

طراحی، ساخت و بررسی کیت تشخیصی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (real-time PCR) کووید-۱۹

محمدرضا زارع^۱، زهرا ابراهیمی‌فر^۲، محمد سبحانی لاری^۳، هادی شکرالله‌نیا روشن^۴، مقداد عبدالله‌پور علی‌نیه^{*}

^۱گروه بهداشت محیط، دانشکده علوم پزشکی لارستان، لارستان، ایران، ^۲کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده علوم پزشکی لارستان، لارستان، ایران، ^۳مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پزشکی لارستان، لارستان، ایران، ^۴گروه ویروس‌شناسی مولکولی، آزمایشگاه تشخیص طبی دکتر طیبی، قائمشهر، ایران، ^۵بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۲/۰۹/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: تشخیص دقیق و حساس *RNA* کووید-۱۹ از ارزش تشخیصی بسیار بالایی برخوردار است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (*real-time PCR*) دقیق‌ترین تست تشخیصی (استاندارد طلایی) کووید-۱۹ شناخته می‌شود که *RNA* یا ماده ژنتیکی اختصاصی ویروس را ردیابی می‌کند و می‌تواند ویروس را طی چند روز پس از ابتلا به عفونت تشخیص دهد. لذا هدف از این مطالعه، تعیین و طراحی یک روش حساس بر پایه *Real-time PCR* برای تشخیص کووید-۱۹ می‌باشد.

روش بررسی: این یک مطالعه تجربی - کاربردی می‌باشد. تمامی نمونه‌گیری‌ها و تست‌های آزمایشگاهی در مرکز آموزشی درمانی امام رضا (ع) لارستان، آزمایشگاه مولکولی تشخیص کرونا دانشکده علوم پزشکی لارستان و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشکده علوم پزشکی لارستان در سال ۱۴۰۰ انجام شد. *آغازگرها* و *کاوشگر اختصاصی کووید-۱۹* برای جایگاه ژنی *RdRp* و *N* به وسیله نرم‌افزار *الیگو ۷* طراحی و سپس با استفاده از سایت *NCBI* بلاست شد. پس از سنتز *آغازگرها* و *کاوشگرها*، کیت *real-time PCR* بر روی ۱۰۰ نمونه مثبت امتحان و تست‌های حساسیت (*sensitivity*)، اختصاصیت (*specificity*)، پایداری (*stability*) و اعتبارسنجی (*validation*) انجام شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون حساسیت و اختصاصیت بالینی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: کیت طراحی شده در این مطالعه قادر به شناسایی تمامی نمونه‌های مثبت کووید-۱۹ بود. در تست تعیین حساسیت، میزان حد تشخیص (*Limit of Detection; LOD*) کیت تشخیصی کووید-۱۹ تولید شده در این مطالعه ۴۰ کپی در میلی‌لیتر گزارش شد. با بررسی نمونه‌های منفی و مثبت، اختصاصیت و دقت این کیت ۱۰۰ درصد بوده، فقط قادر به شناسایی ویروس کووید-۱۹ بوده و تکرارپذیری بالا را نشان می‌دهد. کیت به‌خوبی شوک دمایی را تحمل کرده و دارای پایداری بالایی می‌باشد. علاوه‌براین، تفاوت معنی‌داری بین کیت تولید شده در این مطالعه و کیت تجاری خارجی وجود ندارد.

نتیجه‌گیری: با توجه به سطح حساسیت، اختصاصیت و همچنین دقت و پایداری مناسب در مقایسه با کیت‌های مشابه، این کیت می‌تواند برای تشخیص مؤثر ویروس کووید-۱۹ مناسب باشد.

واژه‌های کلیدی: کیت تشخیصی، کووید-۱۹، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

*نویسنده مسئول: مقداد عبدالله‌پور علی‌نیه، تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی

Email: abdollahpour1983@yahoo.com

"نشریه علمی پژوهشی ارمغان دانش وابسته به دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یک نشریه با دسترسی آزاد است و تمامی مقالات منتشر شده در این نشریه به صورت دسترسی آزاد منتشر می‌شوند."

مقدمه

در دسامبر ۲۰۱۹، کرونا ویروس جدیدی در ووهان (استان هوپئی چین) شناسایی شد که سازمان بهداشت جهانی (WHO)^(۱) اسم رسمی بیماری حاصل از آن را کووید-۱۹ (coronavirus disease 2019; COVID-19) در نظر گرفت. کووید-۱۹ به سرعت در بسیاری از نقاط چین و حتی سایر کشورهای دنیا منتشر شد و در نتیجه سبب افزایش چشمگیر تعداد موارد مبتلایان شد. شیوع گسترده ویروس و انتقال سریع آن به کشورهای جهان باعث شد تا WHO در ۳۰ ژانویه اعلام وضعیت همه‌گیری نماید (۱-۴).

ویروس کووید-۱۹ از خانواده کرونا ویرس می‌باشد. کرونا ویروس‌ها، ویروس‌های پوشش‌دار دارای RNA غیرمنقطع مثبت^(۲) متعلق به خانواده Coronaviridae و راسته Nidovirales هستند که به طور گسترده در انسان و دیگر پستانداران منتشر شده‌اند و از زیرخانواده آلفا-کرونا، بتا-کرونا، گاما-کرونا و دلتا-کرونا ویروس تشکیل شده‌اند (۵ و ۶). ویروس کووید-۱۹ به عنوان ویروس بتا-کرونا شناخته شده است (۶). اندازه ژنوم آن ۲۲-۲۹ کیلوباز است و مانند دیگر کرونا ویروس‌ها چندین پروتئین ساختاری و غیرساختاری را کد می‌کند. پروتئین اسپایک S، پروتئین پوششی E، پروتئین غشایی M و پروتئین نوکلئوکپسید N از جمله پروتئین‌های ساختاری این

ویروس می‌باشند (۷ و ۸). در یکی از پژوهش‌هایی که در اوایل شیوع کووید-۱۹ انجام شد، میزان تنوع نوکلئوتیدهای ژنومی بین این ویروس و نوعی از کرونا ویروس وابسته به خفاش (RaTG13)، ۴ درصد نشان داده شد. تغییرات جدید در مکان‌های کاربردی ویروس (از قبیل دامنه اتصال‌دهنده گیرنده spike در کووید-۱۹ و ویروس‌های پانگولین) دیده شده است که به احتمال زیاد به وسیله جهش‌ها ایجاد می‌شوند. آنالیز ژنتیکی نشان داد که این ویروس‌ها به دو نوع اصلی (L و S) تبدیل شده‌اند، نوع L (۷۰ درصد) شایع‌تر از نوع S (۳۰ درصد) می‌باشد (۹ و ۱۰).

بیماری کووید-۱۹ باعث سندرم تنفسی حاد، پاسخ شدید التهابی، آسیب عروقی، میکروآنژیوپاتی، آنژیوژنز و ترومبوز گسترده می‌شود. بیماران مبتلا به کووید-۱۹ هم‌چنین می‌توانند به ذات‌الریه، علایم شدید سندرم زجر تنفسی حاد (ARDS)^(۳) و نارسایی چند عضوی مبتلا شوند. چهار مرحله کووید-۱۹ شامل؛ عفونت دستگاه تنفسی فوقانی (مرحله اول)، تنگی نفس و ذات‌الریه (مرحله دوم)، طوفان سیتوکینی و در نتیجه حالت پیش التهابی (مرحله سوم) و مرگ یا بهبودی (مرحله چهارم) می‌باشد (۱۱ و ۱۲).^۱

شیوع کووید-۱۹ تقریباً در ۲۰۰ کشور و منطقه گزارش شده است و زندگی افراد زیادی را تحت تأثیر

1-World Health Organization (WHO)
2-Enveloped Non-Segmented Positive-Sense RNA
3- acute respiratory distress syndrome (ARDS)

قرار داده است. در واقع، اثرات سوء این بیماری مستقیماً در بیماران، بستگان، کارکنان مراقبت‌های بهداشتی و سایر افرادی که در معرض بیماری هستند مشهود می‌باشد (۱۴ و ۱۳). بر اساس گزارش سایت <https://www.worldometers.info/coronavirus> تا ۲۶ مارچ ۲۰۲۴ (زمان نگارش مقاله حاضر)، حدود ۷۰۴۴۷۲۹۸۱ نفر در سراسر جهان به بیماری کووید-۱۹ مبتلا شده‌اند که از این بین ۷۰۰۸۰۰۶ نفر جان خود را از دست دادند. علاوه بر این، در کشور عزیزمان ایران ۷۶۲۷۱۸۶ نفر مبتلا و از این تعداد ۱۴۶۸۱۱ نفر جان باختند (۱۵).

در حال حاضر، هیچ درمانی نمی‌تواند به طور اختصاصی علیه بیماری کووید-۱۹ عمل کند و اکثر راهکارهای درمانی برای مقابله با این ویروس درمان‌های حمایتی می‌باشند. بر اساس ویژگی‌های پاتولوژیک و مراحل مختلف بالینی کووید-۱۹، کلاس‌های دارویی مورد استفاده شامل عوامل ضدویروسی، مهارکننده‌های التهاب/داروهای ضدروماتیسمی، هپارین‌های با وزن مولکولی کم، پلاسما و ایمونوگلوبولین‌های هیپرایمون می‌باشد (۱۷ و ۱۶، ۱۱). مدیریت، تشخیص، پیشگیری و درمان بیماری کووید-۱۹ نقش به سزایی در کنترل و از بین بردن این بیماری دارند. بنابراین، پیشگیری با هدف کاهش انتقال در جامعه بهترین روش درمانی در نظر گرفته می‌شود.

روش‌های تشخیصی که برای کووید-۱۹ وجود دارند شامل تظاهرات بالینی، معاینه جسمی، تصویربرداری، تشخیص افتراقی و تکنیک‌های تشخیصی آزمایشگاهی می‌باشند. در حال حاضر، تست‌های آزمایشگاهی مبتنی بر واکنش‌های آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی، آزمایش‌های مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمریز در زمان واقعی (real-time PCR) (۱) پرکاربردترین و معتبرترین تکنیک‌ها در سراسر جهان هستند (۱۸-۲۱).^۲

تست *real-time PCR* به عنوان استاندارد طلایی برای تشخیص زودهنگام ویروس در نظر گرفته می‌شود. این تست دقیق‌ترین تست در تشخیص کووید-۱۹ است به طوری که ویروس حتی در افرادی که هیچ علامتی ندارند، هم قابل ردیابی می‌باشد. با این حال، کیت‌های تشخیصی موجود در بازار درصد متفاوتی از حساسیت در شناسایی بیماران مبتلا به کووید-۱۹ را نشان می‌دهند و در نتیجه می‌توانند باعث عدم تشخیص درست در برخی از بیماران مبتلا به کووید-۱۹ شوند. بنابراین هدف از این مطالعه، تعیین و طراحی، ساخت و بررسی کیت تشخیصی *real-time PCR* کووید-۱۹ با حساسیت بالا جهت استفاده در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ بود.

1-Real-Time Polymerase Chain Reaction

روش بررسی

این یک مطالعه تجربی - کاربردی می‌باشد. تمامی نمونه‌گیری‌ها و تست‌های آزمایشگاهی در مرکز آموزشی درمانی امام رضا(ع) لارستان، آزمایشگاه مولکولی تشخیص کرونا دانشکده علوم پزشکی لارستان و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشکده علوم پزشکی لارستان در سال ۱۴۰۰ انجام شد.

در این مطالعه، تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی مثبت از افراد علامت‌دار (بستری یا سرپایی) در بیمارستان امام رضا لارستان (ارجاعی به آزمایشگاه مولکولی تشخیص کرونا دانشکده علوم پزشکی لارستان) از تاریخ ۱۴۰۰/۸/۱ تا ۱۴۰۰/۱۰/۱ جمع‌آوری شد.

برای استخراج RNA و تشخیص مولکولی *real-time PCR* به ترتیب از کیت RNJia Virus Kit و کیت تشخیص مولکولی کووید-۱۹ برند سنشور (sansure) استفاده شد. برای این منظور، بعد از نمونه‌گیری نمونه‌ها به وسیله محیط انتقال ویروس (VTM)^(۱) در شرایط استاندارد و زنجیره دمایی سرد به آزمایشگاه انتقال داده شدند و استخراج RNA با استفاده از کیت RNJia Virus Kit طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. پس از استخراج RNA ویروسی، نمونه‌های مثبت با استفاده از کیت تشخیص مولکولی کووید-۱۹ sansure تأیید شدند. RNA نمونه‌های مثبت تا زمان استفاده در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جهت طراحی آغازگر- کاوشگر (primer-probe)،

ابتدا توالی کامل و استاندارد ژنوم ویروس کووید-۱۹ از پایگاه داده‌ی معتبر (NCBI)^(۲) قسمت RefSeq که دارای سکانس تأیید شده می‌باشد، دریافت شد. سپس توالی مربوط به ژن‌های فسفو پروتئین نوکلئوکپسید (N) و RNA پلیمراز وابسته به RNA (RdRp) از این قسمت به فرمت fasta کپی و وارد نرم افزار الیگو ۷ (Oligo 7) شد. حدود ۱۵ تا ۲۰ آغازگر به وسیله نرم‌افزار الیگو ۷ ارایه شد که ۳ آغازگر بر اساس رتبه‌بندی برای طراحی آغازگر و کاوشگر مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت آغازگر و کاوشگر به وسیله پایگاه داده‌ی NCBI بلاست (blast) شده تا با میکروارگانیزم‌های دیگر تداخل نداشته باشد. جهت ساخت کاوشگر از روش Taq man استفاده شد. کاوشگر (با طول ۲۱ تا ۳۱ نوکلئوتید) حدود چندباز بعد از انتهای 3' یکی از آغازگرها طراحی شد.^۳

جفت آغازگرهای طراحی‌شده به همراه رنگ‌های مورد نظر برای ژن‌های RdRp، N و کنترل داخلی (RdRp [FAM], N [HEX], RNase P [ROX]) به وسیله شرکت آریاژن گستر سنتز شدند. جدول ۱ توالی آغازگرها و کاوشگرهای مربوط به کووید-۱۹ طراحی شده در این مطالعه را نشان می‌دهد.

1-Viral Transport Media (VTM)
2-National Center for Biotechnology Information (NCBI)

پایداری (stability) و اعتبارسنجی (validation) بر اساس جدول پیشنهاد شده WHO و استاندارد CLSI برای تشخیص کووید-۱۹ انجام شد.^۴

برای ارزیابی حساسیت از تست *real-time PCR* استفاده شد و جهت محاسبه LOD، توالی مورد نظر حاصل از تکثیر پرایمرهای آغازگرهای رفت و برگشت ژنهای *N* و *RdRp* سنتز و در یک وکتور کلون گردیدند (شرکت آراین ژن گستر). سپس براساس دستورالعمل شرکت سازنده به ویال حاوی وکتور مورد نظر (کنترل مثبت) آب اضافه شد و با استفاده از فرمول زیر تعداد RNA (copy/mL) محاسبه گردید. سپس رقت‌های سریالی ده برابری از RNA کووید-۱۹ با غلظت‌های مختلف انجام شد و در نهایت LOD (رقتی که در آن ۹۵ درصد نمونه‌ها مثبت شدند) مشخص شد.

$$\text{RNA copies/mL} = [\text{RNA concentration (g/mL)} \div (\text{nt transcript length} \times 340)] \times 6.022 \times 10^{23}$$

بررسی اختصاصیت با استفاده از پایگاه بلاست، پانل‌های ویروسی مختلف و نمونه ژنوم افراد سالم انجام شد.

برای این منظور، تست *real-time PCR* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *N* و *RdRp* بر روی RNAهای استخراج شده از سایر میکروارگانیسم‌ها، از جمله گونه‌های *انفلونزا (A, H1N1, H3N2 و B)*، *پارائفلونزا* و ویروس سین‌سیشیال تنفسی انجام شد.

پس از طراحی آغازگر-کاوشگر، تست *real-time PCR* برای تشخیص کووید-۱۹ بهینه شد. طبق دستورالعمل شرکت سازنده، به آغازگر-کاوشگر (شرکت آراین ژن گستر) آب اضافه و رقیق‌سازی انجام شد. در مرحله بعد، *real-time PCR* با معرف‌های زیر انجام شد: RNA (۰/۵ نانوگرم)، آغازگر (۰/۴ میکروگرم)، کاوشگر (۰/۲ میکروگرم)، مستر میکس (۱۲/۵ میکرولیتر) و آب مقطر (۲ میکرولیتر) با حجم نهایی ۰/۲۵ میکرولیتر به طور دقیق، ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس (شرکت PCR BIO SYSTEM)، یک میکرولیتر آغازگر رفت و برگشت، نیم میکرولیتر کاوشگر، یک میکرولیتر آنزیم ریورس ترانس کریپتاز (*RT*)^(۱) مخلوط شدند و در نهایت ۱۰ میکرولیتر RNA به مخلوط اضافه شد تا به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسیدند. برنامه دمایی دستگاه *real-time PCR* شامل سنتز cDNA ۲۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد، دناتوراسیون و غیرفعال کردن آنزیم RT ۳ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ سیکل تکرار شونده شروع گرم (hot-start) ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله دناتوراسیون^(۲) ۱۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر (*annealing*) ۴۰ ثانیه در ۵۸ درجه سانتی‌گراد و مرحله تقویت (*extension*) ۱۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. بعد از طراحی، سنتز و بهینه‌سازی آغازگر-کاوشگر، تست‌های حساسیت (sensitivity) یا LOD (حد تشخیص؛ Limit of Detection)، اختصاصیت (specificity)،

1-Reverse Transcriptase (RT)
2-Denaturation

جهت انجام تست پایداری حین مصرف، کیت ۴ بار منجمد و ذوب (freeze and thaw) شد و تست *real-time PCR* روی یک نمونه با *CT* استاندارد انجام شد. نتایج حاصل با نتیجه نمونه در حالت استاندارد مقایسه شد.

جهت انجام تست پایداری، به منظور تسریع فرآیند تخریب محصول از روش ایجاد شوک دمایی (۳۷ درجه سانتی گراد) استفاده گردید. سپس نتایج به وسیله فرمول Q_{10} در حالی که ضریب تخریب ۲ در نظر گرفته شده بود، آنالیز شد و میزان پایداری محصول تخمین زده شد. جهت ارزیابی حاضر از یک نمونه سنتتیک نزدیک به به ناحیه LOD محصول استفاده شد (۲۰ کپی بر میلی لیتر)، ارزیابی ها در ۷ فاصله زمانی ۰، ۴، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸ و ۳۵ روز انجام شد.

با توجه به ماهیت کیفی محصول، بر اساس دستورالعمل CLSI دقت محصول در ۱۰ روز کاری و به صورت ۲ بار تکرار برای یک غلظت نمونه نزدیک به ناحیه LOD محصول انجام شد.

بعد از طراحی، سنتز و بهینه سازی آغازگر کاوشگر، تست اعتبارسنجی شامل بررسی و مقایسه

نتایج حاصل از آزمایشات کیت تولید شده با کیت های تجاری انجام شد. داده های جمع آوری شده با استفاده از آزمون حساسیت و اختصاصیت بالینی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها

شکل ۱ مراحل انجام شده در این مطالعه جهت تولید کیت تشخیصی کووید-۱۹ را نشان می دهد. در این مطالعه ۱۰۰ نمونه کووید مثبت (تأیید شده به وسیله *real-time PCR* با کیت تشخیص مولکولی کووید-۱۹ (sansure) مورد ارزیابی قرار گرفتند. جایگاه ژنی ژن های *N* و *RdRp* با استفاده از مقالات WHO و CDC روی ژنوم ویروس مشخص شدند. آغازگر/کاوشگر مورد نظر (ژن های *N* و *RdRp*) با استفاده از نرم افزار الیگو ۷ و روش *TaqMan* طراحی، بلاست و سنتز شدند.

آغازگر کاوشگر طراحی شده در این مطالعه قادر به شناسایی تمامی نمونه های مثبت کووید-۱۹ بود. در مقابل، برای نمونه های کنترل منفی قادر به تکثیر ژنوم ویروس نبوده است. حداکثر آستانه سیکل مثبت شدن نمودار ۴۰ بوده است و از ۴۰ به بالا منفی در نظر گرفته شد.

جدول ۱: توالی آغازگرها و کاوشگرهای مربوط به کیت کووید-۱۹

کنترل داخلی (IC)	ژن <i>RdRp</i>	ژن <i>N</i>	
5' AGATTGGACCTGCGAGCG 3'	5' GTGCATCGTGTGTCTG 3'	5' CCAGAACAACCCCAAGGA 3'	آغازگر رفت
5' GAGCGGCTGTCTCCACAAGT 3'	5' CCACAGGGTCATTAGCA 3'	5' TCCGAAGAACGCTGAAG 3'	آغازگر برگشت
5' TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG 3'	5' ACTGCCGTTGCCACATAGATCATCCA 3'	5' ACCAGGAATAATCAGACAAGGAAGT 3'	کاوشگر

تا روز ۲۱ وجود ندارد. با استفاده از فرمول Q10 و بر اساس زمان پایداری کیت تحت شوک دمایی، میزان پایداری کیت ۱ سال تخمین زده شد.

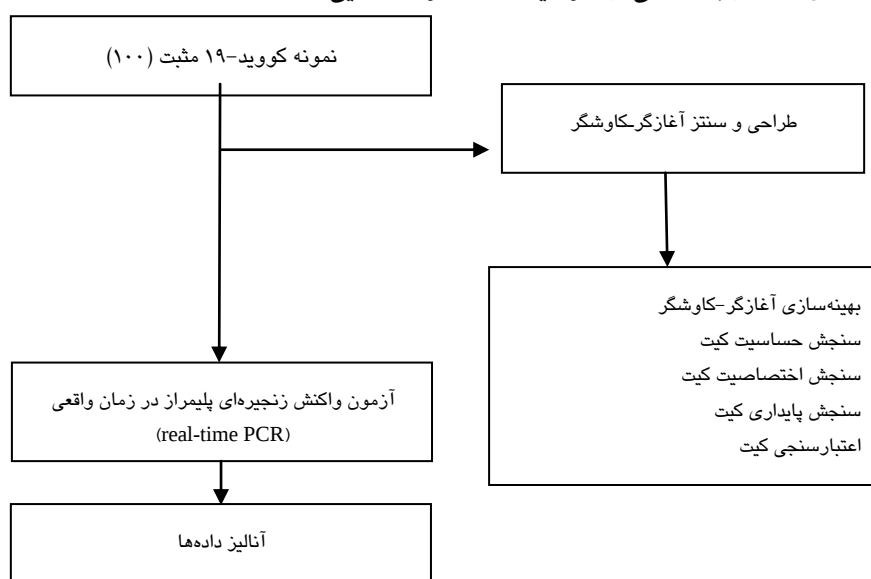
نتایج هر ۲۰ واکنش انجام شده در ۱۰ روز کاری مثبت گزارش گردید که نشان دهنده دقت مناسب محصول طراحی شده بود. علاوه بر این، کیت طراحی شده در این مطالعه قادر به تشخیص ۱۰۰ درصد نمونه‌های مثبت بود، در حالی که کیت تجاری (نام کیت ذکر نمی‌شود) ۹۲ درصد نمونه‌های مثبت را به درستی تشخیص داد.

تست *real-time PCR* بر روی ۱۰۰ نمونه به وسیله کیت تولید شده در این مطالعه و کیت‌های تجاری موجود در بازار انجام شد (جدول ۲)، نتایج حاضر نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین کیت تولید شده در این مطالعه و کیت تجاری خارجی وجود ندارد، اما کیت تولید شده در این مطالعه حساسیت بالاتری را نسبت به کیت تجاری موجود در بازار (نام کیت ذکر نمی‌شود) نشان داد.

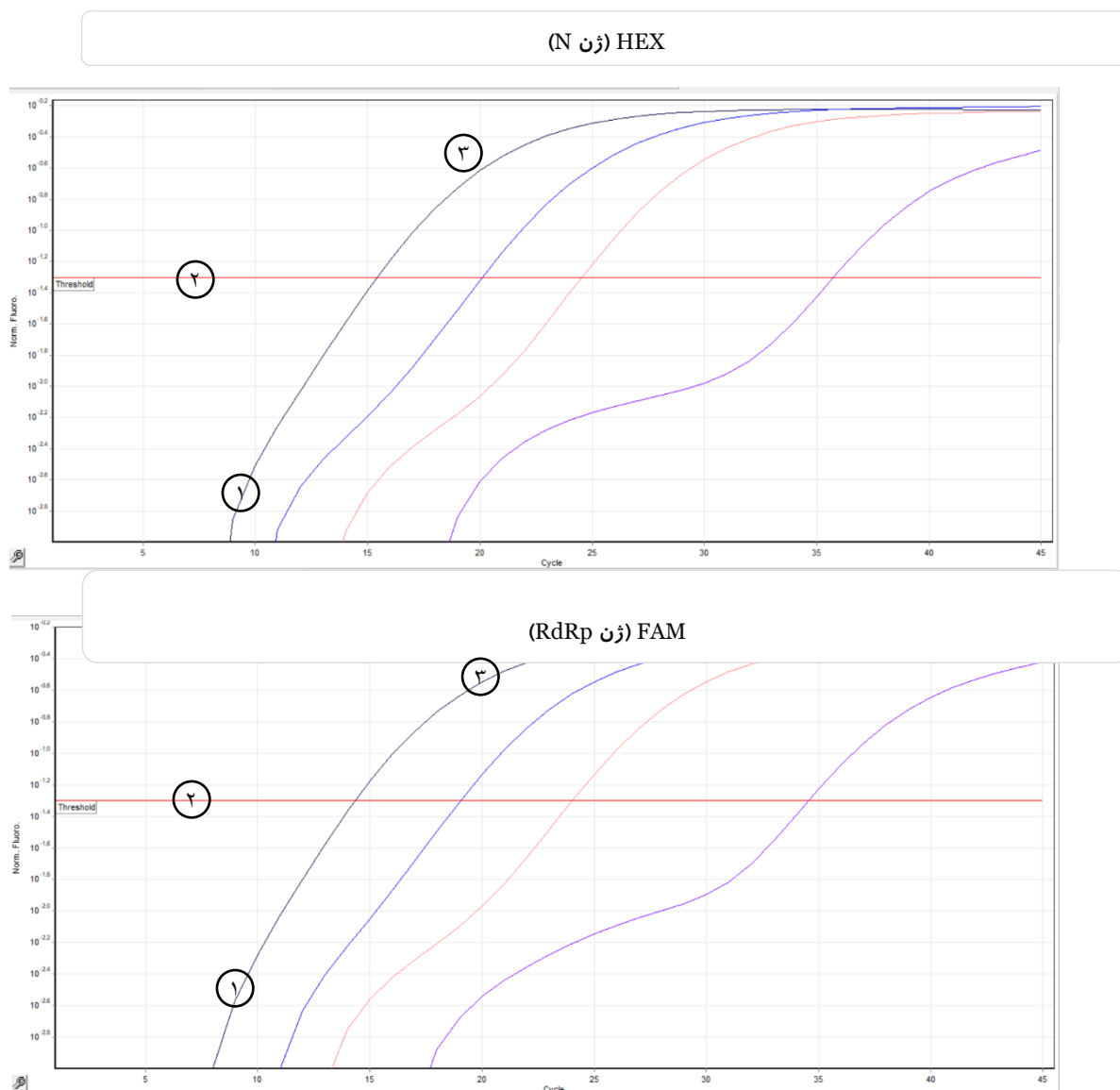
بعد از طراحی و بهینه‌سازی کیت، تست‌های حساسیت و اختصاصیت برای کیت تشخیصی کووید-۱۹ انجام شد. در تست تعیین حساسیت، میزان LOD کیت تشخیصی کووید-۱۹ تولید شده در این مطالعه ۴۰ کپی بر میلی‌لیتر گزارش شد. در واقع، این کیت چهل کپی را در ۹۵ درصد موارد شناسایی می‌کند (شکل ۲).

اختصاصیت آغازگر کاوشگر بر اساس پیشنهاد WHO بر روی ۲۳ میکروارگانسیم در فاز *in silico* چک شد. آغازگر کاوشگر طراحی شده در این مطالعه قادر به شناسایی هیچ کدام از این ارگانسیم‌ها نبوده است. علاوه بر این، نتیجه مثبت تنها با *RNA*های کووید-۱۹ مشاهده شد و نتیجه تست *real-time PCR* بر روی *RNA*های استخراج شده از گونه‌های آنفلونزا (*A*، *H1N1*، *H3N2* و *B*)، پارانفلونزا و ویروس سینسیشیال تنفسی منفی بوده است.

نتایج به دست آمده نشان داد تفاوت معنی‌داری بین نتایج حاصل از کیت نگهداری شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و کیت تحت شوک دمایی



شکل ۱: نمودار مراحل مورد استفاده در این مطالعه جهت تولید کیت تشخیصی کووید-۱۹



شکل ۲: نمودار تکثیر real-time PCR برای ژن های N و RdRp
 ۱) سیگنال پس زمینه (Background Noise) ۲) آستانه (Threshold) ۳) فاز نمایی PCR (Exponential PCR Phase)

جدول ۲: اعتبارسنجی و مقایسه کیت real-time PCR طراحی شده در این مطالعه و کیت تجاری

نمونه های مثبت	نوع نمونه	ژن هدف	درصد نمونه های مثبت
کیت طراحی شده	سوآپ حلق و بینی	ژن های N و RdRp	۱۰۰
کیت تجاری			۹۲

بحث

به نظر می رسد تشخیص دقیق با حساسیت بالا می تواند به درمان سریع تر بیماران مبتلا به این بیماری کمک شایانی کند. بنابراین هدف از این مطالعه،

با توجه به میزان بالای شیوع بیماری کووید-۱۹ در ایران و افزایش روزافزون مرگ و میر،

تعیین و طراحی، ساخت و بررسی کیت تشخیصی *real-time PCR* کووید-۱۹ با حساسیت بالا جهت استفاده در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ بود.

در مطالعه حاضر، کیت تشخیصی *real-time PCR* جهت تشخیص ویروس کووید-۱۹ در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ طراحی شد. نتایج این مطالعه حاکی از آن است که کیت تشخیصی کووید-۱۹ با اختصاصیت و دقت بالایی قادر به شناسایی ژنوم ویروس در نمونه‌های بیولوژی می‌باشد.

شیوع غیرمنتظره کووید-۱۹ در دنیا اهمیت تشخیص آزمایشگاهی عفونت‌های ویروس کرونا در انسان را دوچندان کرده است. در واقع، تشخیص سریع و مناسب با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی نه تنها منجر به محدود کردن شیوع این بیماری می‌شود، بلکه سبب درمان مناسب بیماران مبتلا به عفونت جدی خواهد شد. تست‌های آنتی‌ژن بر آنتی‌بادی و *real-time PCR* دو تکنیک آزمایشگاهی هستند که به وفور در آزمایشگاه‌های تشخیصی برای شناسایی بیماران مبتلا به کووید-۱۹ به کار می‌روند. تست‌های آنتی‌ژن بر آنتی‌بادی از آزمون الیزا جهت شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس کووید-۱۹ استفاده می‌کنند. همچنین از تست سریع (*rapid test*) جهت ردیابی قطعات پروتئینی اختصاصی ویروس کرونا در کوتاه‌ترین زمان ممکن (در برخی موارد در عرض ۱۵ تا ۳۰ دقیقه) استفاده می‌شود. با این وجود، این تست‌ها به دقت آزمایش‌های تشخیص مولکولی (*real-time PCR*) نیستند و این احتمال وجود دارد که

نتیجه آزمایش برخی از مبتلایان ویروس کووید-۱۹ منفی باشد (منفی کاذب). همچنین این احتمال وجود دارد که نتیجه آزمایش شخصی که به ویروسی غیر از کووید-۱۹ مبتلا می‌باشد، مانند ویروس بیماری سرماخوردگی نیز مثبت باشد (مثبت کاذب) (۲۲). از این رو، تشخیص دقیق RNA کووید-۱۹ از ارزش تشخیصی بسیار بالایی برخوردار است.

Real-time PCR که به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص کووید-۱۹ مطرح است دقیق‌ترین تست در تشخیص کووید-۱۹ و یکی از سریع‌ترین روش‌های تشخیص آزمایشگاهی است که به سرعت بیماری را تشخیص می‌دهد. تست *real-time PCR* در واقع RNA یا ماده ژنتیکی اختصاصی ویروس را ردیابی می‌کند و می‌تواند ویروس را طی چند روز پس از ابتلا به عفونت تشخیص دهد. این تست حتی در افرادی که هیچ علامتی ندارند هم قابل ردیابی می‌باشد. برای انجام این کار لازم است نمونه‌ها در یک آزمایشگاه نسبتاً مجهز مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند (۲۳ و ۲۴). علاوه بر این، با توجه به این نکته که ویروس کووید-۱۹ به سرعت و به راحتی در میان افراد انتقال می‌یابد، انجام تست مولکولی *real-time PCR* و تشخیص به موقع آلودگی فرد نقش قابل توجهی در جلوگیری از انتشار ویروس در میان افراد جامعه دارد. علاوه بر این، بر اساس نتایج این روش می‌توان اطلاعات دقیقی از تعداد ویروس کووید-۱۹ موجود در نمونه‌های گرفته شده از بیمار به دست آورد. به این دلیل، نتایج حاصل از *real-time PCR* در تشخیص

عفونت فعال کووید-۱۹ و ارزیابی شدت بیماری کرونا قابل اعتماد می‌باشند.

در ابتدای همه‌گیری کرونا، کیت‌های تشخیصی کووید-۱۹ از خارج از کشور وارد ایران شده و مورد استفاده قرار می‌گرفتند. پس از مدتی و در سال ۱۳۹۹، کیت‌های تشخیص مولکولی کرونا و ویروس ۲۰۱۹ به وسیله شرکت‌های مختلفی ساخته شد. کیت‌های موجود در بازار دارای حساسیت و اختصاصیت مختص به خود هستند، برای انتخاب تست تشخیصی بهینه باید چندین پارامتر در نظر گرفته شود. یک تست تشخیصی باید دارای حساسیت و اختصاصیت مناسب باشد. با این حال، این پارامترها تنها ویژگی‌هایی نیستند که باید در نظر گرفته شوند، در واقع، در مورد همه‌گیری کووید-۱۹، یک آزمایش مؤثر باید سریع، قابل تکرار، بر اساس فناوری‌های موجود در مراکز متعدد باشد و هزینه‌ها را محدود نگه دارد تا بر روی بخش بزرگی از جمعیت انجام شود.

در این مطالعه، از روش *TaqMan real-time PCR* جهت ساخت کاوشگر استفاده شد که برای این کار یک *reporter* در انتهای ۵' و یک *quencher* در انتهای 3' قرار داده شد. این روش دارای حساسیت و اختصاصیت بالا، کاربرد آسان، آنالیز سریع و تشخیص عیار ویروس در مدت زمان محدود می‌باشد که به راحتی می‌تواند در مراکز تشخیصی استفاده شود (۲۶ و ۲۵). برای این منظور، جایگاه ژنی ژن‌های *N* و *RdRp* با استفاده از مقالات WHO و CDC روی ژنوم ویروس پیدا شدند. آغازگر کاوشگر مورد

نظر (ژن‌های *N* و *RdRp*) با استفاده از نرم‌افزار *Aliigo ۷* طراحی و سپس با استفاده از سایت *NCBI* بلاست شد. نرم‌افزار استفاده‌شده در این مطالعه *Aliigo ۷* می‌باشد که یک نرم افزار قدرتمند برای طراحی آغازگر و کاوشگر است (۲۸ و ۲۷). کاوشگر طراحی‌شده دارای طول ۲۱ تا ۳۱ نوکلئوتید می‌باشد و حدود چند باز بعد از انتهای 3' یکی از آغازگرها طراحی شده است. اساس این روش فعالیت اگزونکلازی 5' آنزیم *Taq DNA Polymerase* می‌باشد. آنزیم پس از نزدیک شدن به کاوشگر با استفاده از خاصیت اگزونکلازی آن را تجزیه می‌کند. وقتی کاوشگر تجزیه شد، ماده *reporter* از تأثیر *quencher* خارج شده و از خود فلورسانس ساطع می‌کند. در هر سیکل با آزاد شدن بیشتر *reporter* ماده فلورسانس بیشتری ساطع گردیده و به وسیله دستگاه ثبت می‌شود (۲۹).

بعد از طراحی آغازگر-کاوشگر، اختصاصیت، حساسیت، پایداری، اعتبارسنجی و همچنین تست‌های QC بر روی نمونه‌های مثبت و منفی انجام شد.

بیماری کووید-۱۹ بایستی از دیگر بیماری‌های ویروسی عامل ذات‌الریه مانند ویروس‌های آنفلوآنزا، پارآنفلوآنزا، آدنوویروس و سینسیتیال تنفسی متمایز شود. علاوه بر این، کووید-۱۹ بایستی از بیماری‌های غیرعفونی، مانند واسکولیت، درماتومیوزیت و پنومونی سازماندهی شده نیز متمایز گردد. مهم‌تر این که نیاز به تمایز موارد کووید-۱۹ از آنفلوآنزای فصلی که می‌تواند خدمات اورژانس بیمارستانی را مسدود کند و روندهای تشخیصی و درمانی را برای بیماران

میزان موارد منفی کاذب را در این روش افزایش دهد. بنابراین استفاده از کیت‌های باکیفیت که توانایی استخراج مقادیر کم ژنوم ویروس را داشته باشند امری ضروری و حیاتی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

شیوع غیرمنتظره کووید-۱۹ در سطح جهان اهمیت تشخیص آزمایشگاهی عفونت‌های ویروس کرونا در انسان را دو چندان کرده است. در واقع، تشخیص دقیق RNA کووید-۱۹ از ارزش تشخیصی بسیار بالایی برخوردار است و منجر به محدود کردن شیوع و همچنین درمان مناسب بیماران مبتلا به کووید-۱۹ خواهد شد. *Real-time PCR* که به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص کووید-۱۹ مطرح است دقیق‌ترین تست در تشخیص کووید-۱۹ است که حتی قادر به ردیابی ویروس در افراد بدون علامت می‌باشد. کیت تشخیصی *real-time PCR* کووید-۱۹ طراحی شده در این مطالعه دارای حساسیت، اختصاصیت، دقت و پایداری مناسب بوده و می‌تواند برای تشخیص موثر ویروس کووید-۱۹ مناسب باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشکده علوم پزشکی لارستان جهت فراهم نمودن شرایط انجام طرح تشکر و قدرانی نمایم.

مبتلا به کووید-۱۹ به تاخیر بیاندازد، یک نگرانی بزرگ می‌باشد (۳۰). نتایج حاصل از پژوهش‌ها حساسیت و اختصاصیت نشان داد که کیت تولید شده در این مطالعه به طور اختصاصی قادر به شناسایی ویروس کووید-۱۹ می‌باشد و بروی گونه‌های بیماری‌زای دیگر تأثیری ندارد، این نتایج حاکی از حساسیت و اختصاصیت بالای این کیت می‌باشد. کیت تولید شده شوک‌های دمایی را به خوبی تحمل کرده که نشان دهنده پایداری بالای کیت می‌باشد. مقایسه نتایج حاصل از این کیت با کیت‌های موجود در بازار نشان‌دهنده اعتبار بالای این کیت و قدرت رقابت آن با کیت‌های خارجی می‌باشد.

به نظر می‌رسد طراحی یک کیت با حساسیت و اختصاصیت بسیار زیاد که بتواند تمامی بیماران مثبت مبتلا به ویروس کووید-۱۹ را در طول زمان شناسایی نماید، با چالش‌هایی همراه است. به علت ماهیت ویروس و جهش‌های فراوان که در ژنوم ویروس اتفاق می‌افتد بروز ژنوتایپ‌های جدید می‌تواند یک چالش بالقوه و جدی در راستای تشخیص بیماران مبتلا به این ویروس باشد. بنابراین پژوهش‌های اپیدمیولوژیک دوره‌ای جهت بررسی ژنوم کامل این ویروس و شناسایی ژنوتایپ‌های جدید جهش‌یافته به منظور طراحی کیت‌های بروزرسانی‌شده که توانایی تشخیص این جهش‌ها را داشته باشند، لازم می‌باشد. علاوه بر این، با توجه به این که شنایابی دقیق هدف ژنی نیاز به استخراج نمونه مناسب از بیماران دارد، استفاده از روش‌های نامناسب استخراج می‌تواند

تعارض منافع

نویسندگان اظهار می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

real-time PCR، تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج و در

آخر تمامی نویسندگان نسخه نهایی مقاله را مطالعه و تأیید کردند.

حمایت مالی

این مطالعه با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی لارستان انجام پذیرفت.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی با کد اخلاق IR.LARUMS.REC.1400.012 از دانشکده علوم پزشکی لارستان می‌باشد.

مشارکت نویسندگان

مقداد عبدالله پور علی‌تپه: طراحی علمی مطالعه، طراحی آغازگر/کاوشگر، آزمایشات مولکولی، استخراج RNA و تست real-time PCR، تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج، هادی شکرالله‌نیا روشن: طراحی علمی مطالعه، طراحی آغازگر/کاوشگر، مشاوره در تست‌های مولکولی، تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج، محمدرضا زارع: آزمایشات مولکولی، استخراج RNA و تست real-time PCR، تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج، زهرا ابراهیمی‌فر: تهیه پیش‌نویس و اصلاح نوشتار اولیه، تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج، محمد سبحانی لاری: آزمایشات مولکولی، استخراج RNA و تست

REFERENCES

1. Farnoosh G, Alishiri G, Hosseini Zijoud SR, Dorostkar R, Jalali Farahani A. Understanding the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease (COVID-19) based on available evidence - a narrative review. *Journal of Military Medicine* 2020; 22(1): 1-11.
2. Stein RA. The 2019 coronavirus: Learning curves, lessons, and the weakest link. *Int J Clin Pract* 2020; 74(4): e13488.
3. Murdoch DR, French NP. COVID-19: another infectious disease emerging at the animal-human interface. *N Z Med J* 2020; 133(1510): 12-5.
4. Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: A review. *Clin Immunol* 2020; 215: 108427.
5. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395(10223): 497-506.
6. Habas K, Nganwuchu C, Shahzad F, Gopalan R, Haque M, Rahman S, et al. Resolution of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Expert Review of anti-Infective Therapy* 2020; 18(12): 1201-11.
7. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in china, 2019. *The New England Journal of Medicine* 2020; 382(8): 727-33.
8. Karim B, Barary M, Fereydouni Z, Sanjari E, Hosseinzadeh R, Salehi-Vaziri M, et al. The nuts and bolts of recombination in the generation of SARS-CoV-2 variants; from XA to XBB. *Letters in Applied Microbiology* 2024; 77(8): 1-14.
9. Liu YC, Kuo RL, Shih SR. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. *Biomed J* 2020; 43(4): 328-33.
10. Rai P, Kumar BK, Deekshit VK, Karunasagar I, Karunasagar I. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. *Appl Microbiol Biotechnol* 2021; 105(2): 441-55.
11. Stasi C, Fallani S, Voller F, Silvestri C. Treatment for COVID-19: An overview. *Eur J Pharmacol* 2020; 889: 173644.
12. Yang L, Liu S, Liu J, Zhang Z, Wan X, Huang B, et al. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. *Signal Transduct Target Ther* 2020; 5(1): 128.
13. Magalhaes E, Stoner A, Palmer J, Schranze R, Grandy S, Amin S, et al. An Assessment of Mental Health Outcomes During the COVID-19 Pandemic. *Community Ment Health J* 2021; 57(7): 1267-77.
14. Maleki A, Mehrbod P, Bokharaei-Salim F, Eybpoosh S, Tavakoli M, Mohammadnejad AE, et al. Epidemiological surveillance of respiratory viral infections in SARS-CoV-2-negative samples during COVID-19 pandemic in Iran. *Viol J* 2023; 20(1): 296.
15. Worldometer [Available from: <https://www.worldometers.info/coronavirus/>].
16. Majumder J, Minko T. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. *AAPS J* 2021; 23(1): 14.
17. Ochani R, Asad A, Yasmin F, Shaikh S, Khalid H, Batra S, et al. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. *Infez Med* 2021; 29(1): 20-36.
- Sadat Larijani M, Biglari A, Sorouri R, Salehi-Vaziri M, Doroud D, Azadmanesh K, et al. Lessons from COVID-19 Pandemic: A Successful Policy and Practice by Pasteur Institute of Iran. *Iran Biomed J* 2024; 28(1): 1-7.
19. Saneai D, Jamshidi S, Ghalyanchi Langeroudi A, Akbarein H, Nadji SA, Shoarzargari L, et al. Molecular detection of SARS-CoV-2 in domestic cats in close contact with positively-infected owners in Tehran ,Iran in 2021. *JFMS Open Rep* 2023; 9(2): 20551169231172620.
20. Ahmadi Z, Maleki A, Eybpoosh S, Fereydouni Z, Tavakoli M, Kashanian S, et al. Comparison of a multiplex real-time pcr technique with oxford nanopore technologies next-generation sequencing for identification of SARS-CoV-2 variants of concern. *Intervirology* 2023; 66(1): 136-41.
21. Yuce M, Filiztekin E, Ozkaya KG. COVID-19 diagnosis -A review of current methods. *Biosens Bioelectron* 2021; 172: 112752.
22. Espejo AP, Akgun Y, Al Mana AF, Tjendra Y, Millan NC, Gomez-Fernandez C, et al. Review of current advances in serologic testing for COVID-19. *Am J Clin Pathol* 2020; 154(3): 293-304.
23. Tahamtan A, Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev Mol Diagn* 2020; 20(5): 453-4.
24. Abbas S, Rafique A, Abbas B, Iqbal R. Real-Time Polymerase chain reaction trends in COVID-19 patients. *Pak J Med Sci* 2021; 37(1): 180-4.

25. Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, et al. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* 2006; 44(4): 1405-12.
26. Medhurst AD, Harrison DC, Read SJ, Campbell CA, Robbins MJ, Pangalos MN. The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J Neurosci Methods* 2000; 98(1): 9-20.
27. Mollaei HR, Afshar AA, Kalantar-Neyestanaki D, Fazlalipour M, Aflatoonian B. Comparison five primer sets from different genome region of COVID-19 for detection of virus infection by conventional RT-PCR. *Iran J Microbiol* 2020; 12(3): 185-93.
28. Cho H, Jung YH, Cho HB, Kim HT, Kim KS. Positive control synthesis method for COVID-19 diagnosis by one-step real-time RT-PCR. *Clin Chim Acta* 2020; 511: 149-53.
29. Li D, Zhang J, Li J. Primer design for quantitative real-time PCR for the emerging Coronavirus SARS-CoV-2. *Theranostics* 2020; 10(16): 7150-62.
30. Falzone L, Gattuso G, Tsatsakis A, Spandidos DA, Libra M. Current and innovative methods for the diagnosis of COVID-19 infection (Review). *Int J Mol Med* 2021; 47(6): 100.

Design, Synthesis, and Evaluation of in-house Covid-19 Real-time PCR Diagnostic Kit

Zare MR¹, Ebrahimifar Z², Sobhani Lari M³, Shokrollahnia Roshan H⁴, Abdollahpour-Alitappeh M^{5*}

¹Department of Environmental Health Engineering, Larestan University of Medical Sciences, Larestan, Iran, ²Student Research Committee, Larestan University of Medical Sciences, Larestan, Iran, ³Cellular and Molecular Biology Research Center, Larestan University of Medical Sciences, Larestan, Iran, ⁴Department of Molecular Virology, Laboratory of Dr Tayibi, Qaimshahr, Iran, ⁵Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 24 Nov 2023 Accepted: 15 Sep 2024

Abstract

Background & aim: Accurate and sensitive detection of Covid-19 RNA has a highly diagnostic value. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) is known as the most accurate diagnostic test (a gold standard) used for the diagnosis of Covid-19, having the ability to detect the specific RNA of the virus within a few days of infection. Therefore, the aim of this study was to design a sensitive method based on real-time PCR for the detection of Covid-19.

Methods: In the present experimental-applied study, all samplings and laboratory tests were carried out at Imam Reza Hospital, Molecular Laboratory for Corona Diagnosis and Cellular and Molecular Biology Research Center from Larestan University of Medical Sciences, Fars province, Iran, in 2021. Primers and probes of Covid-19 for N and RdRp genes were designed and blasted using the Oligo 7 software and the NCBI website, respectively. After synthesis of the primers and probes, real-time PCR was performed on 100 positive test samples, followed by determination of sensitivity, specificity, stability, precision and validation of the newly-developed kit. The collected data were analyzed using clinical sensitivity and specificity tests.

Results: The kit developed in the present study was able to identify all the positive samples of Covid-19. In the sensitivity test, the Limit of Detection (LOD) of the Covid-19 diagnostic kit was found to be 40 copies/mL. By examining the negative and positive samples, the specificity and accuracy of this kit were found to be 100%, and the kit was only able to identify the Covid-19 virus and showed high reproducibility. Temperature shock could not negatively affect the stability and potential of the kit. In addition, there was no significant difference between the kit developed in this study and the non-native commercial kits.

Conclusions: Due to its appropriate sensitivity, specificity as well as accuracy and stability compared with similar kits, this kit can be suitable for effective detection of the Covid-19 virus.

Keywords: Diagnostic kit, COVID-19, Real-time polymerase

***Corresponding author:** Abdollahpour-Alitappeh M, Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Email: abdollahpour1983@yahoo.com

Please cite this article as follows: Zare MR, Ebrahimifar Z, Sobhani Lari M, Shokrollahnia Roshan H, Abdollahpour-Alitappeh M. Design, Synthesis, and Evaluation of in-house Covid-19 Real-time PCR Diagnostic Kit. Armaghane-danesh 2024; 29(4): 497-511.

The scientific research journal Armaghan Danesh, affiliated with Yasuj University of Medical Sciences, is an open-access publication. All articles published in this journal