دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش افتراقی کیفی

Superstar Flu A/B&SC2 Detection kit

با روش

RT-PCR

Doc. #IFU-FLU-01 Doc. Version : 07 Revision Date : 01-08-2023

Version 07

فهرست مطالب

شماره رفرانس	۲
شرح کیت	۳
محتویات کیت	۳
نگهداری و انتقال کیت	٤
مواردی که همراه کیت نمی باشد	٤
هشدارها و محدودیت ها	٤
کنترل ها	٦
نمونه گیری و نگهداری	٦
آماده سازی مخلوط واکنش	۷
اضافه کردن الگو	۸
برنامه ریزی دمایی	۸
آنالیز نتایج	۹
جدول تفسیر نتایج	۱۰
رفع مشکل	۱۱
صحه گذاری کیت	۱۳
LOD	۱۳
حساسیت آنالیتیکال	۱۳
واکنش متقاطع	۱٤
ارزیابی کلینیکی	۱۵
نشانه ها	۱٦
اطلاعات تماس	۱٦
پشتیبان فنی	۱۷

شماره رفرانس

- BONFLUSC100

شرح کیت

کیت حاضر به روش Real-time PCR مالتیپلکس و به صورت تک‌مرحله‌ای به منظور تشخیص همزمان و افتراقی ویروسهای SARS-CoV-۲، آنفولانزای A و/یا آنفولانزای B در افراد مشکوک به آلودگی ویروس تنفسی طراحی شده است. آنفولانزا A با پروب متصل شده به فلوروفور FAM در کانال سبز، آنفلوانزا B با پروب متصل شده به فلوروفور Cy۵ در کانال قرمز و SARS-CoV-۲ 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.

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 آزمایش‌های دیگر و سابقه پزشکی و همچنین نحوه پاسخ‌دهی به درمان صورت گیرد.

اصول روش کار

طراحی پروب و پرایمر به گونه ای صورت گرفته که در یک مرحله و به طور همزمان قابلیت هدف قراردادن دو ژن N و RdRp را دارد که با استفاده از محلول واکنش PCR ،تکثیر این الگو می تواند به صورت کیفی از طریق افزایش سیگنال فلورسانس توسط دستگاه اندازه گیری شود.

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	200 µl/tube × 1
Nuclease-Free Water	800 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
- نوك سمپلر فیلتردار در سایز های ۱۰ ، ۱۰۰
- ورتکس و سانتریفوژ رومیزي
- لوله هاي ۰/۲ میکرولیتر براي استفاده در روتور ۳۶ چاهکي
- بلوك خنك كننده
- وایتکس ۱۰ درصد
- گان و دستکش
- دستگاه Real-Time PCR: دستگاه هایی که دارای کانال های Green،Orange,Red 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-۲ 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 محل استخراج RNA ، آماده سازی مخلوط واکنش و اضافه کردن نمونه و نمونه کنترل مثبت جدا از هم باشند .

۳. نتایج مثبت کاذب می‌تواند به دلیل آلودگی‌های ایجاد شده در حین پروسه آزمایش باشد.

٤. پیشنهاد می شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود .

٥. طراحی این کیت با هدف شناسایی تمامی توالی‌های گزارش شده با اختصاصیت بالا صورت گرفته است. پرایمر و پروب اختصاصی طراحی شده برای ژن ۲M1 / M، همه سروتیپهای شناخته شده آنفولانزای A از جمله H5N ، H3N2 ، H1N1pdm09 ، ۸H1N1 و H7N را شناسایی می کند. پرایمر و پروب اختصاصی برای ژن ۱NS هر دو نوع ویکتوریا و یاماگاتای آنفولانزای B را تشخیص می دهد و پرایمر و پروب مختص ژن N به منظور شناسایی تمامی موارد ۲-SARS-CoV 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.

٦. 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-۲ و آنفولانزای A / B تداخل عمل ندارند.

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

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 . با هدف جلوگیری از آلودگی اسید نوکلئیک پیشنهاد می شود وسایل و میز کار قبل از شروع کار با مایع سفید کننده ۱۰ درصد و الکل ۷۰ درصد پاک شوند .

.2نتایج منفی کاذب می‌توانند به دلیل نمونه‌گیری، استخراج RNA و یا انتقال نمونه نامناسب در محیط نا مناسب بوده و یا از غلظت کم نمونه ناشی گردد.

.3نگهداری نمونه‌ها در شرایط نامناسب و یا حضور مهارکننده‌های واکنش PCR در نمونه می‌تواند منجر به نتایج منفی کاذب گردد.

٤. نمونه های قابل استفاده شامل نمونه های سیستم تنفسی شامل: سوآب از انتهای حلق می باشد .

٥.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.

٦. نمونه ها را می توان در دمای ٤ درجه سانتیگراد، تا ۷۲ ساعت پس از جمع آوری نگهداری نمود.

۷.اگر احتمال تاخیر در استخراج نمونه ها وجود دارد، آنها را در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایینتر نگهداری نمایید.

۸.نوکلئیک اسیدهای استخراج شده باید در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایینتر نگهداری شوند.
۹.نمونه ای که ٤ روز یا بیشتر در دمای ٤-۲ درجه سانتیگراد نگهداری نشده یا در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایینتر فریز نشده است قابل استفاده برای آزمایش نمی باشد .

- گایدلاین های مورد استفاده حین جمع آوری، استخراج و تست نمونه های بیمارستانی از بیماران مشکوک به کروناویروس جدید ۲۰۱۹ (nCoV-۲۰۱۹)

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.

N تعداد واکنش‌ها بوده و شامل تعداد نمونه‌ها و کنترل‌های مثبت و منفی و مقداری میکس واکنش بیشتر با در نظر گرفتن خطای سمپلرهاست. محاسبه N به گونه زیر است.

✓ اگر تعداد نمونه ها شامل نمونه های کنترل (n)برابر۱۵ یا بیشتر باشد: N = n + ۲

✓ اگر تعداد نمونه‌ها شامل نمونه‌های کنترل (n) کمتر از ۱۵ باشد: N = n + ۱

بر اساس مقدار N و برای واکنش‌های با حجم نمونه ۵ میکرولیتری،مقادیر مشخصی از موارد زیر را اندازه گیری کرده و آماده و مخلوط نمایید.

Reagent	Volume
20x RTase	1 µl
5x Reaction Buffer	4 µl
SuperMix	4 µl
Nuclease-Free Water	6 µl
Final Volume	15 µl

اضافه کردن الگو

پس از آماده سازی محلول‌ها و انتقال آن به تیوب‌های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، ۵ میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب مربوطه اضافه نمایید. پس از انتقال به منطقه کار با اسید نوکلئیک، ۵ میکرولیتر از نمونه کنترل مثبت (PTC) و ۵ میکرولیتر از نمونه‌های بیمار را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید. سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید.

برنامه ریزی دمایی

این دستورالعمل برای دستگاه‌های ABI ۷۵۰۰ و MIC و Rotor-Gene توصیف شده است. دیگر دستگاه‌های Real Time PCR دارای کانال‌های Red ، Orange، Greenو Yellow نیز مناسب برای استفاده از این کیت هستند.

پس از تنظیم کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه‌اندازی کنید.

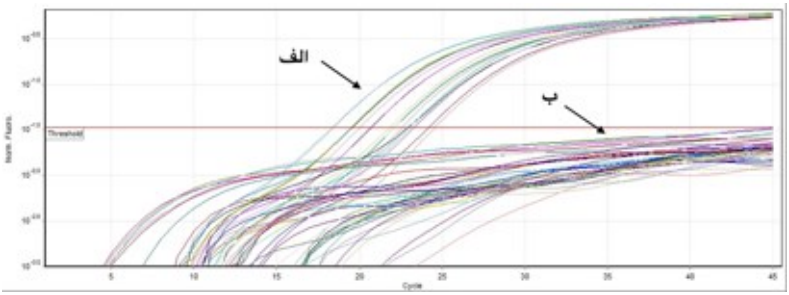
در صورت استفاده از دستگاه ABI ۷۵۰۰ گزینه رنگ رفرنس داخلی (passive reference) را حذف کنید.

	Temperature	Hold	Cycle
cDNA Synthesis	50℃	20 min	1
Pre-Denaturation	95 ℃	10 min	1
Denaturation	95 ℃	10 sec	40
Annealing and Acquisition on Channel Green, Orange, RED and yellow	57℃	45 sec	
EXTENSION	72℃	15 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 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.
- ✓ 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.
- ✓ مقادیر Ct ژن‌های *N*، M و NS۱ کمتر از۳۵ مورد قبول بوده و مثبت تلقی می‌شوند.
- ✓ ممکن است چندین ویروس در یک نمونه تشخیص داده شوند.
- ✓ 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.

جدول تفسیر نتایج

Results Analysis	Tests			
	Rnase P Gene (Yellow Channel)	Inf A Gene (Green Channel)	N Gene (Orange Channel)	Inf B Gene (Red Channel)
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	+	+	+	+

رفع مشکل

	مشکل	دلیل بروز مشکل	اقدام اصلاحی
1	هیچ سیگنالی دریافت نشده ولی کنترل مثبت سیگنال دارد.	استخراج RNA	استخراج RNA با برخی از کیت ها ممکن است همراه با برخی ناخالصی هایی باشد که با مسترمیکس واکنش مهاری دهد بنابراین میزان RNA را تا ۳μL کاهش دهید.
2	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.
3	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.
4	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 ٤ درجه نگهداری کنید.
5	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.
6	گرفتن سیگنالهای خطی (noise)	نرم افزار دستگاه	برای دستگاه Qiaqen (کوربت) گزینه outlier removal را طبق شرایط بهینه نمونه روی ۵٪ یا ۱۰٪ بگذارید.
7	روی برخی نمونه ها سیگنال برای RP دریافت نمی شود	کیفیت RNA استخراج شده	اگر روی نمونه در سه کانال هیچ سیگنالی رویت نشد، نشان دهنده کیفیت نا مناسب 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 ۳μL 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.
8	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.

صحه گذاری کیت

LOD

Samples	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%

با توجه به نتایج گرفته شده، LOD آنفولانزا B برابر با ۲۰۰ copy/mL، LOD آنفولانزاA برابر با ۱۰۰ copy/mL و LOD کرونا برابر با ۲۰۰ copy/mL برآورد گردید.

حساسیت آنالیتیکال

با استفاده از پایگاه های داده NCBI، NCBI Virus و Influenza Database ده هزار توالی اخیر برای ویروس‌های آنفولانزا A و B و تمام توالی‌های 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.

واکنش متقاطع

به منظور بررسی و اثبات اختصاصیت پرایمرها و پروب‌های طراحی شده برای ویروس آنفولانزای A/B و SARS-CoV-۲، 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), Enteroviruses (taxid:12059)

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 scrofulaceum (taxid:1783)

ارزیابی کلینیکی

به منظور تعیین حساسیت و اختصاصیت کلینیکی، ۱۰۰ نمونه مثبت آنفولانزای A ، B و SARS-CoV-۲ و ۱۰۰ نمونه منفی در مقایسه با کیت مرجع ارزیابی شدند. نتایج در جدول شماره ۱ آورده شده است.

بررسی حساسیت و اختصاصیت کیت Flu-SC2

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

نشانه ها

IVD	InVitro Diagnostos Medical Device	تشخیص آزمایشگاهی
REF	Catalog Number	کد کالا
LOT	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 24 متری سعادت آباد ،خیابان حیدر نیا)دوم شرقی (، پلاک 9

تلفن های تماس :02122082120 داخلی 215

پشتیبان فنی

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