Instruction for Use

MultiStar-2 SARS-CoV-2 RT-PCR Detection Kit

Cat-No: BONCOV-200 (200 Tests)

Cat-No: BONCOV-100 (100 Tests)

For in vitro Diagnostic (IVD) Use

Doc. #: IFU-COV-01 Doc. Version: 05 Revision Date: 29-11-2021

فهرست مطالب

شماره رفرانس ۳
شرح کیت ۳
محتویات کیت ۳
نگهداری و انتقال کیت..... ۴
مواردی که همراه کیت نمی باشد ۴
هشدارها و محدودیت ها..... ۴
کنترل ها ۶
نمونه گیری و نگهداری ۶
آماده سازی مخلوط واکنش ۷
اضافه کردن الگو ۸
برنامه ریزی دمایی..... ۸
آنالیز نتایج..... ۹
جدول تفسیر نتایج ۱۰
رفع مشکل ۱۰
ارزیابی آنالیتیکال..... ۱۲
ارزیابی کلینیکال..... ۱۳
نشانه ها..... ۱۴
اطلاعات تماس ۱۴

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 رفرانس

- BONCOV-200
- BONCOV-100

شرح کیت

کیت حاضر به روش Real-time PCR و به صورت تک‌مرحله‌ای 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 ویروس به ترتیب با فلوروفورهای Texas Red و FAM و همچنین ژن Rnase P انسانی به عنوان کنترل داخلی با فلوروفور HEX است. نتایج حاصل از آزمایش این کیت تنها در کنار شواهد بالینی، برای تشخیص مستند است.

محتویات کیت

Title	200 Tests	100 Tests
	Volume per Vial	Volume per Vial
5x CAPITAL Buffer	400 µl/tube × 2	400 µl/tube × 1
20x RTase	100 µl//tube × 2	100 µl//tube × 1
MultiMix(N,Rdrp,Rp)	300 µl/tube × 1	300 µl/tube × 1
Positive Control	200 µl/tube × 1	200 µl/tube × 1
Nuclease-Free Water	250 µl/tube × 1	250 µl/tube × 1

نگهداری و انتقال کیت

کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و در تاریک نگهداری گردد همچنین به منظور انتقال و جا به جایی کیت از یونولیت با درب و یخ خشک استفاده نمایید. بیش از دو مرتبه منجمد و آب کردن کیت به هیچ وجه توصیه نمی‌گردد زیرا می‌تواند باعث کاهش در حساسیت تشخیصی کیت گردد. نگهداری کیت در دمای۴ درجه سانتی گراد هیچگاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.

مواردی که همراه کیت نمی باشد

- سواب داکرون به همراه محفظه و محیط VTM/UTM برای نمونه گیری
- کیت استخراج RNA
- سمپلر قابل تنظیم در اندازه هاش مختلف
- نوک سمپلر فیلتردار در سایز های ۱۰ ، ۱۰۰
- ورتکس
- سانتریفوژ رومیزی
- لوله های ۰,۲ میکرولیتر برای استفاده در روتور ۳۶ چاهکی
- بلوک خنک کننده
- وایتکس ۱۰ درصد
- گان و دستکش
- دستگاه Real-Time PCR:دستگاه هایی که دارای کانال های Green، Orange و Yellow می باشند .

هشدارها و محدودیت ها

۱. کلیه نمونه های عفونی بوده بنابراین تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول Good Laboratory Practice (GLP) توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ Personal Protective Equipment (PPE) انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 انجام شود.استفاده از دستورالعمل :

Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Specimen Associated
https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab-biosafety-guidelines.html.

۲. پیشنهاد می شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همین طور بعد از کار لامپ UV زده شود .

۳. پیشنهاد می شود محل استخراج RNA ، آماده سازی مخلوط واکنش از فضای آماده کردن اضافه کردن نمونه و نمونه کنترل مثبت جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید .

۴. پس از آماده سازی مخلوط واکنش ، آن را در تاریکی نگهداری نمایید .

۵. 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 می شود، که به منظور کنترل فرایند استخراج RNA و PCR کاربرد دارد.

۶. واکنش‌دهی متقاطع کیت حاضر به صورت In silico با دیگر پاتوژن‌های شایع عفونی تنفسی از جمله parainfluenza 1-4, adenovirus 3, respiratory syncytial virus A and B, Rhinovirus, Bocavirus, Metapneumovirus, Bat Alphacoronavirus 229E related virus, Enteroviruses Acinetobacter baumannii, Bordetella parapertussis, Bordetella pertussis, Chlamydia pneumoniae, Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae, Legionella pneumophila, Moraxella catarrhalis, Mycoplasma pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens , Staphylococcus aureus, Stenotrophomonas maltophilia, Streptococcus pneumoniae , Mycobacterium abscessus, Mycobacterium avium, Mycobacterium bovis, Mycobacterium chelonae, Mycobacterium avium-intracellulare,Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium kansasii بررسی گردید. بر اساس تجزیه و تحلیل های سیلیکو، ارگانیسم های مورد بررسی با عملکرد SARS-CoV-2 تداخل عمل نداشته ندارند.

کنترل ها

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

نمونه گیری و نگهداری

۱. نمونه های قابل استفاده شامل نمونه های 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 ریه ها (bronchoalveolar lavage)، ترشحات نای (tracheal aspirates)، و خلط (sputum).

۲. نتایج منفی کاذب می‌توانند به دلیل حضور افزایش غلظت مهار کننده های واکنش PCR ،نمونه‌گیری نا مناسب ، استخراج RNA غیر استاندارد، انتقال نامناسب نمونه و یا از غلظت کم نمونه ناشی گردد.

۳. نمونه های سوآب باید فقط توسط سوآب های دارای نوک سنتزی (مانند پلی استر یا داکرون) و دسته آلومینیومی یا پلاستیکی جمع آوری شوند. سوآب های دارای نوک کلسیم آلژینات یا پنبه و دسته چوبی مورد قبول نیستند.

- نمونه های 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.

۴. نمونه ها را می توان در دمای ۴ درجه سانتیگراد، تا ۷۲ ساعت پس از جمع آوری نگهداری نمود.

۵. اگر احتمال تاخیر در استخراج نمونه ها وجود دارد، آنها را در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایین‌تر نگهداری نمایید. نوکلئیک اسیدهای استخراج شده باید در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایینتر نگهداری شوند.

۶ .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 حین جمع آوری، استخراج و تست نمونه های بیمارستانی از بیماران مشکوک به کوروناویروس جدید ۲۰۱۹ (2019-nCoV)

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

- ایمنی زیستی در آزمایشگاه های میکروبیولوژی و زیست-پزشکی چاپ پنجم

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

آماده سازی مخلوط واکنش

در هنگام آماده سازی واکنش ها، از فضاهای جداگانه جهت افزودن مستر واکنش (تمیز) و نمونه های بیمار (آلوده) استفاده نمایید. و هرگز درب ویال کنترل مثبت را در فضای تمیز (محل آماده سازی مستر واکنش) باز نکنید.

حجم نمونه مورد استفاده در این تست ۵ یا ۱۰ میکرولیتر می باشد, طبق جدول زیر مخلوط آزمایش را آماده نمایید.

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

اضافه کردن الگو

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 . سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید.

برنامه ریزی دمایی

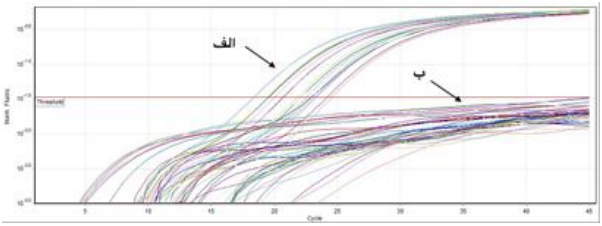
این دستورالعمل برای دستگاه‌های ABI 7500 و MIC و Rotor-Gene توصیف شده است. دیگر دستگاه‌های Real Time PCR دارای کانال‌های Green، Orange، Red و Yellow نیز مناسب برای استفاده از این کیت هستند. پس از تنظیم کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه‌اندازی کنید.در صورت استفاده از دستگاه ABI 7500 گزینه رنگ رفرنس داخلی (passive reference) را حذف 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, Orange, yellow	55°C	40 sec	

آنالیز نتایج

بر اساس دستور العمل‌ها و طبق جدول زیر نتایج را تفسیر نمایید.

- ✓ در دستگاه کوربت، گزینه slope correction را فعال نمایید.در آنالیز منحنی های تکثیر، فقط منحنی های سیگموئیدی قابل قبول هستند (شکل مقابل – گراف‌های الف). گراف‌های خط صاف موید حضور RNA ویروسی نبوده و منفی تلقی می‌شوند (شکل مقابل – گراف‌های ب).



- ✓ 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.
- ✓ کنترل مثبت: درکانال‌های Green، Yellow ، Orange نمونه PTC باید خوانش شده باشد. در غیر این صورت واکنش فاقد اعتبار بوده و نیازمند تکرار است.
- ✓ مقادیر Ct ژن‌های N ، RdRp تا 40 مورد قبول بوده و مثبت تلقی می‌شوند.
- ✓ تست‌های با نتایج Invalid معتبر نبوده و نیاز به نمونه گیری مجدد و تکرار دارند.
- ✓ شناسایی Rnase P برای نمونه های مثبت غیر ضروری است و تیتر بالای ویروس می تواند منجر به کاهش یا عدم حضور سیگنال مرتبط با Rnase P در نمونه های مثبت گردد.
- ✓ به علت حساسیت بالای کیت و شناسایی کوچکترین مواجهه فرد با عامل ویروسی درصورتیکه تا Ct ۴۰ تک ژن N و یا RdRp بالا آمد ، نتیجه مثبت است .

جدول تفسیر نتایج

این کیت قادر به تشخیص همزمان دو ژن RdRp و N ویروس به ترتیب با فلوروفورهای Texas Redو FAM و همچنین ژن Rnase P انسانی به عنوان کنترل داخلی با فلوروفور HEX است.

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

رفع مشکل

در صورت مواجهه با عملکرد و نتایج نادرست به جدول زیر مراجعه نمایید . درغیر 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	استخراج RNA با برخی از کیت ها (بهژن) ممکن است همراه با برخی ناخالصی هایی باشد که با مسترمیکس واکنش مهاری دهد بنابراین میزان RNA را تا 5 µL کاهش دهید.

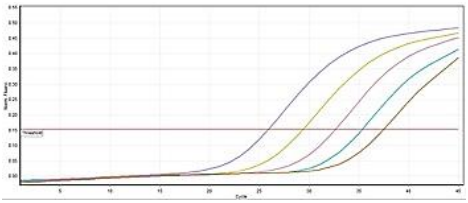
۳	هیچ سیگنالی از هیچ کانالی دریافت نمی شود (حتی در نمونه کنترل مثبت کیت نیز هیچ سیگنالی رویت نشده)	مشکل از مستر میکس می باشد	واکنش را مجدد روی کنترل مثبت کیت تکرار کنید تا از مشکل مسترمیکس اطمینان حاصل کنید.
		مشکل از دستگاه یا نرم افزار آن می باشد	از نحوه run دستگاه و همچنین سلامت دستگاه اطمینان حاصل 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 انها 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	در صورت استفاده از کیت های استخراج همانند بهژن ، اگردر هر نمونه در سه کانال هیچ سیگنالی رویت نشد، نشان دهنده کیفیت نا مناسب RNA می باشد . در این صورت حجم RNA را تا 5 µL کاهش دهید.)
		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.

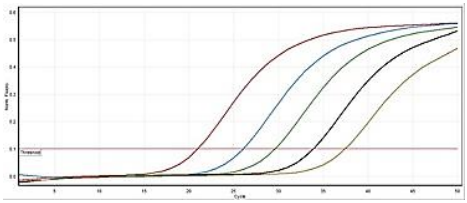
ارزیابی آنالیتیکال

حساسیت آنالیتیکال

با توجه به نتایج گرفته شده، حد پایینی تشخیص این کیت برای ژن Rd برابر با 300 copy/mL ، برای ژن N برابر با 200 copy/ml و برای Rp 100 copy/ml گزارش



گراف تکثیر ژن *N*



گراف تکثیر ژن *RdRp*

اختصاصیت آنالیتیکال

واکنش متقاطع

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

ویروس‌های 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 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

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

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

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

اطلاعات تماس

تهران ، سعادت آباد ، میدان فرهنگ ، بلوار ۲۴ متری سعادت آباد ،خیابان حیدر نیا (دوم شرقی) ، پلاک ۹

تلفن های تماس : ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰ داخلی ۲۱۵

پشتیبان فنی

در صورت بروز مشکل فنی با شماره ۰۹۳۰۱۸۲۱۶۰۱تماس حاصل فرمایید در غیر این صورت با شماره های شرکت تماس حاصل فرمایید .