Delta SARS-CoV-2+Flu+RSV Real-time PCR Kit

100 tests

دستورالعمل

DELTA BIOTECHNOLOGY
دلتا تشخیص آریا (دلتا)

REF DD009-001-100

کیت تشخیص همزمان ویروس‌های کووید-۱۹، انفلونزا و سینسیشیال تنفسی بر اساس تکنیک مالتیپلکس ریل تایم پی‌سی‌آر

۱) کاربرد کیت

کیت Delta SARS-CoV-2+Flu+RSV Real-time PCR به منظور انجام یک تست تشخیصی In vitro کیفی بر پایه‌ی تکنیک Multiplex probe-based one-step real-time RT-PCR طراحی شده است که برای تشخیص افتراقی RNA ژنومی کروناویروس جدید (SARS-CoV-2) عامل بیماری COVID-19، ویروس انفلونزا و ویروس RSV در نمونه‌های بالینی (سوآب نازوفارنژیال یا اوروفارنژیال) استفاده می‌شود. نتایج مثبت حاصل از انجام این تست، تاییدکننده‌ی وجود RNA ژنومی هریک از ویروس‌های SARS-CoV-2، ویروس انفلونزا و ویروس RSV در نمونه‌ی بالینی است.

۲) اساس تست

در این روش، دو ناحیه در ژن‌های *N* و *RdRp* ویروس SARS-CoV-2، یک ناحیه در ژن *NS1* ویروس انفلونزای A ، یک ناحیه در ژن *NP* ویروس انفلونزای B و یک ناحیه در ژن *M* ویروس RSV بعنوان اهداف تشخیصی در فرآیند PCR تکثیر می‌شوند. برای این منظور، ابتدا RNA ژنومی استخراج شده در یک تیوب تبدیل به cDNA می‌شود و بدنبال آن، در همان تیوب واکنش تکثیر اهداف ژنومی انجام می‌شود (تک مرحله‌ای). به‌منظور شناسایی نواحی هدف ویروسی از چهار ست پرایمر و پروب اختصاصی الیگونوکلئوتیدی استفاده می‌شود. این پروب‌ها که در سمت ´۵ دارای رنگ‌های فلوروسنت (فلوروکروم) مختلف و در سمت ´۳ دارای یک خاموش کننده (کوئنچر) هستند. دو پروب دارای فلوروکروم **HEX** برای شناسایی ژن *N* و *RdRp* ویروس SARS-CoV-2، دو پروب دیگر دارای فلوروکروم **FAM** جهت شناسایی ژن *NS1* و *NP* ویروس انفلونزا و پروب دارای فلوروکروم **Texas red** (**TxRed**) جهت شناسایی ژن *M* ویروس RSV است. حین انجام PCR در صورت وجود ژنوم هدف، پرایمرها و پروب‌های اختصاصی به نواحی مربوطه متصل می‌شوند. به‌منظور تکثیر cDNA هدف، آنزیم پلیمراز فعال شده و شروع به سنتز رشته‌های جدید می‌کند. در حین سنتز رشته‌های جدید، این آنزیم با استفاده از فعالیت اگزونوکلئازی باعث هیدرولیز پروب‌های متصل شده به نواحی هدف مربوطه شده و در نتیجه کوئنچر از فلوروکروم جدا شده و در نتیجه رنگ‌های فلوروسنت مختلف آزاد می‌شوند که دستگاه Real-time PCR قادر به خوانش و ثبت آن‌ها می‌باشد. در نهایت بعد از پایان واکنش PCR نتایج با استفاده از نرم افزار مربوطه آنالیز می‌شوند. لازم به ذکر است که در کیت حاضر از یک ست پرایمر و پروب دیگر دارای فلوروکروم **CY5** جهت شناسایی یک ژن ***House keeping*** انسانی بعنوان کنترل داخلی (Internal control) استفاده می‌شود.

۳) محتوای کیت

کیت حاضر برای انجام ۱۰۰ تست تشخیصی است و دارای اجزای زیر می‌باشد:

	ریجنت‌ها*	مقادیر
۱	20X RTase Mix	۱ تیوب X ۱۰۰ میکرولیتر
۲	SC-Flu-RSV Master Mix	۱ تیوب X ۱۴۰۰ میکرولیتر
۳	SC-Flu-RSV Positive Control	۱ تیوب X ۱۰۰ میکرولیتر
٤	No Template Control (NTC)	۱ تیوب X ۱۰۰ میکرولیتر

*** توجه:**

- ✓ تمامی اجزای کیت در دمای ۱۵- تا ۲۵- درجه سانتیگراد نگهداری شوند.
- ✓ تاریخ انقضای کیت بر روی آن درج شده است.
- ✓ تا حد امکان از ذوب و فریز شدن اجزای کیت خودداری شود (کمتر از ۵ بار).
- ✓ در صورت نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، در کمتر از یک هفته استفاده شود.
- ✓ در صورت نیاز از هرکدام از اجزا بر اساس نیاز الیکوت تهیه شود.
- ✓ محلول Mastermix حاوی پرایمر و پروب نشاندار شده با مواد فلوروسنت است و تا حد امکان در معرض نور مستقیم قرار نگیرد.
- ✓ حتما قبل از استفاده از هرکدام از محلول‌های موجود در کیت، ورتکس/ اسپین انجام شود.

۴) 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 کنترل‌های کیت است.
۲	ست سمپلر با حجم‌های مختلف	۲ ست	هر یک ست در زیر هر ورک استیشن قرار داده شود.
۳	مینی اسپین / ورتکسر	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.
۵	دستگاه Real-time PCR	۱ عدد	دستگاه دارای قابلیت خوانش در حداقل ۴ کانال FAM، HEX، Texas red و CY5 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 (RNaseZAP)	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.

۵) نمونه‌ی بالینی مورد استفاده

سوآب گرفته شده از **نازوفارنکس (NPS)** و یا **اوروفارنکس (OPS)**

- ✓ نمونه‌گیری بر اساس گایدلاین CDC انجام شود:
  (https://www.cdc.gov/flu/pdf/professionals/flu-specimen-collection-poster.pdf).
- ✓ نمونه‌های گرفته شده را می‌توان تا قبل از ۴۸ ساعت در دمای ۲- تا ۸- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری نمود. در غیر اینصورت، نمونه‌ها در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتیگراد یا کمتر نگهداری شوند.
- ✓ RNA ویروسی استخراج شده از نمونه‌های بالینی را می‌توان به مدت یکماه در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری نمود و بعد از آن به دمای ۷۰- درجه سانتیگراد انتقال داد.
- ✓ کارایی و پرفورمنس کیت حاضر بستگی به مقدار و کیفیت RNA استخراج شده دارد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود از یک کیت یا یک روش استخراج RNA ویروسی مناسب (چه دستی و چه اتوماتیک) استفاده شود.

٦) 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/mmwr/pdf/rr/rr6206.pdf

۷) پروتکل انجام تست

۷-۱) در زیر یک ورک استیشن، اجزای کیت را مطابق جدول زیر درون یک میکروتیوب عاری از نوکلئاز با یکدیگر مخلوط نمایید تا میکس واکنش PCR بدست آید.

	اجزای واکنش*	حجم
۱	20X RTase Mix	۱ میکرولیتر
۲	SC-Flu-RSV Master Mix	۱۴ 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.

۷-۲) 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.

۷-۳) 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.

- ○ در این مرحله، بطور موازی مقدار ۵ میکرولیتر از هر کدام از کنترل‌های مثبت SC-Flu-RSV Positive Control و کنترل منفی No Template Control موجود در کیت را نیز به‌صورت جداگانه به چاهک حاوی میکس واکنش اضافه شوند.

۷-٤) 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)
۱ x	نسخه‌برداری معکوس (سنتز cDNA)	۵۰	۹۰۰
۱ x	فعال شدن آنزیم پلیمراز	۹۵	۳۰۰
۴۵ x	باز شدن رشته‌های cDNA الگو	۹۵	۱۵
	جفت شدن پرایمرها و سنتز رشته های جدید	۶۰	۳۰ *

* خوانش فلوروسنت در کانال‌های **FAM**، **HEX**، **Texas red** و **CY5** 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).

۷-۵) بعد از انجام PCR، تفسیر نتایج بر اساس جدول زیر انجام شود.

FAM	HEX	TxRed	CY5	تفسیر
-	+	-	±	وجود RNA ژنومی ویروس SARS-CoV-2 (جواب تست مثبت است)
+	-	-	±	وجود RNA ژنومی ویروس انفلونزا (جواب تست مثبت است)
-	-	+	±	وجود RNA ژنومی ویروس RSV (جواب تست مثبت است)
+	+	-	±	وجود همزمان RNA ژنومی ویروس‌های SARS-CoV-2 و انفلوزا (جواب تست مثبت است)*
-	+	+	±	وجود همزمان RNA ژنومی ویروس‌های SARS-CoV-2 و RSV (جواب تست مثبت است)*
+	-	+	±	وجود همزمان RNA ژنومی ویروس‌های انفلونزا و RSV (جواب تست مثبت است)*
-	-	-	+	عدم وجود RNA ژنومی ویروس‌های SARS-CoV-2 ، انفلونزا و RSV (جواب تست منفی است)
-	-	-	-	نمونه گیری به درستی انجام نشده است (تکرار آزمایش) استخراج ژنوم به درستی انجام نشده است (تکرار آزمایش) احتمال وجود مهارکننده‌ی PCR در نمونه‌ی استخراج شده (تکرار آزمایش)

* احتمال وقوع هر یک از این سه حالت بسیار کم می‌باشد و احتمال وجود Cross-contamination نیز وجود دارد.

- ○ مقادیر Ct (Cq) کمتر از ۳۵ بعنوان مثبت از نظر وجود ویروس و مقادیر بزرگتر از ۴۰ بعنوان منفی از نظر وجود ویروس در نظر گرفته شوند. لازم به ذکر است که مقادیر Ct بین ۳۵ تا ۴۰ بدون نتیجه‌گیری (Inconclusive) است. در چنین مواقعی پیشنهاد می‌شود کلیه‌ی آزمایشات بر روی نمونه تکرار شود و در صورت مشاهده نتایج مشابه جواب تست مثبت است.
- ○ پروب شناسایی کننده‌ی ویروس SARS-CoV-2 با رنگ فلوروسنت HEX، ویروس انفلونزا با رنگ FAM، پروب شناسایی کننده ویروس RSV با رنگ TxRed و پروب شناسایی کننده‌ی ژن انسانی (بعنوان کنترل داخلی) با رنگ CY5 نشاندار شده است.
- ○ کیت حاضر دارای ۲ نوع نمونه‌ی کنترل مثبت و منفی است. مقادیر Ct هر چهار کانال FAM، HEX ، Texas red و CY5 برای کنترل مثبت کمتر از ۳۵ می‌باشند. نمونه‌ی کنترل منفی کیت حاضر آب عاری از نوکلئاز است که بعنوان NTC در نظر گرفته می‌شود. در صورت وجود آلودگی ریجنت‌های کیت با RNA ویروسی یا آلودگی‌های تکنیکی در حین آماده سازی واکنش PCR، ممکن است که رنگ فلوروسنت در کانال‌های مذکور توسط دستگاه خوانش شود. در صورت مشاهده‌ی مقادیر Ct کمتر از ۳۵ برای نمونه‌ی NTC پیشنهاد می‌شود تا آزمایشات تکرار شوند.

REF کاتالوگ نامبر | RUO استفاده تحقیقاتی | تعداد تست‌ها | کمپانی تولید کننده | حساس به نور محیط

LOT لات نامبر | تاریخ انقضا

دستورالعمل | محدوده دمای نگهداری

آدرس: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز رشد فناوری
شماره تماس: ۰۲۱۹۱۰۱۰۶۵۱ ۰۲۱۹۱۰۱۰۶۵۱
وبسایت: www.deltabiotechno.com