دستورالعمل

کیت غربالگری مولکولی سویه‌های جهش‌یافته ویروس SARS-CoV-2

۱) مقدمه

با افزایش شیوع کرونا ویروس جدید SARS-CoV-2 در جهان، جهش (موتاسیون)های مختلفی در این ویروس بوجود می‌آید که باعث بوجود آمدن واریانت‌های ژنتیکی مختلفی از SARS-CoV-2 در مناطق مختلف جغرافیایی می‌شود. اخیرا چندین سویه‌ی جهش یافته از این ویروس بعنوان سویه‌های نگران کننده (Variant of concern) یا VOC مطرح هستند (جدول ۱) که شامل سویه‌های انگلیسی یا آلفا (B.1.1.7)، آفریقایی یا بتا (B.1.351)، برزیلی یا گاما (P.1)، هندی یا دلتا (B.1.617) و اومیکرون (B.1.1.529) هستند. هر یک از این سویه‌های جهش‌یافته دارای جهش‌های منحصر بفرد در نواحی مختلف ژنوم خود هستند. مهمترین جهش‌های بوجود آمده در ژن اسپایک (*S*) این ویروس که بعنوان Mutation of concern (MOC) مطرح هستند شامل جهش‌های N501Y، E484K، L452R و K417N هستند که می‌توانند باعث ایجاد تغییرات ساختاری مهمی در پروتئین اسپایک شوند و از این طریق بر رفتار ویروس اثر بگذارند. شواهد اخیر نشان داده‌اند که این جهش‌های بوجود آمده در سویه‌های VOC ممکن است باعث عدم تشخیص ویروس، افزایش عفونت‌زایی ویروس، مقاومت به درمان‌های مبتنی بر آنتی‌بادی مونوکلونال و سرم درمانی و همچنین ایجاد تاثیر احتمالی منفی بر عملکرد واکسن‌ها شوند. شناسایی و مانیتور کردن این سویه‌های نوظهور می‌تواند به تشخیص و کنترل بیماری کووید ۱۹ کمک نماید. ژنوتایپینگ ویروس SARS-CoV-2 بر اساس جهش‌های MOC می‌تواند در تشخیص واریانت‌های ژنتیکی مذکور مفید باشد. روش‌های ژنوتایپینگ مختلف به‌منظور بررسی پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) وجود دارند که از آن جمله می‌توان به روش تکمن ریل تایم پی‌سی‌آر (TaqMan real-time PCR) اشاره نمود. این روش در مقایسه با روش گلد استاندارد (توالی‌یابی DNA)، سریعتر و کم هزینه‌تر می‌باشد.

جدول ۱) سویه‌های جهش یافته‌ی نگران کننده‌ی ویروس SARS-CoV2

	سویه	تشخیص برای اولین بار (کشور)	نامگذاری WHO	وضعیت جهش N501Y / E484K / L452R / K417N	سایر جهش‌های مهم در ژن S
۱	B.1.1.529	آفریقای جنوبی	Omicron	+ / + / − / −	Δ69/70, Δ144, N440K, T478K, Q493R, E484A, Y505H, N679K
۲	B.1.1.7	انگلیس	Alpha	+ / − /− / −	Δ69/70, Δ144, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H
۳	B.1.351	آفریقای جنوبی	Beta	+ / + / − / +	D80A, D215G, Δ241/242/243, D614G, A701V
٤	P.1	ژاپن / برزیل	Gamma	+ / + / −/ −	L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, H655Y, T1027I
٥	B.1.617.2	هند	*Delta	− / − / +/ −	E484Q

* سویه‌ی دلتا پلاس (Delta plus) دارای هر دو جهش L452R و K417N می‌باشد.

۲) موارد استفاده

کیت **"Delta vSNiP"** یک کیت ژنوتایپینگ بر پایه تکنیک TaqMan real-time PCR تک مرحله‌ای است که با استفاده از آن می‌توان به بررسی کیفی وجود یا عدم جهش‌های N501Y، E484K، L452R و K417N در نمونه‌های بالینی بدست آمده از افراد مبتلا به بیماری کووید۱۹ (COVID19) پرداخت. باتوجه به اینکه جهش‌های مذکور در برخی از واریانت‌های SARS-CoV-2 وجود دارد (جدول ۱)، کیت حاضر می‌تواند بعنوان یک تست *In vitro* غربالگری مولکولی به منظور افتراق واریانت‌های مختلف SARS-CoV-2 در نظر گرفته شود. لازم به ذکر است که حیطه‌ی کاربرد کیت حاضر "صرفا جهت تحقیقات" می‌باشد و نباید از نتایج آن در موارد تشخیص قطعی بالینی استفاده شود. بعد از غربالگری واریانت‌های ژنتیکی با استفاده از این کیت، برای تایید نهایی نوع واریانت می‌توان از روش‌های مبتنی بر توالی‌یابی استفاده نمود.

۳) اساس تست

اساس کار کیت حاضر بر پایه‌ی تکنیک TaqMan genotyping است. وضعیت هر کدام از چهار جهش مذکور در یک تیوب مجزا بررسی می‌شود. در هر تیوب، به‌منظور بررسی ناحیه‌ی جهش‌یافته مورد نظر (بعنوان مثال N501Y) از ۲ پروب اختصاصی با ۲ رنگ فلورسنت (فلوفور) متفاوت و خاموش کننده (کوئنچر) مربوطه استفاده می‌شود که هر کدام از آن‌ها می‌توانند یک آلل (یک آلل وحشی و یک آلل جهش یافته) را تشخیص دهند. در حین انجام PCR در صورت وجود آلل جهش یافته پروب اختصاصی آن و در صورت وجود آلل طبیعی پروب مربوط به آن متصل می‌شوند و پس از اتصال هریک از پروب‌ها، در اثر فعالیت اگزونوکلئازی آنزیم پلیمراز هیدرولیز می‌شوند. بدنبال هیدرولیز پروب، کوئنچر از فلوفور جدا شده و در نتیجه رنگ‌های فلورسنت مختلف آزاد می‌شوند که دستگاه Real-time PCR قادر به خوانش و ثبت آن می‌باشد. چنانچه آلل جهش یافته (مثلا N501Y) وجود داشته باشد پروب اختصاصی آن متصل شده و سپس هیدرولیز شده و رنگ خاص خود (بعنوان مثال رنگ زرد یا HEX) آزاد می‌شود. در صورت وجود آلل وحشی (N501)، پروب اختصاصی آن متصل و هیدرولیز می‌شود و در نتیجه رنگ فلورسنت دیگر (مثلا رنگ سبز یا FAM) آزاد می‌شود. در نهایت بعد از پایان واکنش PCR نتایج با استفاده از نرم افزار مربوطه آنالیز می‌شوند. لازم به ذکر است که این شرایط برای جهش‌های E484K و K417N برعکس می‌باشد. در صورت وجود الل وحشی (مثلا E484) رنگ زرد (HEX) و در صورت وجود الل جهش یافته (مثلا E484K) رنگ سبز (FAM) آزاد می‌شود.

٤) رفرنس‌ها

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), in COVID19. (2021). Availeble at: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/variant-surveillance/variant-info.html
2. S. J. R. da Silva *et al.*, Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19. *ACS infectious diseases* **6**, 2319 (Sep 11, 2020).
3. P. Spearman, Diagnostic testing for SARS-CoV-2/COVID19. *Current opinion in pediatrics* **33**, 122 (Feb 1, 2021).
4. H. Wang *et al.*, Multiplex SARS-CoV-2 Genotyping PCR for Population-Level Variant Screening and Epidemiologic Surveillance. *medRxiv*, 2021.04.20.21255480 (2021).
5. A. P. West *et al.*, Detection and characterization of the SARS-CoV-2 lineage B.1.526 in New York. *bioRxiv*, 2021.02.14.431043 (2021).

٥) محتوای کیت (٥٠ x ٤ تست)

پنل حاضر شامل ۴ بسته کیت است که هر کدام از کیت‌ها برای بررسی یکی از چهار جهش مذکور است. هرکدام از کیت‌ها دارای اجزای زیر می‌باشند:

	اجزا*	مقادیر
۱	2X One-Step Buffer	۱ تیوب x ۵۰۰ میکرولیتر
۲	20X RTase Mix	۱ تیوب x ۵۰ میکرولیتر
۳	P&P Mix	۱ تیوب x ۱۲۵ میکرولیتر
٤	Nuclease-Free Water	۱ تیوب x ۵۰۰ میکرولیتر
٥	Mutation C+ (control)	۱ تیوب x ۵۰ میکرولیتر
٦	Wild-Type C+ (control)	۱ تیوب x ۵۰ میکرولیتر

*توجه:

۱) تمامی اجزای کیت در دمای ۱۵− تا ۲۵− درجه سانتیگراد نگهداری شوند.

۲) تاریخ انقضای کیت بر روی آن درج شده است.

۳) تا حد امکان از ذوب و فریز شدن اجزای کیت خودداری شود (کمتر از ۳ بار). و در صورت نیاز از هرکدام از اجزا بر اساس نیاز الیکوت تهیه شود.

۵) محلول P&P Mix حاوی پرایمر و پروب نشاندار شده با مواد فلورسنت است و تا حد امکان در معرض نور مستقیم قرار نگیرد.

۶) حتما قبل از استفاده از هرکدام از محلول‌های موجود در کیت، ورتکس/ اسپین انجام شود.

٦) سایر تجهیزات و مصرفی‌های لازم

	دستگاه / مصرفی	تعداد	توضیحات
۱	ورک استیشن (کابینت PCR)	۲ عدد	یکی برای تهیه PCR mix و دیگری برای اضافه کردن RNA ویروسی و کنترل‌ها است.
۲	ست سمپلر با حجم‌های مختلف	۲ ست	هر یک ست در زیر هر ورک استیشن قرار داده شود.
۳	مینی اسپین / ورتکس	۲ عدد	هر کدام در زیر هر ورک استیشن قرار داده شود.
٤	مینی اسپین با روتور استریپ خور یا سانتریفیوژ پلیت خور	۱ عدد	به منظور سانتریفوژ کردن استریپ تیوب‌ها یا پلیت حاوی واکنش PCR قبل از قرار دادن در دستگاه Real-time PCR استفاده می‌شود.
٥	دستگاه Real-time PCR	۱ عدد	دستگاه دارای قابلیت خوانش در حداقل ۲ کانال FAM و HEX یا معادل طول موج آن‌ها باشد.
٦	کول رک (کرایو رک)	به تعداد لازم	برای حمل و نگهداری بافرها و نمونه‌های RNA در حین کار استفاده می‌شود.
۷	استریپ تیوب یا پلیت مخصوص Real-time PCR	به تعداد لازم	بر اساس نوع دستگاه Real-time PCR از نوع سفید یا شفاف استفاده می‌شود.
۸	اسپری حاوی محلول از بین برنده نوکلئازها	به مقدار لازم	به منظور تمیز کردن سطوح و تمامی وسایل استفاده می‌شود.
۹	سر سمپلر فیلتر دار در حجم‌های مختلف	به تعداد لازم	باید عاری از DNase و RNase باشند.

۷) ایمنی زیستی

- ❑ در حین کار با نمونه‌های بالینی حتما از وسایل حفاظتی (مثل دستکش، گان، ماسک و عینک محافظ) استفاده شود.
- ❑ کار با نمونه‌های بالینی، حتما در زیر هود میکروبیولوژیکی کلاس ۲ یا بالاتر انجام گیرد.
- ❑ تمامی مراحل انجام کار باید توسط افراد آموزش دیده انجام شود.
- ❑ دور ریختن بافرها، ریجنت‌ها و نمونه‌ها بر اساس مقررات و گایدلاین‌های مربوطه انجام شود:

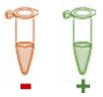
https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/lab-biosafety-guidelines.html

۸) پروتکل انجام تست

۱ نمونه‌گیری از نازوفارنکس یا اوروفارنکس

۲ استخراج RNA ویروسی با استفاده از کیت

۳ تشخیص مولکولی SARS-CoV2
(طراحی بر اساس WHO)



٤ غربالگری واریانت‌ها با استفاده از Delta vSNiP kit

❖ محدودیت‌ها

- ✓ هرگونه تغییرات در پروتکل پیش رو ممکن است باعث ایجاد خطا در نتایج حاصله شود.
- ✓ تست حاضر باید توسط افراد متخصص آموزش دیده انجام شود.
- ✓ نتایج قابل اطمینان بستگی به جمع‌آوری، حمل، ذخیره و نگهداری مناسب دارد.
- ✓ این روش نباید به‌طور مستقیم بر روی نمونه‌های بیمار انجام شود. قبل از انجام تست، حتما باید با استفاده از یک روش مناسب استخراج RNA از نمونه انجام شود.
- ✓ مهارکننده‌های موجود در حین استخراج RNA می‌توانند مانع از انجام واکنش نسخه‌برداری معکوس و یا تکثیر cDNA شوند.

۸-٤-۱) در زیر یک ورک استیشن، اجزای هر کیت را مطابق جدول زیر درون یک میکروتیوب عاری از نوکلئاز با یکدیگر مخلوط نمایید تا میکس واکنش ژنوتایپینگ بدست آید. بنابراین برای بررسی هر یک از جهش‌ها باید یک میکروتیوب مجزا حاوی میکس واکنش مربوطه را آماده نمود (۴ میکروتیوب برای بررسی ۴ جهش مورد نظر).

	اجزای واکنش*	حجم**
۱	2X One-Step Buffer	۱۰ میکرولیتر
۲	20X RTase Mix	۱ میکرولیتر
۳	P&P Mix	۲/۵ میکرولیتر
٤	Nuclease-Free Water	۱/۵ میکرولیتر
	حجم نهایی	۱۵ میکرولیتر

* قبل از انجام تست تمامی اجزای کیت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شوند تا به آرامی ذوب شوند. استفاده از کرایورک به منظور نگهداری محلول‌ها در این مرحله پیشنهاد می‌شود. سپس برای حل کردن و هموژن کردن محلول‌ها از ورتکس استفاده شود. در مرحله بعد، تمامی محلول‌ها اسپین شوند تا در صورتی که قطرات محلول روی درب تیوب‌ها باشد به ته میکروتیوب کشیده شود.

** مقادیر اورده شده در جدول به ازای یک نمونه (یک واکنش) هستند. در صورت استفاده از بیش از یک نمونه، تمامی مقادیر ضربدر تعداد نمونه‌ها شود. لازم به ذکر است که به ازای هر ۱۶ نمونه یک واکنش اضافی در نظر گرفته شود.

۸-٤-۲) به ازای هر نمونه، مقدار ۱۵ میکرولیتر از میکس واکنش را به هر چاهک از پلیت مخصوص Real-time PCR (یا هر تیوب از استریپ تیوب ۸تایی) اضافه نمایید.

۸-٤-۳) در زیر یک ورک استیشن دیگر مقدار **۵ میکرولیتر** از هر یک از RNA استخراج شده‌ی ویروسی را به میکس مرحله‌ی قبل اضافه و اسپین نمایید.

- **به‌منظور تعیین ژنوتایپ‌ها بهتر است که از RNAهای حاصل از نمونه‌های COVID19+ بعنوان الگو استفاده شود. این نمونه‌ها قبلا باید توسط یک کیت تشخیص مولکولی روتین بررسی شده باشند.** همچنین، می‌توان از RNAهای استخراج شده (شامل نمونه‌های مثبت و منفی از نظر وجود ویروس) نیز بصورت مستقیم بعنوان الگو در واکنش PCR استفاده نمود.
- در این مرحله، بطور موازی مقدار ۵ میکرولیتر از هر کدام از کنترل‌های مثبت (الل جهش یافته و فاقد جهش) و کنترل منفی (آب عاری از نوکلئاز) به‌صورت جداگانه به یک چاهک اضافه شوند.
- پس از خارج کردن نمونه‌های RNAها از فریزر، آن‌ها را برروی کرایورک مخصوص حمل و نگهداری نمایید.

۸-٤-٤) واکنش‌ها را به دستگاه Real-time PCR منتقل کرده و برنامه‌ی آورده شده در جدول زیر را اجرا نمایید.

سیکل	مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (ثانیه)
x ۱	نسخه‌برداری معکوس (سنتز cDNA)	۵۰	۶۰۰
x ۱	فعال شدن آنزیم پلیمراز	۹۵	۳۰۰
x ۴۵	باز شدن رشته‌های cDNA الگو	۹۵	۱۰
	جفت شدن پرایمرها و سنتز رشته های جدید	۵۵ یا ۵۰*	۳۰**

* ۵۵ درجه سانتیگراد برای N501Y، L452R و K417N * ۵۰ درجه‌ی سانتیگراد برای E484K

** خوانش فلوروسنت در کانال‌های FAM و HEX در این مرحله انجام شود و در صورت نیاز Passive reference dye (ROX) در حالت خاموش قرار داده شود (بعنوان مثال در دستگاه‌های ساخت کمپانی Applied Biosystems یا دستگاه‌های مشابه).

۸-٤-۵) بعد از انجام PCR، تفسیر نتایج بر اساس جدول زیر انجام شود.

تفسیر	N501Y FAM	N501Y HEX	L452R FAM	L452R HEX	E484K FAM	E484K HEX	K417N FAM	K417N HEX
احتمال وجود واریانت اومیکرون (B.1.1.529)	-	+	+	-	-	±	+	-
احتمال وجود واریانت لامبدا (C.37)	+	-	-	-	-	+	-	+
احتمال وجود واریانت دلتا (B.1.617.2)	+	-	-	+	-	+	-	+
احتمال وجود واریانت دلتا پلاس	+	-	+	-	-	+	+	-
احتمال وجود واریانت کاپا (B.1.617.1)	+	-	+	-	-	-	-	+
احتمال وجود واریانت آلفا (B.1.1.7)	-	+	-	+	-	+	-	+
احتمال وجود واریانت بتا (B.1.351)	-	+	-	+	-	+	-	+
احتمال وجود واریانت گاما (P.1)	-	+	-	+	-	+	-	-
احتمال وجود واریانت کلاسیک (Wuhan)	+	-	-	+	-	+	+	-
احتمال وجود واریانت اتا (B.1.525) یا یوتا (B.1.526)	+	-	+	+	-	-	+	-
نمونه فاقد RNA ویروسی یا احتمال وجود مهارکننده	-	-	-	-	-	-	-	-
احتمال وجود سایر واریانت‌ها یا واریانت‌های جدید	سایر حالات							

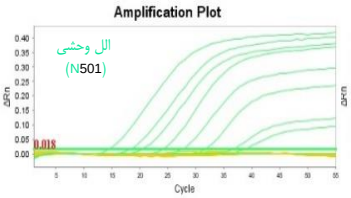
- مقادیر Ct (Cq) کمتر از ۴۰ بعنوان مثبت در نظر گرفته شوند.
- چنانچه در هر تیوب واکنش هر دو کانال FAM و HEX مثبت شوند احتمال آلودگی بین نمونه‌ای وجود دارد.
- کیت حاضر، برای هر جهش دارای ۲ نوع کنترل مثبت است. این کنترل‌ها شامل:

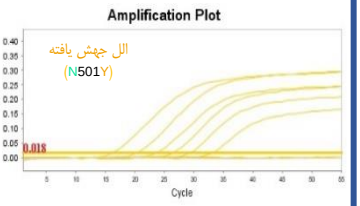
الف) کنترل‌های L452R,N501Y C+ برای آلل‌های جهش‌یافته (N501Y و L452R) هستند که در کانال HEX تشخیص داده می‌شوند (K417N,E484K C+ در کانال FAM تشخیص داده می‌شوند).

ب) کنترل‌های N,L Wild-Type C+ برای آلل‌های وحشی (N501 و L452) هستند که در کانال FAM تشخیص داده می‌شوند (K,E Wild-Type C+ در کانال HEX تشخیص داده می‌شوند).

۹) حساسیت آنالیتیکال

حد تشخیص (Limitation of detection, LOD) کیت با استفاده از ده سریال رقت از نمونه‌ی کنترل جهش‌یافته (با غلظت اولیه ۰/۱۲۵ ng/µl) و ده سریال رقت از نمونه‌ی کنترل وحشی (با غلظت اولیه ۰/۱۲۵ ng/µl) بعنوان الگوی ژنومی بصورت ۲ بار تکرار بررسی شد (شکل روبرو). ضریب رقیق سازی نمونه‌ها ۱۰ / ۱ در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که LOD تست حاضر معادل رقت هشتم یعنی **۰/۰۱۲۵ fg/µl** از ژنوم الگو برابر با تقریبا **٤ کپی** در میکرولیتر برای الل وحشی می‌باشد. همچنین کارایی PCR (E) بر اساس فرمول $E = -1+10^{(-1/slope)}$ محاسبه گردید. نتایج حاکی از E=96% برای الل وحشی و E=103% برای الل جهش یافته بود.





۱۰) اختصاصیت آنالیتیکال (Reactivity و Cross reactivity)

به منظور بررسیReactivity کیت، ابتدا مقایسه‌ی توالی پرایمرها و پروب‌ها (در دو حالت وحشی و جهش یافته) در مقابل توالی ثبت شده از ژنوم ویروس SARS-CoV2 انجام گرفت. سپس به منظور ارزیابی Cross reactivity مقایسه‌ی توالی پرایمرها و پروب‌ها در مقابل توالی‌های ثبت شده از ژنوم ویروس‌های شبیه SARS-CoV2، پاتوژن‌هایی که علائم مشابه با بیماری COVID19 ایجاد می‌کنند و همچنین میکروارگانیسم‌های فلور نرمال انجام شد. نتایج حاکی از Reactivity صد درصدی کیت حاضر در شناسایی SARS-CoV2 و عدم وجود Cross reactivity بود.

۱۱) ارزیابی بالینی

تشخیص روتین ویروس با استفاده از کیت استاندارد	تعداد	تشخیص با استفاده از کیت حاضر: مثبت	تشخیص با استفاده از کیت حاضر: منفی	حساسیت	اختصاصیت
مثبت از نظر وجود SARS-CoV2	۱۷۰	۱۷۰	-	۱۰۰٪	۱۰۰٪
منفی از نظر وجود SARS-CoV2	۲۰	-	۲۰	۱۰۰٪	۱۰۰٪

تشخیص جهش با استفاده از کیت استاندارد		تشخیص با استفاده از کیت حاضر: N501Y	تشخیص با استفاده از کیت حاضر: N501		
ویروس جهش یافته	۴۰	۴۰	-	۱۰۰٪	۱۰۰٪
ویروس وحشی	۲۵	-	۲۵	۱۰۰٪	۱۰۰٪

* لازم به ذکر است ارزیابی‌های بالینی تنها بر روی واریانت‌های آلفا، بتا و دلتا انجام گرفت و سایر واریانت‌ها بررسی نشدند.

DELTA BIOTECHNOLOGY
دلسا تشخیص آریا (دلتا)
آدرس: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز رشد فناوری
شماره تماس: ۰۳۱۹۱۰۱۰۶۵۱ ۰۲۱۹۱۰۱۰۶۵۱
وبسایت: www.deltabiotechno.com

REF کاتالوگ نامبر
LOT لات نامبر
RUO صرفا جهت تحقیقات
حاوی دستورالعمل
Σ تعداد تست‌ها
تاریخ انقضا
محدوده دمای نگهداری