



Instruction for Use

Superstar Flu A/B & SC2 Detection kit

با روش

Real-Time PCR

Cat-No: BONFLUSC-100

For in vitro Diagnostic (IVD) Use



Doc. #IFU-FLU-01 Doc. Version: 10 Revision Date: 1404-06-17

فهرست مطالب

۲	شماره رفرانس
۳	شرح کیت
۴	دامنه کاربرد
۵	نگهداری و انتقال کیت
۱	هشدارها و محدودیت‌ها
۱	نکات احتیاط عمومی
۲	کنترل‌ها
۳	نمونه‌گیری و نگهداری
۴	تاریخ انقضای کیت
۴	خالص‌سازی نوکلئیک اسید
۴	آماده‌سازی و اضافه کردن الگو
۵	برنامه‌ریزی دمایی
۷	تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌ها
۸	آنالیز نتایج
۱۰	جدول تفسیر نتایج
۱۱	رفع مشکل
۱۳	ارزیابی آنالیتیکال
۱۵	ارزیابی کلینیکال
۱۵	پشتیبانی فنی
۱۶	نشانه‌ها
۱۶	اطلاعات تماس

شماره رفرانس

- BONFLUSC-100

شرح کیت

کیت حاضر به روش Real-time PCR مالتیپلکس و به صورت تک مرحله ای به منظور تشخیص هم زمان و افتراقی ویروس های SARS-CoV-2، آنفلوآنزای A و/یا آنفلوآنزای B در افراد مشکوک به آلودگی ویروس تنفسی طراحی شده است. آنفلوآنزا A با پروب متصل شده به فلوروفور FAM در کانال سبز، آنفلوآنزا B با پروب متصل شده به فلوروفور Cy5 در کانال قرمز و SARS-CoV-2 با فلوروفور ROX در کانال نارنجی تشخیص داده می شود. پروب متصل به کنترل داخلی متصل به فلوروفور HEX است که در کانال زرد شناسایی می گردد.

طراحی این کیت با هدف شناسایی تمامی توالی های گزارش شده با اختصاصیت بالا صورت گرفته است. پرایمر و پروب اختصاصی طراحی شده برای ژن M1/M2، همه سرو تیپ های شناخته شده آنفلوآنزای A از جمله H1N1، H1N1pdm09، H3N2، H5N8 و H7N9 را شناسایی می کند. پرایمر و پروب اختصاصی برای ژن NS1 هر دو نوع ویکتوریا و یاماگاتای آنفلوآنزای B را تشخیص می دهد و پرایمر و پروب مختص ژن N و RdRp به منظور شناسایی تمامی موارد SARS-CoV-2 طراحی شده است. ژن RNase P به عنوان کنترل داخلی در کیت استفاده می شود، که به منظور کنترل فرایند استخراج RNA و PCR کاربرد دارد.

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 هم زمان قابلیت هدف قرار دادن دو ژن N و RdRp برای SARS-CoV-2 و همچنین شناسایی آنفلوآنزای A و/یا آنفلوآنزای B را دارد. مشاهده شدت فلورسنت 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

سنجش کیفی RNA ویروس کووید-آنفلوانزا با روش Real-time PCR برای شناسایی و تمایز ویژه ویروس‌های SARS-CoV-2، آنفلوانزای A و/یا آنفلوانزای B در نمونه‌های بالینی بیماران دارای علائم و نشانه‌های ویروس کووید و آنفلوانزا کاربرد دارد.

شرح پاتوژن

ویروس SARS-CoV-2 یک بتاکورونایروس متعلق به زیر جنس Sarbecovirus است. آن‌ها عمدتاً به چهار جنس α ، β ، γ و δ بر اساس 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 همه‌گیر اعلام کند. تا به امروز، جهان تلفات زیادی را در این بیماری همه‌گیر پرداخت کرده است. ویروس SARS-CoV-2 در درجه اول بر سیستم تنفسی تأثیر می‌گذارد، اگرچه سایر دستگاه‌های 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.

آنفلوانزا توسط ویروس‌های RNA بسیار متغیر متعلق به گروه orthomyxovirus ایجاد می‌شود. این ویروس‌ها قادرند به طور مداوم ژن‌های کد کننده پروتئین‌های سطحی و همچنین پروتئین‌های غیر سطحی خود را تغییر دهند. مکانیسم‌های مسئول این تغییرات در ویروس‌های آنفلوانزای نوع A شامل نوترکیبی (مرتب‌سازی مجدد) ژن‌ها در میان سویه‌ها، حذف و درج در ژن‌ها، و اغلب، جهش‌های نقطه‌ای است. علاوه بر این، سویه‌های قدیمی ممکن است دوباره در جمعیت ظاهر شوند. به نظر می‌رسد ویروس‌های آنفلوانزا از نوع B به میزان کمتری با یکدیگر متفاوت هستند. آنفلوانزای A، B همگی دارای یک ژنوم تقسیم‌بندی شده هستند، اگرچه تنها زیرگروه‌های خاص

آنفلوآنزای A و آنفلوآنزای B باعث بیماری شدید در انسان می‌شوند. در پستانداران، تکثیر زیرگروه‌های آنفلوآنزا به نظر می‌رسد محدود به سلول‌های اپیتلیال تنفسی است. بنابراین، بیشتر علائم و عوارض، دستگاه تنفسی را درگیر می‌کند.

محتویات کیت

Title	100 Tests
	Volume per Vial
5x Reaction Buffer	400 µl/tube × 1
20x RTase	100 µl/tube × 1
Super Mix	400 µl/tube × 1
Positive Control FLU-SC	100 µl/tube × 1
Nuclease-Free Water	700 µl/tube × 1

جدول ۱. محتویات کیت

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری گردد، همچنین به‌منظور انتقال و جابه‌جایی کیت از یونولیت با درب و یخ خشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هیچ‌گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل بر روی بسته‌های یخ‌زده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان‌طور که روی برچسب بسته‌بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخه‌های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و در نتیجه عدم کارایی کیت می‌شود.
- ✓ از قرار دادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.

✓ معرف‌ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله‌ها را به‌طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به‌طور یکنواخت مخلوط شده‌اند.

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

۱. سواب داکرون به همراه محفظه و محیط VTM/UTM برای نمونه‌گیری
۲. کیت استخراج RNA
۳. سمپلر قابل تنظیم در اندازه‌های مختلف و نوک سمپلر فیلتر دار
۴. سانتریفوژ رومیزی
۵. بلوک خنک‌کننده
۶. وایتکس ۱۰ درصد
۷. گان و دستکش
۸. دستگاه Rotor-Gene و MIC یا دیگر دستگاه‌ها کانال‌های فلورسنت مخصوص Green, Orange, Red, Yellow و یا فلورفورهای FAM, Texas Red, Cy5 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 لوله‌های 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 کارکنان آموزش دیده 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 آماده‌سازی مخلوط واکنش از فضای اضافه کردن نمونه و نمونه استاندارد جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید.
۴. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.
۵. ایمنی زیستی در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی و زیست-پزشکی چاپ پنجم را مطالعه فرمایید.

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 فرآیند 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 سرسمپلرهای فیلتر دار و RNase & DNase free استفاده نمایید.
۳. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای SARS-CoV-2، آنفولانزای A و/یا آنفولانزای B نمونه‌های گرفته‌شده از مریض، کنترل‌ها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده‌سازی و مخلوط کردن محتویات MasterMix صورت پذیرد.

¹ Good Laboratory Practice

² Personal Protective Equipment

۴. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.
۵. 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 می شود.
۶. تمام مراحل مربوط به تهیه MasterMix باید بر روی یخ یا جعبه های 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.
۷. هنگام کار با مواد شیمیائی، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یک بار مصرف و عینک محافظ داشته باشید.
۸. 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.
۹. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.
۱۰. هنگام کار با نمونه ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش ها تعویض شوند.
۱۱. از تیپ های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه ها و مواد موجود در کیت از میکرو تیپ های فیلتر دار برای جلوگیری از ورود آلودگی نوکلئیک اسید استفاده کنید.
۱۲. لطفاً لوله های PCR را با نایلون یک بار مصرف بسته بندی کرده و به درستی دور بیندازید. لوله های PCR را پس از امپلیفای باز نکنید.
۱۳. همه مواد یک بار مصرف هستند، مجدداً استفاده نکنید.
۱۴. مواد موجود در کیت که بلا استفاده هستند، کیت استفاده شده و زباله ها باید به درستی دور انداخته شوند.
۱۵. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت ها و تجهیزات را با اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ اسپری کنید.

کنترل ها

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 شامل نمونه‌های سیستم تنفسی شامل: سوآب از انتهای حلق 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 موردقبول نیستند.
- نمونه‌های سرم خون، فقط در افرادی که load ویروس بالاست، ممکن است مثبت باشد.
۶. نمونه‌ها را می‌توان در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، تا ۷۲ ساعت پس از جمع‌آوری نگهداری نمود.
۷. اگر احتمال تأخیر در استخراج نمونه‌ها وجود دارد، آن‌ها را در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین‌تر نگهداری نمایید.
۸. نوکلئیک اسیدهای استخراج‌شده باید در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین‌تر نگهداری شوند.
۹. نمونه‌ای 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 نمی‌باشد.
- گایدلاین‌های مورداستفاده حین جمع‌آوری، استخراج و تست نمونه‌های 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 آزمایشگاه‌های 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 فرایند 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 فرایند استخراج و PCR را کنترل نمود.

عوامل تداخلی

حضور EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه های سیلیس ($1\mu\text{l}$)، خون ($1\mu\text{l}$)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر) و بافر لیز موجب مهار واکنش PCR می شود. وجود مهارکننده در واکنش با ژن کنترل داخلی قابل ردیابی است

خالص سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسید نوکلئیک باید توسط کیت های جداسازی موجود در بازار مطابق پروتکل های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود. نمونه ها باید با کیسه یخ زیر صفر درجه سانتی گراد منتقل شده و استخراج شوند تا بلافاصله RNA به دست آید. کیت استخراج RNA در این کیت گنجانده نشده است.

آماده سازی و اضافه کردن الگو

به منظور انجام تست طبق جدول ۲ از محتویات درون کیت به تعداد واکنش مورد نظر به تیوب های واکنش اضافه نمایید. در مرحله بعد، پس از آماده سازی محلول ها و انتقال آن به تیوب های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی را برای بررسی NTC به تیوب مورد نظر اضافه نموده، برای این کار، ۵ میکرو لیتر از آب بدون نوکلئاز موجود در کیت را به تیوب کنترل منفی بی افزایید و درب لوله ها را ببندید. سپس لوله ها را به منطقه کار با اسید نوکلئیک انتقال دهید، ۵ میکرو لیتر از کنترل مثبت و ۵ میکرو

لیتر 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	Volume
20x RTase	1 µl
5x Reaction Buffer	4 µl
SuperMix	4 µl
Nuclease-Free Water	6 µl
Final Volume (Master Mix)	15 µl

جدول ۲. الگوی مخلوط کردن محتویات MasterMix

Reagent	Volume
Master Mix	15 µl
NTC/PTC/Sample	5 µl
Final Volume	20 µl

جدول ۳. الگوی اضافه کردن نمونه

لوله‌ها را ببندید، مختصراً سانتریفیوژ کنید، آن‌ها را داخل دستگاه قرار دهید و اجازه دهید مطابق مشخصات برنامه قیدشده در جدول شماره ۴ تکثیر شوند. هنگام استفاده از کنترل مثبت یا مواد بالینی بسیار مراقب باشید.

برنامه‌ریزی دمایی

این دستورالعمل برای دستگاه Rotor-Gene توصیف شده است. دیگر دستگاه‌های Real-Time PCR دارای کانال‌های Red (CY5), Orange (ROX or Texas Red), Green (FAM) و Yellow (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	40
Annealing and Acquisition on Channel Green (FAM) , Orange (Texas Red) , RED (Cy5) and Yellow (HEX)	57°C	45 sec	
Extension	72°C	15 sec	

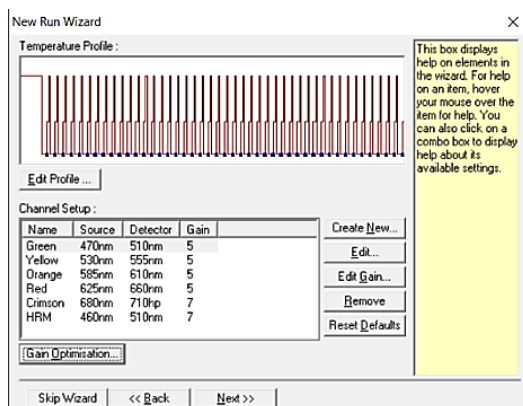
جدول ۴. برنامه ریزی دمایی

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 دستگاه‌ها

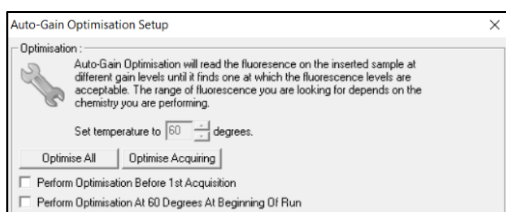
دستگاه Rotor-Gene

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



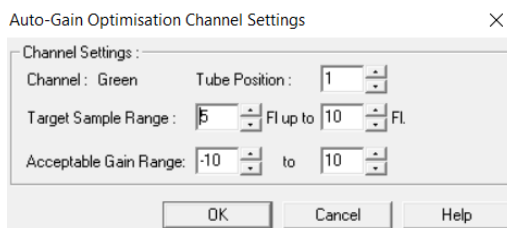
شکل ۱: تنظیمات دستگاه برای Gain Optimization

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimize Acquiring برای هر ۴ کانال سبز، زرد، نارنجی و قرمز، بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



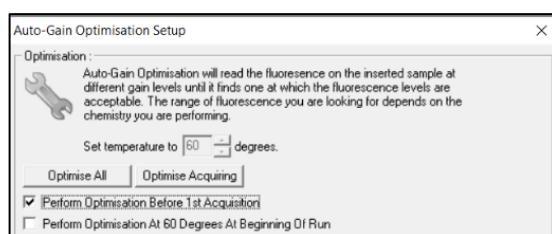
شکل ۲: تنظیمات دستگاه برای Auto Gain Optimization

توجه نمایید Gain دستگاه باید برم بنای تیوب شامل MasterMix حاوی PTC، انجام شود، بنابراین عدد نوشته‌شده در کادر Tube Position باید صحیح نوشته‌شده 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).



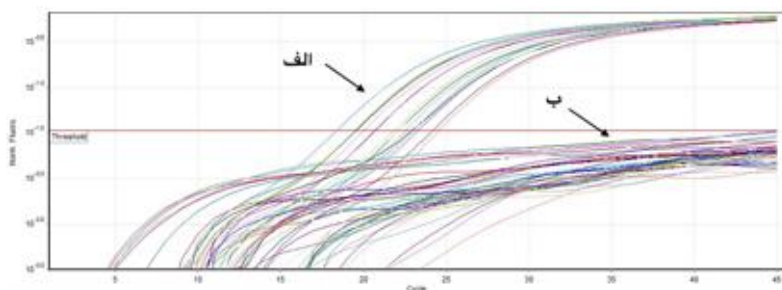
شکل ۴: تنظیمات دستگاه برای Auto Gain Optimization

آنالیز نتایج

آنالیز نتایج توسط نرم‌افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در ۴ کانال رنگی Green و Yellow و Orange و Red و یا فلورفورهای FAM و HEX و ROX و Cy5 آستانه را در بازه‌ی مناسب قرار دهید. نتایج را به‌صورت زیر تفسیر کنید:

نمونه زمانی مثبت می‌شود که دارای شرایط زیر باشد:

۱. دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد (شکل ۵ - گراف‌های الف).
- گراف‌های خط صاف مؤید حضور RNA ویروسی نبوده و منفی تلقی می‌شوند (شکل ۵ - گراف‌های ب).



شکل ۵: تفاوت گراف‌های سیگموتیدی و گراف‌های صاف

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

۳. مقادیر Ct ژن‌های N/RdRp، M و NS1 (کانال Orange) کمتر از ۳۲ مورد قبول بوده و مثبت تلقی می‌شوند.

۴. کنترل منفی: نمونه NTC نباید در هیچ یک از کانال‌های Orange، Yellow، Green و Red دارای Ct پایین‌تر از ۳۵ باشد. در غیر این صورت واکنش فاقد اعتبار بوده و نیازمند تکرار است.

۵. کنترل مثبت: Ct کانال‌های Orange، Yellow، Green و Red نمونه PTC باید کمتر از ۳۰ باشد. در غیر این صورت واکنش فاقد اعتبار بوده و نیازمند تکرار است.

۶. ممکن است چندین ویروس در یک نمونه تشخیص داده شوند.

۷. تست‌های با نتایج Invalid معتبر نبوده و نیاز به نمونه‌گیری مجدد و تکرار دارند.

Results Analysis	Tests			
	Rnase P Gene IC (Yellow-HEX)	Inf A Gene Flu-A (Green-FAM)	N ₉ RdRp Genes Covid-19 (Orange-Texas red)	Inf B Gene Flu-B (Red-Cy5)
PTC	+	+	+	+
NTC	-	-	-	-
Invalid	-	-	-	-
Influenza A Detected	+	+	-	-
COVID-19 Detected	-	-	+	-
Influenza B Detected	+	-	-	+
Virus infection Not Detected	+	-	-	-
Influenza A/B Detected	+	+	-	+
COVID-19/ Influenza A Detected	+	+	+	-
COVID-19/ Influenza B Detected	+	-	+	+
Influenza A, Influenza B and COVID-19 Detected	+	+	+	+

جدول ۵. تفسیر نتایج

رفع مشکل

مشکل	دلیل بروز مشکل	اقدام اصلاحی
1	هیچ سیگنالی دریافت نشده ولی کنترل مثبت سیگنال دارد.	استخراج RNA با برخی از کیت‌ها ممکن است همراه با برخی ناخالصی‌هایی باشد که با مسترمیکس واکنش مهاري دهد بنابراین میزان RNA را تا 3 μ L کاهش دهید.
2	هیچ سیگنالی از هیچ کانالی دریافت نمی‌شود (حتی در نمونه کنترل مثبت کیت نیز هیچ سیگنالی رؤیت نشده)	مشکل از مستر میکس می‌باشد مشکل از دستگاه یا نرم‌افزار آن می‌باشد از نحوه run دستگاه و همچنین سلامت دستگاه اطمینان حاصل کنید.
3	رؤیت سیگنال در نمونه کنترل منفی	آلودگی فضای هود یا work station که میکس اولیه آماده می‌گردد. 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

		می کنید 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.
4	شدت فلورسنت کم است	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.
5	سیگنال فلورسنت حالت سیگموئیدی ضعیفی دارد	در صورت امکان دوباره فرآیند استخراج RNA و یا نمونه گیری را تکرار کنید.
6	گرفتن سیگنال های خطی (noise)	برای دستگاه Qiaqen (کوربت) گزینه outlier removal را طبق شرایط بهینه نمونه روی ۵٪ یا ۱۰٪ بگذارید.
7	رویی برخی نمونه ها سیگنال برای RP دریافت نمی شود	اگر روی نمونه در سه کانال هیچ سیگنالی رؤیت نشد، نشان دهنده کیفیت نامناسب RNA می باشد و نمونه گیری باید مجدد تکرار شود. (اگر این موضوع در سیستم شما زیاد رخ می دهد مانند مورد ۱ حجم RNA را تا ۳ μ L کاهش دهید.)
	رقابت واکنش	اگر نمونه مثبت باشد و در کانال های دیگر سیگنال رؤیت شود و فقط سیگنال کنترل

مثبت وجود نداشته باشد نمونه مثبت تلقی خواهد شد.		
اگر از اینکه درب استریپ ها کاملاً محکم بسته شده اند اطمینان دارید، با تکنسین دستگاه تماس حاصل فرمایید.	مشکل از دستگاه می باشد	8 سیگنال ها سیگموئیدی هستند ولی موج می باشند.

جدول ۶. رفع مشکل

ارزیابی آنالیتیکال

حساسیت آنالیتیکال

با استفاده از پایگاه های داده NCBI Virus، NCBI و Influenza Database ده هزار توالی اخیر برای ویروس های آنفولانزا A و B و تمام توالی های ثبت شده برای کروناویروس به صورت ژنوم کامل و یا نواحی ژنومی مورد نظر شناسایی گردید و به منظور طراحی پرایمر و پروب، مورد استفاده قرار گرفت.

با توجه به نتایج حاصله، حد پایین تشخیصی (LOD) برای این کیت در تایپ های مختلف به شرح زیر است (جدول ۷).

Samples (LOD)	Percent of Replicates Positive		
	Flu A	Covid-19	Flu B
S1(500 Copy/ml)	100%	100%	100%
S2(400 Copy/ml)	100%	100%	100%
S3(300 Copy/ml)	100%	100%	100%
S4(200 Copy/ml)	100%	95%	95%
S5(100 Copy/ml)	95%	75%	60%

جدول ۷. حد پایین تشخیصی کیت

با توجه به نتایج گرفته شده، LOD آنفلوآنزا B برابر با 200 copy/MI و LOD آنفلوآنزا A برابر با 100 copy/mL و همچنین LOD کرونا برابر با 200 copy/mL برآورد گردید.

واکنش متقاطع

به منظور بررسی و اثبات اختصاصیت پرایمرها و پروب های طراحی شده برای ویروس آنفلوآنزای A/B و SARS-CoV-2، احتمال واکنش دهی متقابل و شناسایی غیراختصاصی 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), Enteroviruses (taxid:12059)

باکتری های بیماری زای 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 scrofulaceum (taxid:1783)

ارزیابی کلینیکال

حساسیت و اختصاصیت کلینیکال

به منظور تعیین حساسیت و اختصاصیت کلینیکی، ۱۰۰ نمونه مثبت آنفولانزای A، B و SARS-CoV-2 و ۱۰۰ نمونه منفی در مقایسه با کیت مرجع ارزیابی شدند. نتایج در جدول شماره ۸ آورده شده است.

	Influeza A	Influenza B	SARS-CoV-2
حساسیت کلینیکی	100%	93%	96%
اختصاصیت کلینیکی	100%	100%	100%

جدول ۸. حساسیت و اختصاصیت کلینیکال کیت

پشتیبانی فنی

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

✓ ۰۹۹۳۶۶۹۳۹۴۱ (آقای قره داغی)

✓ ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

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

اطلاعات تماس

شرکت فناوری بن یاخته- گروه سین مورو

دفتر مرکزی: تهران، سعادت‌آباد، میدان فرهنگ، بلوار ۲۴ متری سعادت‌آباد، خیابان

حیدرینیا (دوم شرقی)، پلاک ۹، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی: ۱۹۹۷۷۷۵۵۵۵ تلفن تماس: ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

Web Site : www.Senmurv.co

Email : info@senmurv.ir