محصولی از شرکت لیوژن فارمد

بهترین خود باشید

# LiCovid™

## کیت تشخیص مولکولی 2019-nCoV RT-qPCR

(۱۰۰ واکنش)

DKB_61/0

## مقدمه

کیت تشخیصی LiCovid به منظور شناسایی ویروس جدید کرونا ۲۰۱۹ (nCoV-2019) در نمونه های تنفسی انسان طراحی شده است. این کیت با هدف قرار دادن ژن های E و RdRp با استفاده از روش Real–Time PCR بر اساس روش مرجع WHO برای شناسایی (nCoV-2019) عمل می کند.

آزمون Real–time PCR بر اساس سیستم پروب TaqMan انجام می شود. پروب های اختصاصی COVID–19 برای تشخیص ژن های E و RdRp در کانال سبز با رنگ فلورسانس FAM طراحی شده اند. همچنین پروب برای ژن کنترل داخلی در کانال زرد با رنگ فلورسانس HEX نشاندار شده است.

## اقدامات و هشدارهای ایمنی زیستی

• کارکنان باید با پروتکل و ابزارهای مورد استفاده آشنا باشند.

• هنگام کار با نمونه های بالینی، از وسایل محافظ شخصی (مانند لباس، دستکش، شیلد، عینک محافظ) استفاده کنید.

• کلیه مراحل آماده سازی و کار با نمونه، بایستی در فضای BSL2 یا سطوح ایمنی زیستی بالاتر و در زیر هود بیولوژیکی کلاس II انجام شود.

• کنترل های مثبت و کلیه نمونه های بیمار باید به عنوان نمونه های عفونی در نظر گرفته شده و مراحل غیرفعالسازی ویروس و نیز امحاء نمونه باید مطابق با پروتکل های دفع و امحاء نمونه های عفونی بیولوژیک انجام شود.

• از خوردن، آشامیدن، سیگار کشیدن، استعمال لوازم آرایشی و استفاده از لنزهای تماسی در تمام فضاهای آماده سازی نمونه و آزمون جدا خوددرای نمایید.

• هنگام استفاده از کیت، به تاریخ انقضاء چاپ شده بر روی جعبه کیت توجه نموده و از محصول منقضی شده استفاده نکنید.

• از صحت نصب، کارکرد و کالیبراسیون تمام ابزارهای مورد استفاده اطمینان حاصل کنید.

• در هنگام کار با کیت مواد و میکروتیوب های واکنش Real–time PCR ، از دستکش بدون پودر استفاده کرده و آن ها را بر روی یخ و یا رک های خنک کننده قرار دهید.

• بلافاصله پس از استفاده از کیت، آن را در شرایط بهینه درج شده بر روی جعبه کیت منتقل کرده و نگهداری نمایید.

## نمونه های قابل قبول برای آزمون:

نمونه های تنفسی شامل آسپیرات ها یا شستشوهای بینی یا حلق و بینی، سواب های نازوفارنکس یا اوروفارنژال، لاواژ برونکوآلوئولار و آسپیرات های نای و خلط می باشد.

## شرایط نگهداری نمونه:

– نمونه ها تا ۷۲ ساعت پس از جمع آوری می توانند در دمای ۴°C نگهداری شوند.

– در صورتیکه امکان تاخیر در استخراج نمونه وجود داشته باشد، نمونه ها را در دمای ۸۰°C– نگهداری کنید.

– اسیدهای نوکلئیک استخراج شده باید در دمای ۸۰°C– نگهداری شوند.

## تجهیزات مورد نیاز :

- میز کار دارای لامپ UV و فیلتر HEPA / هود لامینار کلاس II
- میکرواسپین–ورتکس
- میکروسانتریفیوژ
- سمپلر و سر سمپلر مربوطه (۱۰–۲ میکرولیتر، ۲۰۰–۲۰ میکرولیتر و ۱۰۰۰–۱۰۰ میکرولیتر)
- رک های خنک کننده فلزی ویژه آماده سازی واکنش های Real–time PCR
- فریزرهای ۲۰°C– و ۸۰°C– ، یخچال ۸°C–۲
- دستگاه Real–time PCR
- کیت یا سیستم اتومانیک استخراج اسید نوکلئیک
- میکروتیوب های مخصوص واکنش Real–time PCR
- میکروتیوب های استریل (بدون DNase و RNase)

## حمل و نقل و شرایط نگهداری کیت:

کیت را بر روی یخ خشک حمل نموده و بلافاصله پس از دریافت در دمای ۲۰±۵ °C– نگهداری کنید.

## استخراج اسید نوکلئیک

عملکرد سنجش مبتنی بر روش RT–PCR، بستگی به میزان و کیفیت نمونه RNA دارد. از این رو روشهای استخراج RNA بایستی برای بازیابی و خلوص نمونه RNA ، مناسب و معتبر باشند.

روشهای تجاری موجود برای استخراج RNA مطلوب و با کیفیت، عبارتند از:

سیستم هایbioMérieuxNucliSens® و کیت های:

RNeasy® Mini (QIAGEN), EZ1 یا QIAamp® Viral RNA Mini, QIAamp® MinElute Virus Spin DSP Virus (QIAGEN), Roche MagNA Pure Compact RNA Isolation, Roche MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation, and Roche MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume, Invitrogen ChargeSwitch® Total RNA Cell.

- پس از استخراج RNA و استفاده از آن در واکنش، باقیمانده نمونه را فوراً در دمای ۸۰°C- قرار دهید.
- جهت انجام آزمون RT-PCR، به مقدار مورد نیاز نمونه RNA از فریزر خارج نمایید. نمونه دریافت شده از بیمار و یا RNA استخراج شده از آن را بیش از یکبار ذوب یا فریز نکنید.

## محتویات کیت:

| اجزاء کیت | حجم(میکرولیتر) |
|---|---|
| One-Step RT qPCR Mix | ۵۰۰ |
| Probe/Primer Mix 1 (E و IC ژن های) | ۵۰۰ |
| Probe/Primer Mix 2 (RdRp ژن) | ۵۰۰ |
| Positive Control 1 (E ژن) | ۱۰۰ |
| Positive Control 2 (RdRp ژن) | ۱۰۰ |
| RNase Inhibitor | ۱۰۰ |
| Nuclease-free Water | ۵۰۰ |

## دستگاه های مورد کاربرد

این کیت قابلیت انجام در تمامی دستگاه های Real Time PCR دارای کانال های HEX و FAM را دارا می باشد.

## پروتکل آزمون تشخیصی RT- qPCR

بر اساس پروتکل WHO ، ابتدا آزمون غربالگری در سطح اول جهت احراز وجود ژن E و به دنبال آن آزمایش تأییدی نهایی برای وجود ژن RdRp را انجام دهید. در آزمون اول، مخلوط Probe/Primer Mix 1 علاوه بر پروب/پرایمر ژن E که در کانال FAM خوانش می شود، حاوی پروب/پرایمر ژن Internal Control می باشد. ژن Internal Control در کانال HEX خوانش شده و تکثیر آن، کیفیت RNA استخراج شده را تایید می کند.

۱ – سنجش ژن های E و Internal Control (IC)

با توجه به جدول زیر، برای هر نمونه RNA ، یک واکنش برای ژن هدف E و ژن IC آماده نمایید:

ژن های IC و E

| اجزاء | حجم(میکرولیتر) |
|---|---|
| One-Step RT qPCR Mix | ۵ |
| RNase Inhibitor | ۱ |
| Probe/Primer Mix 1 | ۵ |
| Sample | ۴ |
| Nuclease-free Water | تا حجم ۲۰ |

۲– سنجش ژن RdRp

با توجه به جدول زیر، برای هر نمونه RNA ، یک واکنش برای ژن هدف RdRp آماده نمایید:

ژن RdRp

| اجزاء | حجم(میکرولیتر) |
|---|---|
| One-Step RT qPCR Mix | ۵ |
| RNase Inhibitor | ۱ |
| Probe/Primer Mix 2 | ۵ |
| Sample | ۴ |
| Nuclease-free Water | تا حجم ۲۰ |

۳– کنترل مثبت

– برای تهیه واکنش حاوی کنترل مثبت برای ژن E ، مقدار ۴ میکرولیتر از Positive Control 1 را به تیوب واکنش مربوطه اضافه نمایید.

– برای تهیه واکنش حاوی کنترل مثبت برای ژن RdRp ، مقدار ۴ میکرولیتر از Positive Control 2 را به تیوب واکنش مربوطه اضافه نمایید.

۴– واکنش بدون نمونه الگو (NTC: Non Template Control)

– برای تهیه واکنش NTC برای هر یک از ژن های E و RdRp ، در میکروتیوب های جداگانه برای هر ژن، مقدار ۹ میکرولیتر از آب Nuclease–free را به تیوب واکنش مربوطه اضافه نمایید.

۵- انجام آزمایش Real-time PCR

- میکروتیوب های آماده شده را در دستگاه Real-time PCR قرار دهید.
- کانال مربوط به خوانش رنگ های فلورسانس را تعیین کنید.

| No | کانال | طول موج برانگیختگی(نانومتر) | طول موج شناسایی(نانومتر) | ژن |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | FAM | ۴۷۰ | ۵۱۰ | E و RdRp |
| ۲ | HEX | ۵۳۰ | ۵۵۵ | IC |

- آزمون را مطابق برنامه دمایی ذکر شده در جدول زیر راه اندازی کنید.

| تعداد سیکل | زمان | دما (°C) |
|---|---|---|
| ۱ | ۲۰ دقیقه | ۵۰ |
| ۱ | ۵ دقیقه | ۹۴ |
| ۴۰ | ۳۰ ثانیه | ۹۴ |
| | ۴۵ ثانیه | ۵۵ |

## آنالیز نتایج:

۱- کنترل مثبت

در مرحله اول، عملکرد کنترل مثبت را بررسی کنید. Ct منحنی کنترل مثبت برای هر دو ژن E و RdRp باید در محدوده ۳ ± ۲۰ مشاهده شود. تکثیر خارج از این محدوده قابل قبول نبوده و آزمایش باید تکرار شود.

۲- واکنش NTC

در شرایط ایده آل، نتیجه واکنش NTC، باید بصورت یک خط مسطح (نتیجه منفی)، را ارائه دهد که نشاندهنده عدم آلودگی مواد زمینه واکنش می باشد. از این رو:

- مشاهده منحنی تکثیر NTC در $Ct > ۳۵$ معتبر نبوده و نتیجه آزمون از این نظر مورد تایید است و نیازی به تکرار آزمون نیست.
- در صورت مشاهده منحنی تکثیر در $Ct \leq ۳۵$ ، نتایج نامعتبر بوده و بایستی آزمون مجددا تکرار شود.

۳- کنترل داخلی (IC)

منحنی تکثیر بدست آمده برای ژن کنترل داخلی IC، نشاندهنده استخراج موفقیت آمیز RNA و نیز عملکرد مطلوب و کیفیت مواد بیولوژیکی واکنش می باشد.

## بررسی نمونه مورد آزمون:

– نمونه هایی که برای ژن مورد نظر مثبت هستند، بایستی دارای منحنی "سیگموئیدی" باشند.

– اگر فلورسانس منحنی از خط Thereshold عبور کند و عدد Ct را نشان دهد، منحنی تکثیر قابل قبول است.

– اگر نمونه تست دارای منحنی تکثیر با مقدار Ct ≤ ۳۵ باشد ، موید آن است که نمونه، برای nCoV-2019 مثبت است.

– اگر نمونه مورد آزمون دارای منحنی تکثیر با مقدار Ct > ۳۵ باشد، بایستی آزمون تکرار شود. چنانچه نتایج مشابه دیده شد، نمونه برای nCoV-2019 مثبت است.

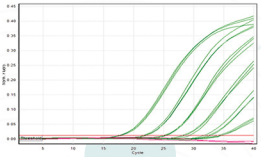
– اگر نمونه مورد آزمون مقدار Ct ≤ ۳۵ را تنها برای یکی از ژنهای E یا RdRp داشته باشد و هیچ گونه منحنی تکثیر برای ژن دیگر مشاهده نشود، بایستی آزمون تکرار شود. چنانچه نتایج مشابه دیده شد، نمونه برای nCoV-2019 مثبت است.

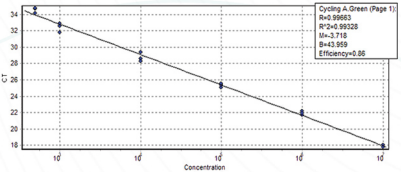
## تفسیر نتایج:

| سیگنال qPCR | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ژن هدف E | + | + | - | - | + | + | + | - |
| ژن هدف RdRp | + | - | + | - | + | + | - | + |
| کنترل مثبت | + | + | + | + | + | + | + | + |
| کنترل داخلی IC | + | + | + | + | + | - | - | - |
| NTC | - | - | - | - | Ct<35 | -/+ | -/+ | -/+ |
| نتایج | مثبت | تکرار تست | تکرار تست | ضعیف | نامعین | تکرار تست/ استخراج RNA | تکرار تست/ استخراج RNA | تکرار تست/ استخراج RNA |

## نتایج معتبرسازی برای ژن RdRp :

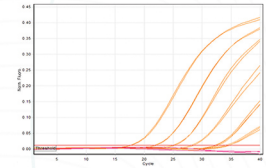
کمترین مقدار قابل اندازه گیری (LOQ ): ۳۵۴ کپی در هر واکنش
کمترین مقدار قابل تشخیص (LOD): ۶۲ کپی در هر واکنش
شیب خط: ۳/۷ – بازده تست: ۰/۸۵

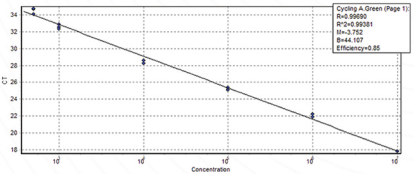





## نتایج معتبرسازی برای ژن E :

کمترین مقدار قابل اندازه گیری (LOQ ): ۳۷۷ کپی در هر واکنش
کمترین مقدار قابل تشخیص (LOD): ۷۱ کپی در هر واکنش
شیب خط: ۳/۷ – بازده تست: ۰/۸۵






منابع:

1-2019-nCoV WHO qPCR kit (Quick User Guide). Version 1.1
2-Real-Time RT-PCR Panel for Detection 2019-Novel Coronavirus (Centers for Disease Control and Prevention, Respiratory Viruses Branch, Division of Viral Diseases) (Feb 2020)
3-Instruction for use of detection kit for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCov) RNA (PCR-Fluorescence Probing). DAAN Gene co. Jan 2020

| | | | |
|---|---|---|---|
| | Temperature Limitation | IVD | In Vitro Diagnostic Medical Device |
| | Use by MM-YYYY | | Keep Dry |
| REF | Catalogue number/Reference number | | Biological Risk |
| LOT | Lot Number/ Batch Code/Batch Number | | Consult Instruction For Use |
| | Data of Manufacture | | Place for opening of The Seal |

آدرس : تهران، خیابان ایتالیا، حدفاصل خیابان قدس و خیابان وصال شیرازی،
پلاک ۴۱، طبقه چهارم، شرکت لیوژن فارمد.
تلفن : ۸۸۹۹۶۸۲۸–۰۲۱

وبسایت ها:
www.livogen.co
www.boomix.ir
www.masscenter.ir