شماره SOP: BS-III	
عنوان SOP: مراحل مختلف عملیات برای تست مولکولی COVID-۱۹	**ویرایش:** اول
تهیه کننده: کارگروه بیماری‌های تنفسی	**تاریخ:** اسفند ۱۳۹۸
تعداد صفحات : ۳	**شماره صفحه:** ۱ از ۳

روش عملیاتی استاندارد Standard Operating Procedure (SOP) مراحل مختلف انجام آزمون‌های مولکولی برای نمونه‌های تنفسی مشکوک به کورونا ویروس (COVID-۱۹)

این متدولوژی با کوشش کارگروه ویروس‌های تنفسی و تحت نظارت شبکه بیماری‌های ویروسی ایران و انجمن ویروس شناسی ایران تهیه و تدوین گردیده است. این SOP با استفاده از آخرین دست آوردهای میکروبیولوژی مولکولی که در آزمایشگاه‌های کشورهای پیشرفته در حال انجام می باشد اقتباس گردیده است.

الف- مراحل قبل از انجام آزمون یا (Pre-Amplification): بیشترین موارد مثبت کاذب و یا منفی کاذب در این مرحله رخ می‌دهد. ابتدا باید به لولهٔ محتوی نمونه دقت کافی را مبذول نمود. در بسیاری از موارد نمونه‌های خلط، دارای حجم بالا بوده و در حقیقت عمدتاً حاوی بزاق هستند و نمایندهٔ واقعی ترشحات بخش تحتانی ریه بیمار نمی-باشد. اگر امکان تکرار نمونه میسر نیست، بهتر است نمونه‌ی خلط با حجم برابر سرم فیزیولوژی مخلوط و سپس حدود ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰، سانتریفوژ شود، بعد از دور ریختن مایع‌رویی، از مایع انتهایی لوله که حاوی سلول‌های پوششی و WBC است برای استخراج نمونه مورد نظر استفاده شود.

نکتهٔ مهم: نمونه‌های تنفسی از بیماران دارای علائم بالینی، بعضاً دارای بار (Load) بسیار بالای ویروس $>10^{12}$ (copy/ml) بوده و به محض باز شدن در لوله برای انجام عملیات استخراج، احتمال فراوانی برای خروج آئروسل ها از لوله و نشت آنها بر روی محیط و کف هود و احیاناً بر روی لوله‌های مجاور وجود دارد و احتمال ایجاد آلودگی متقابل (Cross contamination) بسیار بالاست. این مسئله از سال ۲۰۱۲ مورد توجه آزمایشگاه‌های ویروس شناسی معتبر بوده و به همین لحاظ، انجام مراحل Pre-Amplification برای نمونه‌های تنفسی در زیر هود جداگانه‌ای از سایر

نمونه‌ها بسیار ضروری است و استفاده از کنترل منفی‌های متعدد (به ازای هر ۵ یا ۶ لوله حاوی نمونه، ۱ کنترل منفی لازم است) توصیه می‌گردد. نکته مهم دیگر استفاده از ۲ جفت دستکش برای این عملیات می‌باشد که به محض آلودگی واضح و یا مشکوک بودن به آلودگی دستکش، دستکش رویی دور ریخته و از دستکش جدید و تمیز زیری استفاده می‌گردد. عدم رعایت این نکات واضح که در امتداد GLP می باشد، سبب بروز موارد فراوان مثبت کاذب خواهد شد.

ب- مرحلهٔ Amplification: با توجه به ماهیت بسته بودن روش Real time PCR، چندان نگرانی در خصوص آلودگی در حین انجام آزمون متصور نیست. صرفاً توجه عزیزان را به رعایت GLP و نیز استفاده از سمپلرهای نو و یا کالیبره شده جلب می‌نماید. بیشترین خطای آزمایشگاهی در این مرحله، Pipetting Error می‌باشد که دلیل عمدهٔ بروز پاسخ‌های مثبت و یا منفی کاذب و نیز Variation در پاسخ‌های یک مرحله‌ای (Intra-assay) و یا دو مرحله‌ای (در صورت تکرار مجدد تست- inter-assay) می‌گردد.

ج- مرحلهٔ Post amplification: در مرحلهٔ آنالیز پاسخ‌های Real time PCR باید به اصول تجزیه و تحلیل نرم افزار به خوبی مسلط بود. و بویژه در غیاب وجود آزمون کمی (برای ارزیابی و پیگیری (Follow up) بیماری که احیاناً از وی چند نمونه اخذ شده است) بتوان از Ct (Cycle of threshold) بیمار بعنوان روش نیمه- کمی و یا Semi-quantitative استفاده نمود.

از آنجائی که محدودیت در دفعات انجام آزمون در کشور وجود دارد، بسیار منطقی است که به عدد Ct در پاسخ آزمون‌ها اشاره نموده و برای تغییرات بالا بودن آن (مثلاً مثبت ضعیف و یا مشکوک و...) و یا پایین بودن میزان آن (بار بالای ویروس) ارائه طریق و اعلام نظر نمود.

توجه

۱- عدم استفاده از سواب‌های پنبه‌ای در نمونه گیری: اولاً الیاف پنبه باعث مهار مکانیسم PCR می گردند و ثانیاً برخلاف سواب‌های پلاستیکی، قدرت Release و یا آزاد نمودن سلول های حاوی ویروس را به خوبی نداشته و سبب کاهش میزان بار ویروس برای انجام استخراج می‌گردند.

۲- استفاده از ۲ عدد دستکش از ابتدا تا انتهای عمل استخراج

۳- استفاده از محیطی جدا به عنوان Clean Room برای نگهداری مواد مصرفی (Reagent) و مخلوط نمودن آنها برای تهیهٔ Master Mix. در این اتاق به هیچ وجه نباید اثری از RNA/DNA و یا دستگاه PCR باشد.

۴- مخلـوط نمـودن Master Mix بـا RNA/DNA بایـد در زیـر PCR Workstation در اتـاق Amplification صـورت پذیرد.

۵- Work-flow Direction بایـد بـه نحـوی رعایـت گـردد کـه ورود و خـروج و تـردد افـراد در اتـاق‌هـا و بـین اتـاق‌هـا تـابع ضوابط Biosafety هـم بـرای نمونـه و هـم بـرای افـراد دسـت انـدرکار باشـد. بطـور مثـال بـه هیچوجـه وسـایل و یـا مـوادی از اتاق‌های دیگر وارد clean room نباید بشود.

۶- در اتاق استخراج بایـد حـداقل یـک هـود کـلاس- II بـا فیلتـر Hepa وجـود داشـته باشـد و فضـای اتـاق دارای فشـار منفـی و یا در صورت عدم وجود امکانات، تمامی پنجره‌ها بسته و مهر و موم (Seal) شده باشند.

۷- قبل از ورود به هر اتاق بهتر است یک نوار یا خط قرمز فاصلهٔ بین محیط تمیز و کثیف را مشخص نماید. قبل از این خط قرمز، باید از دمپایی مخصوص اتاق و نیز گان اختصاص یافته استفاده گردد و پس از اتمام کار، گان یکبار مصرف دور ریخته شود.

۸- توجه: یکی از مهمترین فاکتورها در منفی کاذب بودن نمونه‌های تنفسی که پتانسیل مثبت بودن (و یا مثبت ضعیف باشند) نوع نمونه و طریقه نگهداری و محل آن است.

تهیه و تدوین:

شبکه تحقیقات بیماری‌های ویروسی ایران **مرکزتحقیقات ویروس شناسی بالینی**

شبکه تحقیقات بیماری‌های ویروسی ایران آدرس: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، ساختمان نفیسی، طبقه سوم، تلفن:۸۸۹۹۲۶۶۰-۰۲۱	مرکزتحقیقات ویروس شناسی بالینی آدرس: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، ساختمان نفیسی، طبقه سوم، تلفن:۸۸۹۹۲۶۶۰-۰۲۱