC به تیوب مورد نظر اضافه نموده، برای این کار بسته به پلتفرم انجام شده، ۵ میکرولیتر (پلت فرم ۱) یا ۱۰ میکرولیتر (پلت فرم ۲) از آب بدون نوکلئاز موجود در کیت را به تیوب کنترل منفی بی‌افزایید و درب لوله‌ها را ببندید. سپس لوله‌ها را به منطقه کار با اسید نوکلئیک انتقال دهید، ۵ میکرولیتر (پلت فرم ۱) یا ۱۰ میکرولیتر (پلت فرم ۲) از کنترل مثبت و ۵ میکرولیتر (پلت فرم ۱) یا ۱۰ میکرولیتر (پلت فرم ۲) از نمونه‌های بیمار را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید. در حین تهیه PCR لازم است همه اجزا در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند (جدول شماره ۳).

نکته: جهت بررسی صحت انجام تست، حضور واکنش حاوی کنترل مثبت و منفی ضروری می‌باشد.

Reagent	پلتفرم ۱: برای الگو با مقدار ۵ میکرولیتر	پلتفرم ۲: برای الگو با مقدار ۱۰ میکرولیتر
20X Enzyme Solution	1 μ l	1 μ l
5x Reaction Buffer	4 μ l	4 μ l
Primer/Probe Mix	3 μ l	3 μ l
Nuclease-Free Water	7 μ l	2 μ l
Final Volume	15 μ l	10 μ l

جدول ۲. آماده سازی محتویات Maternmix

دقت کنید که کیت تشخیصی دارای دو پلتفرم برای افزودن الگو می باشد:

الگو با مقدار ۱۰ میکرولیتر: بر اساس مقدار الگو مورد نظر مقدار ۱۰ میکرولیتر از کنترل مثبت، کنترل منفی و نمونه بیمار را به محلول واکنش اضافه نمایید که حجم واکنش در نهایت به ۲۰ میکرولیتر برسد.

الگو با مقدار ۵ میکرولیتر: بر اساس مقدار الگو مورد نظر مقدار ۵ میکرولیتر از کنترل مثبت، کنترل منفی و نمونه بیمار را به محلول واکنش اضافه نمایید که حجم واکنش در نهایت به ۲۰ میکرولیتر برسد.

در نهایت، لوله ها را ببندید، مختصراً سانتریفیوژ کنید، آن ها را داخل دستگاه قرار دهید و اجازه دهید مطابق مشخصات برنامه قید شده در جدول شماره ۴ تکثیر شوند. هنگام استفاده از کنترل مثبت یا مواد بالینی بسیار مراقب باشید.

برنامه ریزی دمایی

این دستورالعمل برای دستگاه Rotor-Gene توصیف شده است. دیگر دستگاه‌های Real-Time PCR دارای کانال‌های (FAM), Orange (ROX or Texas Red) و Green (HEX) نیز مناسب برای استفاده از این کیت هستند. در صورت استفاده از دستگاه ABI 7500 گزینه رنگ رفرنس داخلی (passive reference) را حذف کنید. پس از تنظیم کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید (جدول ۴). برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید.

	Temperature	Hold	Cycle
cDNA Synthesis	50°C	20 min	1
Pre-Denaturation	95 °C	10 min	1
Denaturation	95 °C	10 sec	45
Annealing and Acquisition on Channel Green (FAM) , Orange (Texas Red) and Yellow (HEX)	55°C	40 sec	

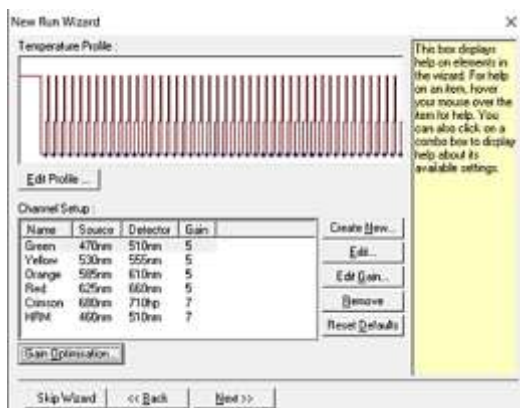
جدول ۴. برنامه ریزی دمایی

علاوه بر تعریف دمایی دستگاه که در قسمت بالا آمده است دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیم گردد.

تعریف طیف سنجی فلورسنت در دستگاه ها

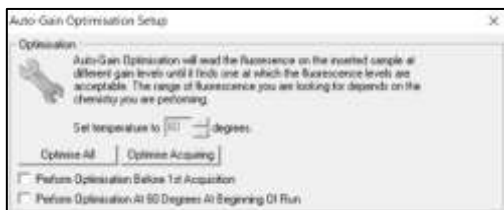
دستگاه Rotor-Gene

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه‌ی Gain Optimization را انتخاب کنید (شکل ۱).



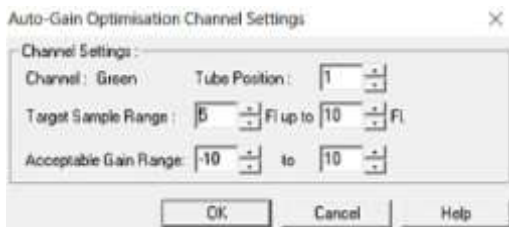
شکل ۱: تنظیمات دستگاه برای Gain Optimization

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimize Acquiring برای هر ۳ کانال سبز، زرد و نارنجی، بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



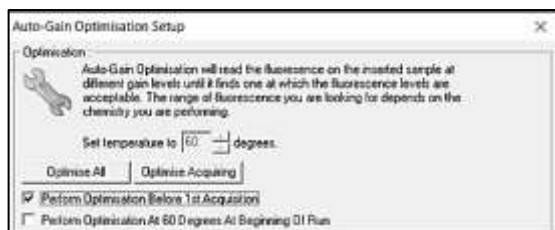
شکل ۲: تنظیمات دستگاه برای Auto Gain Optimization

توجه نمایید Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب شامل MasterMix حاوی PTC، انجام شود، بنابراین عدد نوشته شده در کادر Tube Position باید صحیح نوشته شده باشد (شکل ۳).



شکل ۳: تنظیمات دستگاه برای Auto Gain Optimization

پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی Perform Optimization Before 1st Acquisition را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۴).



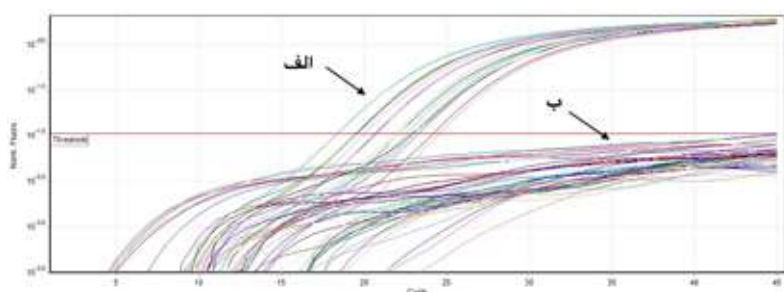
شکل ۴: تنظیمات دستگاه برای Auto Gain Optimization

آنالیز نتایج

آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در ۳ کانال رنگی Green و Yellow و Orange یا فلورفورهای FAM و HEX و ROX آستانه را در بازه‌ی مناسب قرار دهید. نتایج را به صورت زیر تفسیر کنید:

۱. دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد (شکل ۵ - گراف های الف).

گراف‌های خط صاف موید حضور RNA ویروسی نبوده و منفی تلقی می‌شوند (شکل ۵ - گراف‌های ب).



شکل ۵: تفاوت گراف‌های سیگموئیدی و گراف‌های صاف

۲. شناسایی *Rnase P* به عنوان کنترل داخلی برای نمونه‌های مثبت غیر ضروری است و تیتراژ بالای ویروس می‌تواند منجر به کاهش یا عدم حضور سیگنال مرتبط با *Rnase P* در نمونه‌های مثبت گردد.

۳. مقادیر Ct ژن‌های N، RdRp تا 40 مورد قبول بوده و مثبت تلقی می‌شوند.
۴. کنترل منفی: نمونه NTC نباید در هیچ‌یک از کانال‌های Green، Yellow و Orange دارای Ct پایین‌تر از 40 باشد. در غیر این صورت واکنش فاقد اعتبار بوده و نیازمند تکرار است.
۵. کنترل مثبت: در کانال‌های Green، Yellow، Orange نمونه PTC باید خوانش شده باشد. در غیر این صورت واکنش فاقد اعتبار بوده و نیازمند تکرار است.
۶. به علت حساسیت بالای کیت و شناسایی کوچکترین مواجهه فرد با عامل ویروسی در صورتیکه تا Ct 40 تک ژن N و یا RdRp بالا آمد، نتیجه مثبت است.
۷. تست‌های با نتایج Invalid معتبر نبوده و نیاز به نمونه‌گیری مجدد و تکرار دارند.

جدول تفسیر نتایج

این کیت قادر به تشخیص همزمان دو ژن RdRp و N ویروس به ترتیب با فلوروفورهای Texas Red (Orange) و FAM (Green) است و همچنین ژن Rnase P انسانی به عنوان کنترل داخلی با فلوروفور HEX (Yellow) تشخیص داده می شود.

Results Analysis	Tests		
	Rnase P Yellow Channel (HEX)	N Green Channel (FAM)	RdRp Orange Channel (TEXAS RED)
PTC	+	+	+
NTC	-	-	-
Invalid	-	-	-
COVID-19 Detected	-	At Least One Positive	
COVID-19 Detected	+	At Least One Positive	
COVID-19 Not Detected	+	All Negative	

جدول ۵. تفسیر نتایج

رفع مشکل

در صورت مواجهه با عملکرد و نتایج نادرست به جدول زیر مراجعه نمایید. در غیر این صورت با پشتیبان فنی تماس حاصل فرمایید.

مشکل	دلیل بروز مشکل	اقدام اصلاحی
۱ شدت فلورسنت پایین در کانال سبز	تنظیمات Gain	اطمینان حاصل کنید Gain کانال FAM حداقل بر روی ۵/۳۳ تنظیم شود و در صورت تمایل برای دریافت شدت بیشتر به طور دستی Gain را بین ۶ الی ۷ تنظیم نمایید.
۲ هیچ سیگنالی دریافت نشده ولی کنترل مثبت سیگنال دارد.	استخراج RNA	<u>استخراج RNA با برخی از کیت ها (به ژن) ممکن است همراه با برخی ناخالصی هایی باشد که با مستر میکس واکنش مهاری دهد بنابراین میزان RNA را تا 5 μL کاهش دهید.</u>
۳ هیچ سیگنالی از هیچ کانالی دریافت نمی شود (حتی در نمونه کنترل مثبت کیت نیز هیچ سیگنالی رویت نشده)	مشکل از مستر میکس می باشد	واکنش را مجدداً روی کنترل مثبت کیت تکرار کنید تا از مشکل مستر میکس اطمینان حاصل کنید.
	مشکل از دستگاه یا نرم افزار آن می باشد	از نحوه run دستگاه و همچنین سلامت دستگاه اطمینان حاصل کنید.
۴ رویت سیگنال در نمونه کنترل منفی	آلودگی فضای هود یا work station که میکس اولیه آماده می گردد.	با سفیدکننده ۱۰% تمام سطوح هود را تمیز کنید و به مدت ۲۰ دقیقه سفید کننده ۱۰% بگذارید روی سطوح بماند و سپس به مدت ۲۰ دقیقه UV را روشن کنید.
	مشکل از سمپلر آلوده یا مشترک می باشد	امکان دارد طی روند کار به هر علتی سمپلر هود تمیز شما مقداری آلودگی داشته باشد برای رفع آلودگی بیرون و داخل سمپلر را با وایتکس ۱۰% خوب تمیز کنید و سمپلرها را زیر UV به طریقی که سر آنها UV بخورد قرار دهید/ هرگز از سمپلر مشترک که برای نمونه بیمار یا کنترل مثبت استفاده میکنید جهت درست کردن میکس اولیه استفاده نکنید.

		استفاده از یک فضا جهت RT- PCR	توجه داشته باشید که برای انجام تست باید دو فضای مجزا (هود مجزا) برای میکس اولیه و اضافه کردن نمونه بیمار داشته باشید.
۵	شدت فلورسنت کم است	پرایمر و پروب ها بیش از ۲ بار فریز و دفریز شدند.	برای جلوگیری از این اتفاق دفعه اول به اندازه مورد نیاز هر بار استفاده پرایمر و پروب ها را الکوت کنید در غیر این صورت اگر طی دو-سه روز کل کیت مصرف می شود پرایمر ها را در دمای ۴ درجه نگهداری کنید.
۶	سیگنال فلورسنت حالت سیگموئیدی ضعیفی دارد	کیفیت RNA استخراج شده مناسب نیست.	در صورت امکان دوباره فرآیند استخراج RNA و یا نمونه گیری را تکرار کنید.
۷	گرفتن سیگنالهای خطی (noise)	نرم افزار دستگاه	برای دستگاه Qiaqen (کوربت) گزینه outlier removal را طبق شرایط بهینه نمونه روی ۵% یا ۱۰% بگذارید.
۸	روی برخی نمونه ها سیگنال برای RP دریافت نمی شود	کیفیت RNA استخراج شده	<u>در صورت استفاده از کیت های استخراج همانند</u> <u>به ژن ، اگر در هر نمونه در سه کانال هیچ</u> <u>سیگنالی رویت نشد، نشان دهنده کیفیت</u> <u>نامناسب RNA می باشد. در این صورت حجم</u> <u>RNA را تا ۵ µL کاهش دهید.</u>
		رقابت واکنش	اگر نمونه مثبت باشد و در کانال های دیگر سیگنال رویت شود و فقط سیگنال کنترل مثبت وجود نداشته باشد نمونه مثبت تلقی خواهد شد.
۹	سیگنالها سیگموئیدی هستند ولی مواج می باشند.	مشکل از دستگاه می باشد	اگر از اینکه درب استریپ ها کاملا محکم بسته شده اند اطمینان دارید، با تکنسین دستگاه تماس حاصل فرمایید.

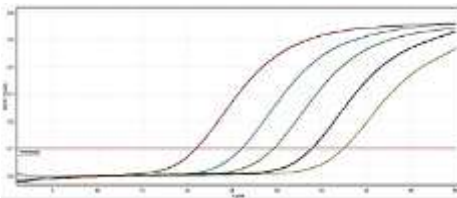
جدول ۶. رفع مشکل

ارزیابی آنالیتیکال

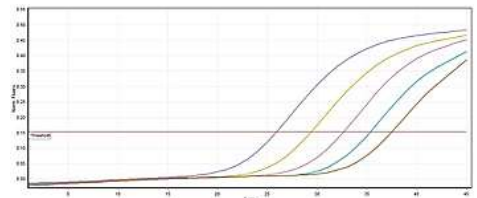
حساسیت آنالیتیکال و LOD کیت

با توجه به نتایج گرفته شده، حد پایینی تشخیص (LOD) این کیت برای ژن Rd برابر با 300 copy/mL، برای ژن N برابر با 200 copy/mL و برای Rp برابر با 100 copy/mL گزارش برآورد گردید.

گراف تکثیر ژن RdRp



گراف تکثیر ژن N



شکل ۶. گراف های تکثیر ژن N و RdRp

اختصاصیت آنالیتیکال

واکنش متقاطع

به منظور بررسی و اثبات اختصاصیت پرایمرها و پروب های طراحی شده برای ویروس SARS-CoV-2، احتمال واکنش دهی متقابل و شناسایی غیر اختصاصی دیگر عوامل عفونی دستگاه تنفسی به صورت بیوانفورماتیکی و با استفاده از ابزار NCBI BLAST مورد بررسی قرار گرفت.

ویروس های بیماری زای مجاری تنفسی

Human parainfluenza 1 virus (taxid:12730), human parainfluenza virus 3 HPIV3 (taxid:11216), Human parainfluenza virus 2 (taxid:1979160), Human parainfluenza 4a virus (taxid:11224), Human parainfluenza 4b virus (taxid:11226), Human adenovirus 3 (taxid:45659), Human adenovirus 5 (taxid:28285), Human adenovirus 7 (taxid:10519), Human respiratory syncytial virus A (taxid:208893), Human respiratory syncytial

virus B (taxid:208895), Rhinovirus (taxid:12059), Bocavirus (taxid:1507401), Metapneumovirus (taxid:162387), Bat Alphacoronavirus 229E related virus (taxid:1739614),

باکتری‌های بیماری‌زای مجاری تنفسی

Acinetobacter baumannii (taxid:470), Bordetella parapertussis (taxid:519), Bordetella pertussis (taxid:520), Chlamydia pneumoniae (taxid:83558), Haemophilus influenzae (taxid:727), Klebsiella pneumoniae (taxid:573), Legionella pneumophila (taxid:446), Moraxella catarrhalis (taxid:480), Mycoplasma pneumoniae (taxid:2104), Pseudomonas aeruginosa (taxid:287), Serratia marcescens (taxid:615), Staphylococcus aureus (taxid:1280), Stenotrophomonas maltophilia (taxid:40324), Streptococcus pneumoniae (taxid:1313), Mycobacterium abscessus (taxid:36809), Mycobacterium avium (taxid:1764), Mycobacterium bovis (taxid:1765), Mycobacterium chelonae (taxid:1774), Mycobacterium avium-intracellulare (taxid:55883), Mycobacterium tuberculosis (taxid:1773), Mycobacterium kansasii (taxid:1768), Mycobacterium

ارزیابی کلینیکال

حساسیت و اختصاصیت کلینیکال

برای تعیین حساسیت و اختصاصیت کلینیکال ۱۰۰ نمونه مثبت و ۱۰۰ نمونه منفی در مقایسه با کیت مرجع تست شدند. از ۱۰۰ نمونه مثبت ۲ عدد منفی گزارش شد (منفی کاذب) و از ۱۰۰ نمونه منفی ۴ عدد مثبت گزارش شد.

فرانس: MM17-A, Verification and Validation of Qualitative Nucleic Acid Tests

TP	FN	TN	FP
98	2	96	4
Sensitivity		98 %	
Clinical Specificity		96 %	

جدول ۷. بررسی حساسیت و اختصاصیت کیت

پشتیبانی فنی

جهت ارتباط با پشتیبانی فنی با شماره‌های زیر تماس حاصل فرمایید .

✓ ۰۹۹۳۶۶۹۳۹۴۱ (آقای قره داغی)

نشانه ها

	InVitro Diagnostos Medical Device	تشخیص آزمایشگاهی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولید شده
	Temprature Limitation	محدودیت دمایی
	Concult Instructon For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficent for <n> tets	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

شرکت فناوری بن یاخته- گروه سین مورو

دفتر مرکزی : تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار ۲۴ متری سعادت آباد، خیابان

حیدر نیا (دوم شرقی)، پلاک ۹، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی: ۱۹۹۷۷۷۵۵۵۵ تلفن تماس: ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

Web Site : www.Senmurv.co

Email : info@senmurv.ir