

Troubleshooting of infectious tests serology and immunoassay

D. mehrdad vanaki

DCLS / EMBA

Trainer & consultant QMS

Diagnostic technique	Principle	Strengths	Weaknesses	Variants	References
Immunoassay	Formation of antigen–antibody through recognition and binding	High sensitivity High specificity High speed throughput Quick TAT (20 min or less) Different types of tags, labels Automated method	Must rely on QC assurance High risk of interferences High cost	RIA EIA (FPIA, MEIA, CLIA)	Gupta <i>et al.</i> (2015), Mixson-Hayden <i>et al.</i> (2015)
NAAT	Amplification and detection of sequences from the viral genome (DNA or RNA)	High sensitivity High specificity Multiplexed platforms Genotyping Determination of the viral load New compact and portable formats	Longer run time Requires specific primers for the targets	RT-PCR qPCR NASBA TMA	García-Arroyo <i>et al.</i> (2016), Reijlans <i>et al.</i> (2008), Renois <i>et al.</i> (2010), Afshar and Mollaie (2012), Mercier-Delarue <i>et al.</i> (2014), Wu <i>et al.</i> (2014)
NGS	Polymerization of DNA template by incorporation of labelled dNTPs, and terminate the extension	High sensitivity High specificity Identification of novel genomic sequences Genotyping Accurate detection of mutations and drug resistant mutations	High cost Needs bioinformatics skills for data analysis Delay in use for routine clinical diagnostics	Pyrosequencing Fluorescently labelled dNTP Detection of released hydrogen ion (H ⁺)	Capobianchi <i>et al.</i> (2013), Bartolini <i>et al.</i> (2015), Lowe <i>et al.</i> (2016), Liu <i>et al.</i> (2013), Van den Hoecke <i>et al.</i> (2015), Rothberg <i>et al.</i> (2011)
MS	Ionization of the sample, then separation and detection of the particles according to their mass-to-charge ratio (<i>m/z</i>)	High sensitivity Versatility Cost-effectiveness High workload	Expensive equipment Limited database library	MALDI-TOF MS ESI MS Often combined with other methods: PCR-MS	Lévêque <i>et al.</i> (2014), Mengelle <i>et al.</i> (2013), Qian <i>et al.</i> (2014)

CLIA, chemiluminescent immunoassay; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; EIA, enzyme immunoassay; ESI, electrospray ionization; FPIA, fluorescence polarization immunoassay; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight; MEIA, micro-particle enzyme immunoassay; MS, mass spectrometry; NGS, next-generation sequencing; NAAT, nucleic acid amplification test; NASBA, nucleic acid sequence-based amplification; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; RIA, radio-immunoassay; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; TMA, transcription-mediated amplification.

PCR infectious pannel

PCR infectious pannel detect over 100 micdroorganism by qualitative and quamtitative method

PCR infectious test use foe detect slow growth organism and microorganism impossible for culture method or new strain of microorganisms

In PCR method we can use all source of clinical samples (fresh or old)

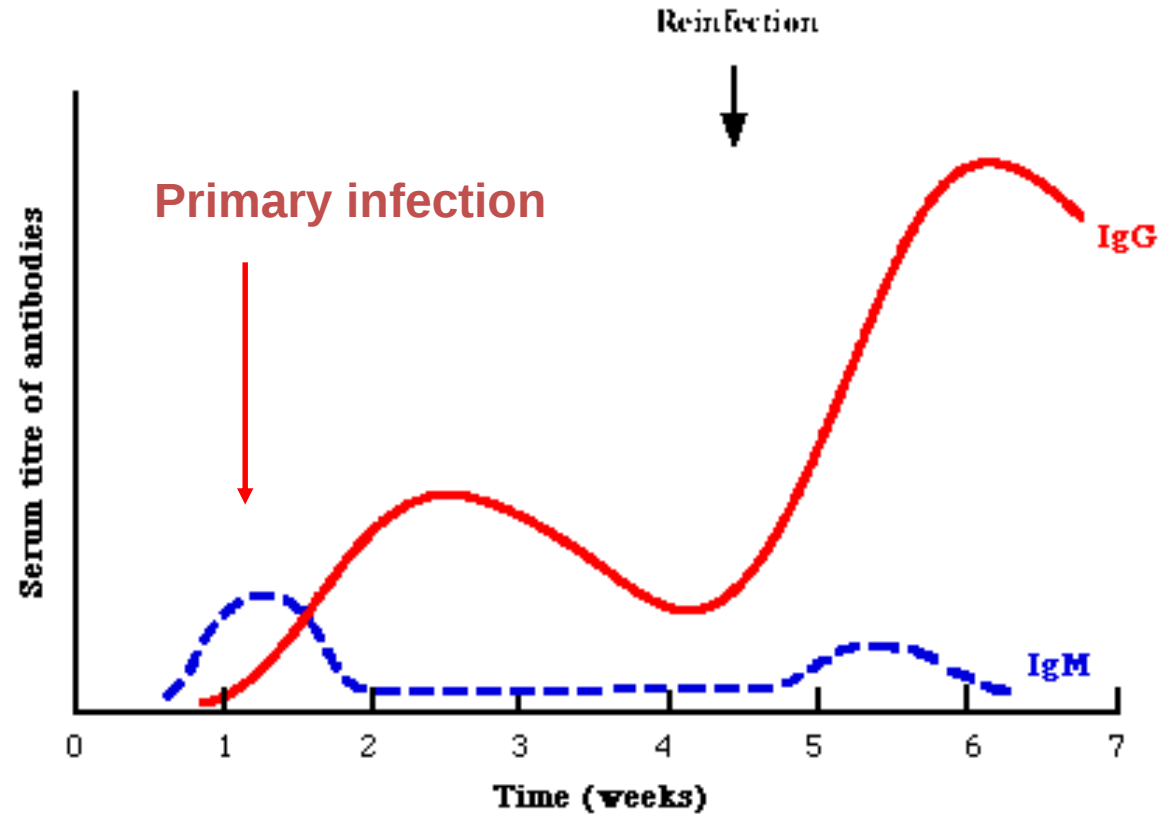
PCR advantage from culture:

Cultivation of samples for at least 24 hours and Sometimes **it takes several weeks to become positive**. If **sick If he has taken antibiotics, the culture may be negative**. Even if clinical samples are sent to the laboratory later

Cultivation of some infectious agents is negative

PCR infectious pannel

- Culture of some infectious agents such as viruses, chlamydia, Mycoplasma and rickettsiae could not be cultured by conventional methods and need specific culture media so with the help of PCR, the above samples can be checked and the result will be ready in a few hours
- An example is tuberculosis culture as gold standard, which takes time several weeks, but with the 24-hour PCR technique, the patient's result can be determined so Treatment of the patient begins quickly
- For positive TB smears, 98% PCR test is sensitive, but for negative TB smears There is 45% sensitivity and the test specificity is above 98%
- For two groups of patients PCR tuberculosis have not order , the first group of patients who have started anti-tuberculosis treatment should not be requested because the false positive PCR test occurred
- and the second group of people with negative TB smear with weak clinical suspicion of tuberculosis because the PCR result If it is false negative, the patient will not be identified.
- PCR in extrapulmonary tuberculosis is highly recommended such as CSF and serous fluid



- Detection of rising titres of antibody between acute and convalescent stages of infection,
- or the detection of IgM in primary infection.

- **Terms used in evaluating test methodology :**
- **Analytical Sensitivity** – ability of a test to detect very small amounts of a substance
- **Clinical Sensitivity** – ability of test to give positive result if patient has the disease (no false negative results)
- **Analytical Specificity** – ability of test to detect substance without interference from cross-reacting substances
- **Clinical Specificity** – ability of test to give negative result if patient does not have disease (no false positive results)

- **Affinity** : Affinity refers to the **strength of binding between a single antigenic determinant and an individual antibody combining site**. Affinity is the equilibrium constant that describes the antigen-antibody reaction
 - It is the sum of the attractive and repulsive forces operating between the antigenic determinant and the combining site .
- **Avidity** : Avidity is a measure of the **overall strength of binding of an antigen with many antigenic determinants and multivalent antibodies**
Avidity is influenced by both the valence of the antibody and the valence of the antigen.
- **Avidity is more than the sum of the individual affinities.**

Preanalytical error infectious tests

- Icteric & lipemic sample
- Clot or fibrin in samples
- Missing sample
- Mislabeling sample
- Insufficient samples
- No drug using history for patients (especially in TORCH panel)
- Dislocation of serum in sampling or separation phase

Analytical error infectious tests

- Fluctuation of temperature in refrigerator or freezer
- Frequent freeze and defreeze of serum samples
- Using expired kits and reagents
- Don't use external control
- Fluctuation of environmental factors such as moisture and temperature for manual immunoassay and ELISA methods
- Do not reach the ambient temperature of the kits taken out of the refrigerator at the time of use
- Dilution error in ELISA kits
- Error temperature in ELISA methods (37 / RT)
- Error temperature of incubator of automatic instrument for immunoassay tests (CLIA / ECL / ELFA)

Analytical error infectious tests

- Contamination and drop of conjugate reagent in manual ELISA methods
- Contamination and drop trigger reagent in automated immunoassay methods
- Carry over or well to well contamination between neg serum with pos control or between pos serum with neg serum or between neg control with pos control in ELISA methods
- Carry over in automated immunoassay methods because of fail in washing process
- Decrease or increase the number of washes in ELISA manual methods and use old and unsuitable buffer for washing
- Use of kits with improper sensitivity to test the torch and increase the amount of false negatives
- Use of kits with improper specificity to test the infectious tests and increase the amount of false positive.

Analytical error infectious tests

- Improper soaking time in manual ELISA methods
- Error in sampling and dispensing serum in manual ELISA methods
- Error in sampling and dispensing serum in automated immunoassay instruments because of complete or partial block of Probe sample or reagents with fibrin clot or Foreign object
- Lack of attention to the exact cut-off formula in ELISA manual methods, especially torch and hepatitis qualitative tests
- Displacement of serum sampling and dispensing in manual ELISA methods

Post analytical error infectious tests

- Transcriptional errors in manual data entry
- Prolonged TAT of emergency infectious tests for patients from predetermined limits by lab
- Missing or Prolonged reporting and notification of critical results in field of infectious test (especially pos viral markers for dialysis or presurgery)
- Displacement of final report during releasing results(release to wrong patients)
- Attach another mistake report to main report of patients
- Incomplete archiving or failure to maintain positive infectious specimens for repeat or legal issues
- Wrong reference interval of infectious tests in order of change of kits
- Release of pos final infectious results without reconfirm with same method or confirmatory method (if available)
- Release of false negative infectious results without check of history or deltacheck

Post analytical error infectious tests

- Lack of attention to the history of taking certain drugs for certain infectious tests such as torch (acetaminophene/ aspirin / metformin / ibuprofen)

عوامل موثر در تفسیر نتایج سرولوژی عفونی

1- سن بیمار و سابقه قبلی بیمار : سابقه ابتلا قبلی یک بیمار به یک بیماری عفونی نسبت به فردی که اولین بار ابتلا او می باشد تیترا بالاتری را نشان می دهد . سن بالاتر معمولاً احتمال ابتلا قبلی را بالا می برد .

2- سابقه واکسیناسیون بیمار : در بیمار واکسینه شده سه مسئله در تفسیر رخ می دهد الف- سرولوژی مثبت مربوط به واکسن بوده و فرد مبتلا نمی باشد ب- تشابه آنتی ژنی واکسن بیمار با آنتی ژن عامل عفونی اخیر بیمار ج- علیرغم واکسیناسیون بیمار هم اکنون به همان بیماری مبتلا شده و نسبت به گروه های مشابه واکسینه نشده تیترا بالاتری دارند

عوامل موثر در تفسیر نتایج سرولوژی عفونی

3- وضعیت جغرافیائی محیط بیمار: سابقه زندگی بیمار در مناطق شایع و اندمیک بیماری منجر به بروز آنتی بادی های طبیعی در این گروه بیماران می گردد که مکررا در تماس با آنتی ژن های عامل بیماری می باشند و نهایتا علاوه بر تیترا بالاتر آنتی بادی احتمال عفونت قبلی در این گروه افراد بالاتر می باشد **و در ضمن در این گروه بیماران حدنصاب تیترا بیماری را بالاتر می باشد.**

4- شغل بیمار : افراد که شغل مرتبط با دام یا محصولات دامی دارند (دامپزشک / دامدار / حیوانات خانگی و..) دارای حدنصاب و تیترا بالاتری نسبت به افراد معمول جامعه بوده و احتمال بیماری قبلی در این گروه بالاتر می باشد.

5- نقص سیستم ایمنی بیمار: در بیماری پروتون یا هر عاملی که منجر به هیپو گاما گلوبولینمی یا آگاما گلوبولینمی گردد

عوامل موثر در تفسیر نتایج سرولوژی عفونی

6-موسسه تولید کننده آنتی ژن: در یک موسسه معیار تیتر مثبت برای یک آنتی ژن یک به 80 میباشد و در موسسه دیگر 160

در این موارد آزمایشگاه بهتر است آنتی ژن خریداری شده را با یک سرم مثبت با تیتر و عیار معلوم چک نماید

7-مصرف دارو: تجویز فوری و بی موقع آنتی بیوتیک ها نظیر کلرامفنیکل در بیماری تیفوئید و یا مصرف دارو های ایمونوساپرسیو مثل کورتیکواستروئید ها و یا شیمی درمانی مجموعا منجر به تاخیر در ظهور آنتی بادی های سرولوژیک می گردند و گاهی آنتی بادی ظهور نمی نماید .

8- مرحله بیماری : در اواخر هفته دوم معمولا آگلوتینین ها (آنتی بادی ها) در سرم قابل مشاهده و تعیین عیار می باشند و قبل از این زمان معمولا تست سرولوژیک فاقد ارزش انجام و تفسیر می باشد

9- خطا های آزمایشگاهی : پپیت الوده به سرم یک بیمار مثبت برای یک بیمار نرمال / خطا در لیبلینگ / جابجائی اطلاعات بیمار در برگ جواب نهائی / خطای خوانش در روش لوله ای و جابجا خواندن یک بیمار به جای بیمار دیگر

5 serology method for brucellosis confirm with WHO

- **1-Rosebanga rapid test**
- **2- wright rapid test**
- **3- wright tube test**
- **4- 2ME test**
- **5- Coombs wright test**

Rosebungal rapid test (card test)

آنتی ژن رز بنگال به رنگ قرمز مایل به صورتی با پ هاش اسیدی می باشد که معمولا از کلنی های صاف بروسلا آبورتوس سویه 19 یا 99 تهیه می گردد (که آنتی ژن های مشترک با سایر سویه ها دارند) . این آنتی ژن در ایران طبق روش استاندارد بین المللی درموسسه رازی تولید می گردد

روش کار: رزبنگال بایستی دور از نور و در یخچال نگهداری گردد و در زمان مصرف حتما بایستی به حرارت اطاق برسد (30 دقیقه) بدون نیاز به رقیق سازی 300 لاندا آنتی ژن رزبنگال را با هم حجم آن نمونه سرم (300 لاندا) روی اسلاید شیشه ای مخلوط نموده (قطر 2.5 سانت) / 4 دقیقه دوران و شیک سرولوژی / خوانش در زیر نور لامپ / مشاهده دانه های آگلوتینه به طور مشخص مثبت / محیط یکنواخت منفی

واکنش حد واسط یا مشکوک در رزبنگال تعریف نشده است لذا واکنش صرفا مثبت یا منفی می باشد.

خطا های رایج : 1- رقیق سازی آنتی ژن که منجر به تغییر پ هاش و تعداد ذرات میکربی آنتی ژن گردیده و جواب مثبت یا منفی کاذب حاصل می نماید 2- کاربرد نابجا رزبنگال در روش لوله ای 3- فریز نمودن رزبنگال که منجر به مثبت کاذب می گردد

Wright rapid test

روش کار رایت سریع روی اسلاید شیشه ای:

1-ریختن مقادیر سرم به میزان 0.005 / 0.01 / 0.02 / 0.04 / 0.08

2- به حرارت اطاق رساندن آنتی ژن

3- آماده نمودن نمونه کنترل سرم مثبت و منفی در هر ردیف کاری

4- اضافه نمودن آنتی ژن رایت سریع به میزان یک قطره (300 لاتدا)

5-مخلوط کردن در یک پهنه 2.5 سانتی و شیک سرولوژی 3 دقیقه

6-بررسی آگلوتیناسیون در زیر نور غیر مستقیم چراغ

7- خوانش : 100% آگلوتیناسیون +4 / 75% +3 / 50% +2 / 25%

+1 / کمتر از 25% -+ /

منابع رایج خطا: 1- زمان شیک سرولوژی بیش از 3 دقیقه مثبت

کاذب(به دلیل خشک شدن آنتی ژن) 2-روش خوانش ناصحیح توسط

اپراتور 3-اسلاید شیشه ای کثیف

Wright tube test

1- تهیه سریال دایلوژن از سرم بیمار (روش 11 لوله ای) لوله اول 0.9 نرمال سالین + 0.1 سرم / سایر لوله ها حاوی 0.5 نرمال سالین که به طور سریالی از لوله اول به آنها 0.5 سی سی سرم رقیق شده انتقال می یابد و نهایتاً از لوله آخر 0.5 سی سی سرم اوت می گردد.

رقت های اولیه حاصل از سریال دایلوژن سرم شامل $1/10 - 1/20 - 1/40 - 1/80 - 1/160 - 1/320$ - $1/640 - 1/1280 - 1/2560$ / لوله 10 کنترل مثبت با نمونه مثبت بیمار / لوله 11 فاقد سرم بوده و به عنوان کنترل منفی آنتی ژن می باشد

2- به تمام لوله ها 0.5 سی سی آنتی ژن اضافه نموده در این حالت عدد تیترا لوله های فوق دو برابر می گردد به عنوان مثال لوله $1/20$ به لوله $1/40$ تبدیل می گردد و... / غلظت ذرات در روش لوله ای از روش سریع رقیقتر است / مطابق دستور سازنده آنتی ژن روش لوله ای با نرمال سالین در صورت نیاز رقیق می گردد.

3- 24 الی 48 ساعت انکوباسیون در بن ماری 37 درجه / خروج بدون تکان جا لوله ای از بن ماری به طوری مه رسوب ته لوله ها تکان نخورد / ابتدا نتیجه کنترل مثبت و منفی را خوانده و سپس تست بیمار

4- خوانش در زیر نور غیر مستقیم چراغ و در بالای یک صفحه تیره / بررسی درجه شفافیت محلول روئی در قدم اول / قدم دوم **بررسی میزان رسوب آگلوتینه شده با زدن یک ضربه کوچک به پائین لوله**

مایع روئی کاملاً شفاف با رسوب که یکپارچه آگلوتینه شده $+4$ / مایع روئی نسبتاً شفاف (نیمه کدر) با 75% آگلوتیناسیون $+3$ / 50% آگلوتیناسیون با مایع روئی نسبتاً کدر $+2$ (معیار خوانش تیترا) 25% آگلوتیناسیون با مایع روئی کاملاً کدر $+1$ / حرکت دودی رسوب واکنش منفی

coombs Wright test

کومبس رایت برای افتراق آنتی بادی ناقص یا بلوکان خصوصا در موارد بروسلوز مزمن یا رجعت بروسلوز کاربرد دارد.

روش کار :

- 1-انجام روتین کار مشابه روش رایت لوله ای
- 2- 15 دقیقه دور 2000 سانتریفوژ و تخلیه مایع روئی و شستشو با نرمال سالین (سه بار)
- 3- در نوبت سوم شستشو روی رسوب لوله ها یک قطره آنتی یومن (سرم کومبس) اضافه می نمائیم و لوله ها را تکان می دهیم
- 4- 0.5 ساعت انکوباسیون لوله ها در بن ماری 37 درجه
- 5- 15 دقیقه دور 2000 سانتریفوژ و خواندن لوله ها با زدن ضربه ملایم به ته لوله ها و گزارش آخرین تیترا (+2)

2ME Wright test

تست در صورت مثبت بودن رایت ارزشمند است و روی نمونه رایت منفی ضرورت انجام ندارد.

این تست تیتراژ IgG را نشان می دهد و منجر به تخریب
ملکول های IgM می گردد

کاربرد تست :

- 1- تشخیص افتراقی بروسلوز حاد و مزمن را سبب می گردد خصوصا در افراد دارای علائم بالینی با کشت خون منفی و تیتراژ رایت لوله ای پائین
 - 2- مانیتورینگ موفقیت درمان با آنتی بیوتیک در بروسلوز
- نکات روش کار : 2ME تامپون بوی زننده ای دارد و بهتر است زیر هود کار شود جایگزین بدون بو برای این بافر DTT می باشد
- آنتی ژن بروسلا در این تست فاقد فنل است چون بر روی مواد احیا کننده اثر منفی دارد لذا این آنتی ژن مستعد آلودگی می باشد و دارای تاریخ مصرف کوتاه و محدودی می باشد .

معمولا تیتراژ 1/40 به بالا قبل از درمان بروسلوز دیده می شود

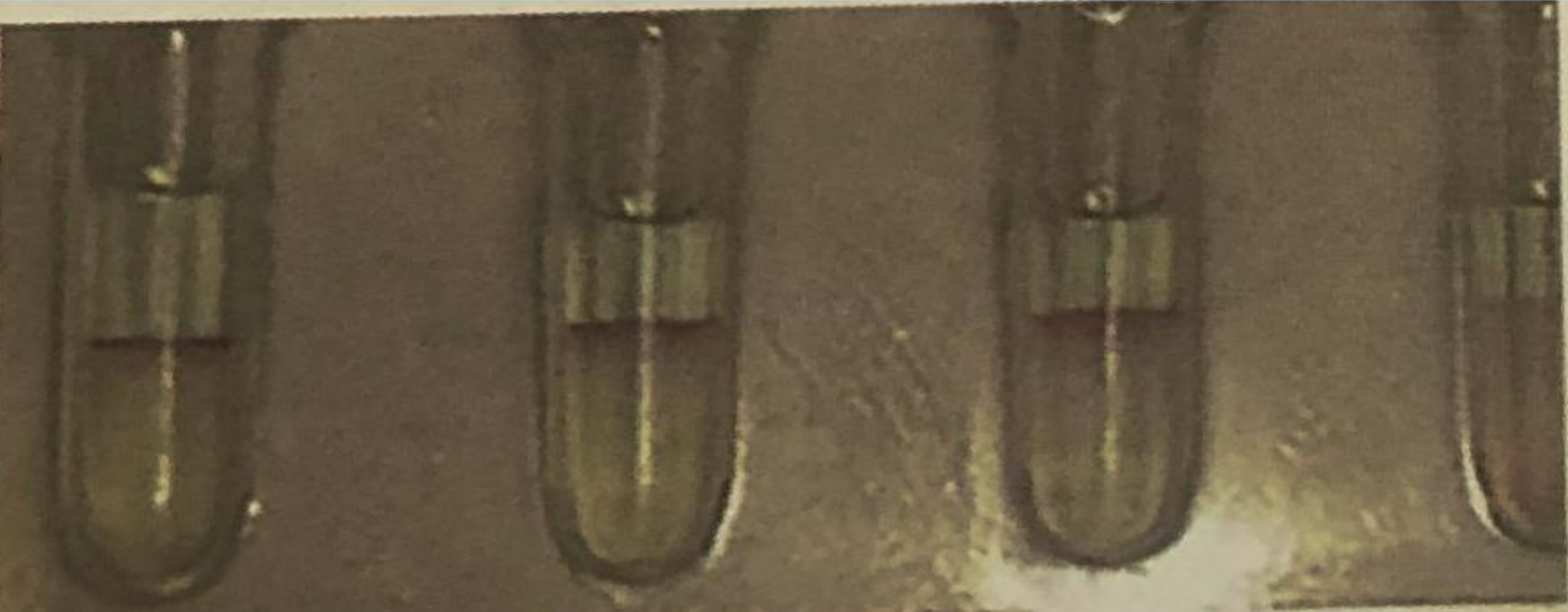
روش بروسلا کومبس ژل

هدف :

تشخیص توتال انتی بادی ضد بروسلا
در سرم انسانی

آزمایش بروسلا کومبس ژل در اصل نوعی روش کومبس است.
اساس آزمایش:

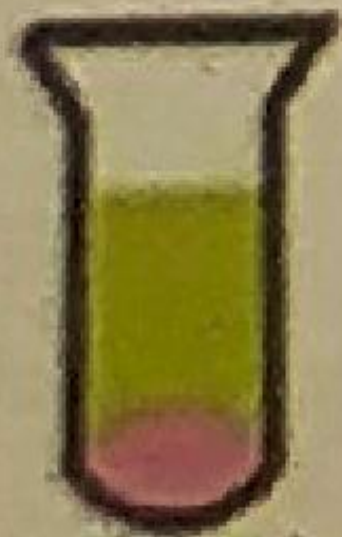
کیت بروسلا کومبس ژل ریتون بیو آنالیز، آزمایش آگلوتیناسیون بروسلا در میکرو ستون با زمینه ژل و آنتی گلوبولین انسانی است. نتایج به صورت چشمی قابل ارزیابی هستند. اگر آنتی بادی علیه آنتی ژن های بروسلا در سرم وجود نداشته باشد، آنتی ژن های صورتی بروسلا در کف ستون ته نشین می شوند یا در ستون به حالت معلق باقی میمانند. اگر آنتی بادی علیه آنتی ژن های بروسلا در سرم وجود داشته باشد کمپلکس های آنتی ژن - آنتی بادی به شکل یک دایره صورتی رنگ بر روی ژل قرار می گیرد.



$1/20$

$1/40$

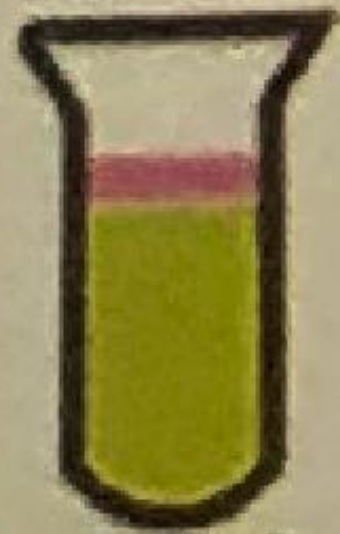
$1/80$



Negntive



Negntive



Positive

مقادیر مورد انتظار:

کیفیت بروسلاکومبیس ژل ریتون بیو آنالیز یا ۱۰۰ نمونه سرم مورد آزمایش قرار گرفت. داده های به دست آمده از مطالعه فوق نشان داد که سرم هایی که در تیتراسیون، ۱/۱۶۰ یا بالاتر هستند را میتوان مثبت در نظر گرفت. این نتایج درصد بالایی از انطباق با روش ایمونوکیچر را نشان میدهد.

حساسیت و اختصاصیت:

در ۱۰۰ نمونه سرم که با روش ایمونو کیچر مقایسه شده مشخص شد که حساسیت ۹۶٪ و اختصاصیت ۹۷٪ است. در این مطالعه نتایج بین منفی تا تیترا ۱/۲۵۶۰ در سرم نمونه های انسانی مشاهده گردید. همچنین پدیده پروزون تا تیترا ۱/۲۰۴۸۰ مشاهده نگردید.

آزمون های دقت:

Intra Assay Precision:

تعداد ۳ نمونه (۲ نمونه مثبت و ۱ نمونه منفی) که از قبل در ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شده اند توسط یک تکنیسین ثابت و در شرایط یکسان هر کدام ۳ مرتبه مورد ارزیابی قرار گرفت. اختلاف تیتراسیون بیشتر از یک تیترا مشاهده نشد.

Inter Assay Precision:

تعداد ۳ نمونه (۲ نمونه مثبت و ۱ نمونه منفی) که از قبل در ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شده اند توسط یک تکنیسین دیگر و در روز دیگر مورد ارزیابی قرار گرفت. اختلاف تیتراسیون بیشتر از یک تیترا مشاهده نشد.

تست ویدال

تست ویدال تست غربالگری سرولوژیک جهت تشخیص و مانیتورینگ بیماری حصبه (تیفوئید) و شبه حصبه (پاراتیفوئید)

می باشد و باکتری مولد این بیماری عفونی باکتریال سالمونلا از گروه انتروباکتریاسه ها (باسیل گرم منفی روده ای) می باشد.

سالمونلا قبل از مثبت شدن تست سرولوژیک (ویدال) از خون و مدفوع و ادرار جدا می گردد و به تدریج که تیتراژ آنتی بادی بالا می رود احتمال مثبت شدن کشت سالمونلا (خون / مدفوع / ادرار) کمتر می گردد.

50% بیماران در هفته اول ویدال مثبت خواهند داشت

90% بیماران در هفته سوم و چهارم ویدال مثبت خواهند شد.

تست ویدال

از بین دو آنتی ژن H (فلاژلار) و آنتی ژن O (سوماتیک)
آنتی ژن سوماتیک از لحاظ بالینی و تشخیصی ارزش بیشتری دارد.
آنتی کر ضد آنتی ژن فلاژلار عمدتاً از کلاس IgG بوده و در ارتباط
با آنتی ژن سوماتیک از کلاس IgM می باشد

پس از درمان حصبه یا تیفوئید آنتی بادی ضد سوماتیک حداکثر 3
الی 6 ماه پایدار بوده ولی آنتی بادی ضد فلاژل مدت طولانی باقی می
ماند

آنتی بادی سوماتیک از روز 8 بیماری ظهور می نماید و آنتی بادی
فلاژلار از روز 12 بیماری

آنتی ژن سطحی Vi دارای آنتی بادی از کلاس IgM می باشد
که ناپایدار بوده و از هفته سوم با تیتراژ پائین ظهور نموده و سریعاً

نیز حذف می گردد

تست ویدال

از بین دو آنتی ژن H (فلاژلار) و آنتی ژن O (سوماتیک)
آنتی ژن سوماتیک از لحاظ بالینی و تشخیصی ارزش بیشتری دارد.
آنتی کر ضد آنتی ژن فلاژلار عمدتاً از کلاس IgG بوده و در ارتباط
با آنتی ژن سوماتیک از کلاس IgM می باشد

پس از درمان حصبه یا تیفوئید آنتی بادی ضد سوماتیک حداکثر 3
الی 6 ماه پایدار بوده ولی آنتی بادی ضد فلاژل مدت طولانی باقی می
ماند

آنتی بادی سوماتیک از روز 8 بیماری ظهور می نماید و آنتی بادی
فلاژلار از روز 12 بیماری

آنتی ژن سطحی Vi دارای آنتی بادی از کلاس IgM می باشد
که ناپایدار بوده و از هفته سوم با تیتراژ پائین ظهور نموده و سریعاً

نیز حذف می گردد

تست ویدال

تیتراژ قابل قبول برای تست ویدال در مناطق و کشور های مختلف متفاوت است
ولی عمدتاً 1:80 برای آنتی بادی ضد سوماتیک و حداقل تیتراژ قابل قبول
برای آنتی بادی ضد فلاژل 1:40
می باشد.

مثبت بودن آنتی بادی ضد فلاژل به تنهایی فاقد ارزش بوده مگر در مواردی
که هر سه آنتی بادی ضد فلاژل مثبت باشد که نشانه واکسیناسیون در سه
ماه اخیر می باشد.

تیتراژ آنتی بادی ضد سوماتیک ندرتاً بالاتر از 1:400 می رسد و پس از
بهبودی سریعاً در طول 3 الی 6 ماه در سرم ناپدید می گردد.

جواب تست ویدال به روش سریع گاهی با روش لوله ای هماهنگ نبوده و
در این موارد جواب قطعی و نهایی روش لوله ای خواهد بود

تفسیر کاربردی تست ویدال

مثال 7	مثال 6	مثال 5	مثال 4	مثال 3	مثال 2	مثال 1	آنتی ژن
	1:400		1:100	1:200	1:200	1:400	oD
1:200	1:600	1:400				1:800	Hd
							oA
	1:100	1:100					Ha
			1:200		1:400		oB
	1:200	1:200			1:800		Hb

تست ویدال

- مثال 1:** استقرار بیماری حاد تیفوئید (از نوع سالمونلا تیفی)
- مثال 2:** بیماری حاد با سالمونلا پاراتیفی بی که با آنتی ژن سالمونلا تیفی قرابت آنتی ژنیک و واکنش متقاطع دارد.
- مثال 3:** اولین احتمال بیماری حصبه در فاز بسیار ابتدائی (روز 7 الی 10) که با تکرار در فاصله دو هفته بعد آنتی بادی ضد فلاژل نیز مثبت می گردد / عفونت با عوامل عفونی غیر سالمونلا با قرابت آنتی ژنیک نظیر یرسینیا
- مثال 4:** شخص مبتلا به پاراتیفی بی در اوایل هفته دوم بوده در حالی که با باسیل ابرت (تیفی) اشتراک یا قرابت آنتی ژنیک دارد.
- مثال 5:** واکسن سه گانه سالمونلا (TAB)
- مثال 6:** بیماری که سه ماه پیش واکسینه شده و در حال حاضر به حصبه مبتلا گردیده
- مثال 7:** غیر فعال شدن واکسن سه گانه پس از گذر سال های متمادی / ابتلا قبلی بیمار به سالمونلا تیفی در سال های قبل

Covid -19

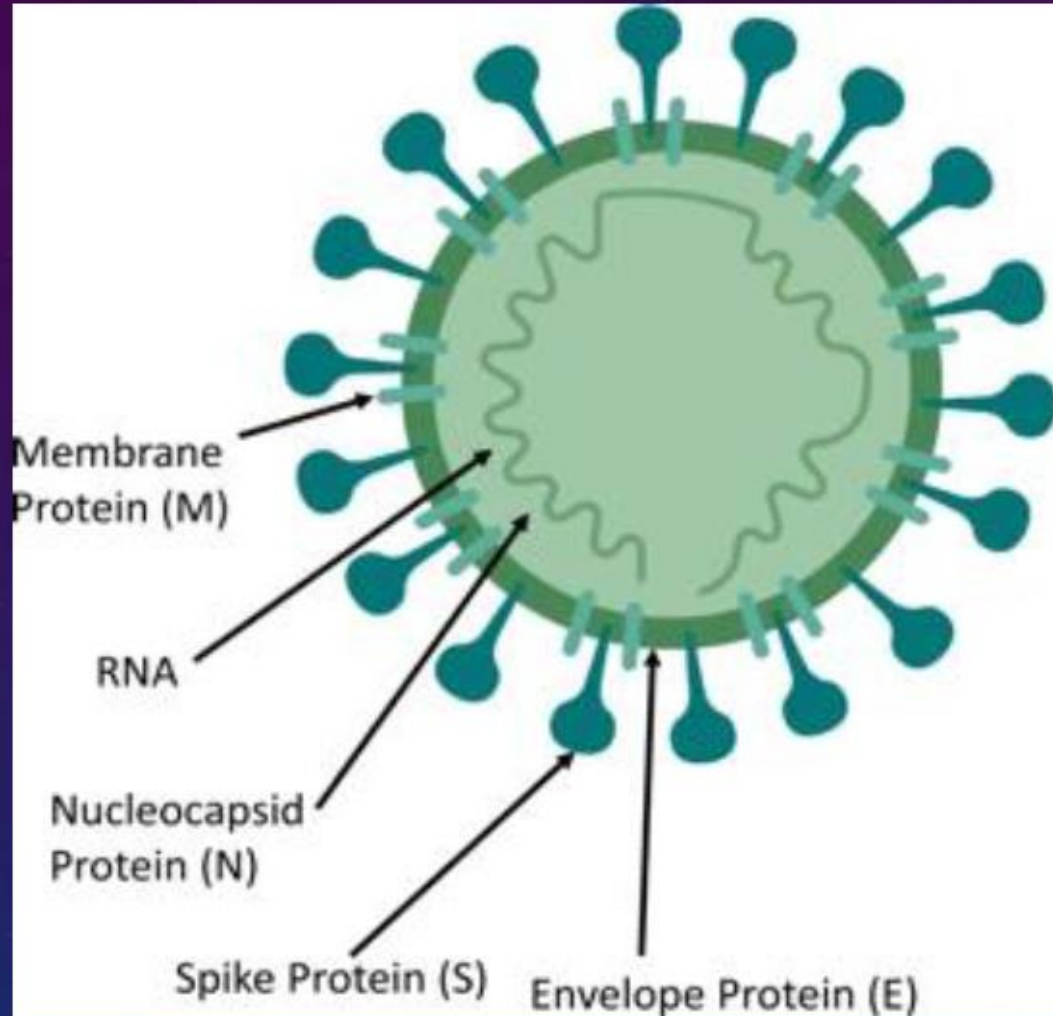
laboratory tests

D. mehrdad vanaki

DCLS / EMBA

Trainer & consultant QMS

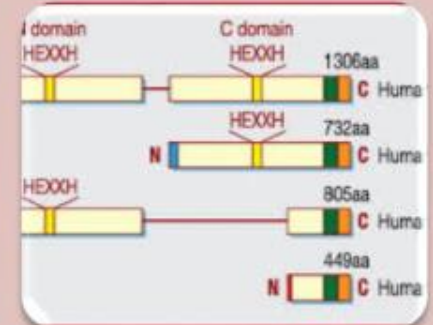
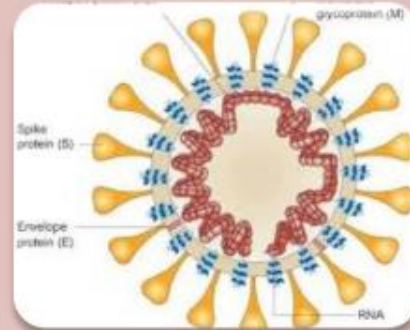
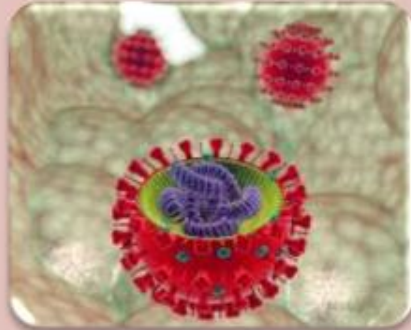
MAIN STRUCTURE OF CORONAVIRUSES



Structural Protein	Function of Protein
Nucleocapsid Protein (N)	Bound to RNA genome to make up nucleocapsid
Spike Protein (S)	Critical for binding of host cell receptors to facilitate entry of host cell
Envelope Protein (E)	Interacts with M to form viral envelope
Membrane Protein (M)	- Central organiser of CoV assembly - Determines shape of viral envelope

- It has been noted that some CoVs do not need to have the full ensemble of structural proteins to make virions, highlighting that certain proteins may be dispensable or compensated by the function of non-structural proteins.

DIFFERENT TYPE OF ANALYTE LABORATORY TESTING RELATED COVID-19



RNA

ORF1a/b Gene
N Gene
E Gene
S Gene

Antigen

N Protein
S Protein

Antibody

IgM
IgG
IgA

Host Respons

CBC
CRP
D Dimer
SGOT
Albumin
LDH, etc

Potential Succability

ACE2 Gene
HLA Gene

rRTPCR, LAMP,
NGS

ELISA, Immuno-
chromatography

ELISA, Immuno-
chromatography,
Chemiluminescence
immunoassay

Enzymatic,
colorimetry,
flowcytometry,
impedance

Genotyping
microarray, RTPCR,
Sanger Seq, NGS

FAVORABLE TECHNOLOGY DETECTION RELATED SARS COV-2

Molecular Based testing

- **Closed System**
 - More Safety & Standardize
- **Open system**
 - Easy & Faster to develop new test

Immunoassay Based testing

- **Rapid immunochromatigraphy**
 - Faster results, Easy to use
- **ELISA or Chemiluminescence**
 - More standardize & possible to Quantify

TESTS FOR SARS–COV-2/COVID-19 AND POTENTIAL USES

Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS–CoV-2/COVID-19

Type of Test	Measure	Value	Beneficiary
 Nucleic acid amplification test for viral RNA <i>(nasopharyngeal swab, oropharyngeal swab, sputum, bronchoalveolar lavage fluid, others)</i>	Current infection with SARS-CoV-2	• Inform individual of infection status so they can anticipate course of illness and take action to prevent transmission • Inform patient management and actions needed to prevent transmission • Inform actions needed to prevent transmission	• Individual • Healthcare or long-term care facility • Public health
 Antibody detection	Past exposure to SARS-CoV-2	• Detect susceptible individuals (antibody negative) and those previously infected • Identify individuals with neutralizing antibodies • Facilitate contact tracing and surveillance	• Identify those potentially immune to SARS-CoV-2 (if tests can detect protective immunity, individuals could be returned to work) • Healthcare facilities: Experimental therapy • Public health

RECOMMENDED TEST LIST:

Laboratory Test	Main laboratory abnormalities observed in adult patients with unfavorable COVID-19 progression (Modified from 1-12)	Potential clinical and biological significance (Modified from 3)
Complete blood count	Increased white blood cell	Bacterial (super)infection
	Increase neutrophil count	Bacterial (super)infection
	Decreased lymphocyte count	Decreased immunological response to the virus
	Decreased platelet count	Consumption (disseminated) coagulopathy
Albumin	Decreased	Impairment of liver function
Lactate Dehydrogenase	Increased	Pulmonary injury and/or widespread organ damage
Alanine Aminotransferase	Increased	Liver injury and/or widespread organ damage
Aspartate aminotransferase	Increased	Liver injury and/or widespread organ damage
Total bilirubin	Increased	Liver injury
Creatinine	Increased	Kidney injury
Cardiac troponin	Increased	Cardiac injury
D-Dimer	Increased	Activation of blood coagulation and/or disseminated coagulopathy
Prothrombin Time	Increased	Activation of blood coagulation and/or disseminated coagulopathy
Procalcitonin	Increased	Bacterial (super)infection
C-reactive protein	Increased	Severe viral infection/viremia/viral sepsis
Ferritin	Increased	Severe inflammation
Cytokines (IL-6)	Increased	Cytokine storm syndrome

FREQUENT LABORATORY ABNORMALITIES IN PATIENTS WITH COVID-19 INCLUDE:

- **Lymphopenia** (35-75%)
- **↑ C reactive protein** (CRP **75-93%**)
- **↑ Lactate dehydrogenase** (LDH; 27-92%)
- **↑ Erythrocyte sedimentation rate** (ESR; up to 85%)
- **↑ D-dimer** (36-43%)

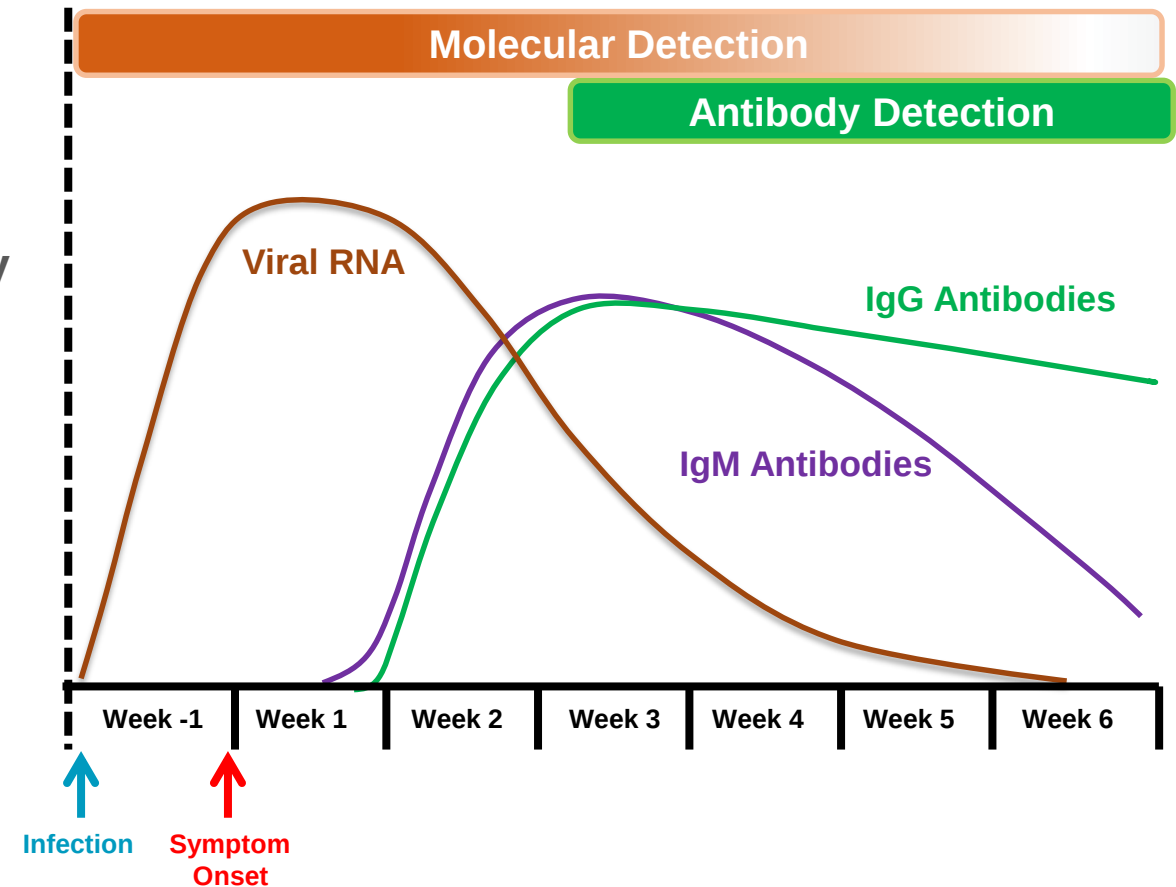
- **↓ Albumin** (50-98%)
- **↓ Hemoglobin** (41-50%)

SEROLOGICAL TESTING FOR SARS CORONA 2

- There has been **much debate regarding the current value** of serological testing in COVID-19 **diagnosis and monitoring**.
- Serologic based tests are **not currently recommended** by the **CDC, NHS or other health organizations**.
- There is general concern regarding their use in the acute phase of infection as they detect infection too late in the course of illness (usually more than 7-10 days) and they also may cross-react with serologic responses to seasonal coronaviruses.
- However, there is anticipated value in using improved serological testing in the future **for public and occupational health monitoring and assessment**

Timing of Antibody Response to SARS-CoV-2

- New virus = no pre-existing antibodies or immunity
- We are still learning about our immune response to SARS-CoV-2
 - Many develop Abs ~1-2 weeks after symptoms
 - Due to delay in seroconversion, Abs do not play a routine role in diagnosis
 - >95% of patients are Ab positive after 2 weeks
 - Some patients may not seroconvert
 - Immunostatus
 - Assay dependent?
 - Severity of illness?
 - IgM declines 5-7 weeks post onset
 - IgG remains positive for ≥ 10 weeks post onset



SEROLOGICAL TESTING FOR SARS CORONA 2

- For **serum antibody monitoring**, according to the “**Handbook of Covid-19 Prevention and Treatment**” (Zhejiang University School of Medicine)
- **Serum IgM** is detectable **10 days** after symptom onset
- **Serum IgG** is detectable **12 days** after symptom onset.
- A positive interpretation has been defined as a positive IgM, or an increased IgG titer > 4 times than that in the acute phase.

Rt-PCR is Considered the “Gold Standard”

- **98% sensitivity and 99% selectivity**
- **Requires 20 minutes to 90 minutes to run the test**
- **Turnaround: 24 hour to >7 days; very problematic**
- **Three possible results:**
 - **detected;**
 - **inconclusive**
 - **not detected**

NUCLEIC ACID TESTING (RNA SARS CORONA 2)

Upper airway specimens

Nasopharyngeal swabs

Nasal swabs

Nasopharyngeal secretions

Lower airway specimens

Sputum

Airway secretion

Bronchoalveolar lavage fluid

Other

Blood

Feces

Urine

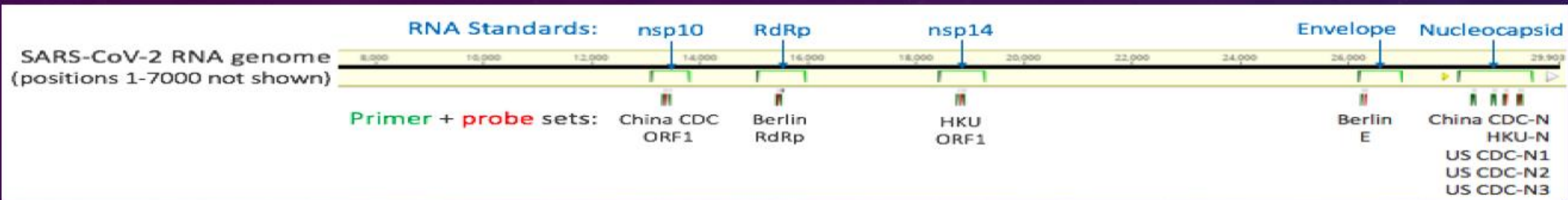
Conjunctival secretions

collected by a healthcare professional, If both NP and OP swabs both are collected, they should be combined in a single tube to maximize test sensitivity and limit testing resources

Gold standard for Diagnosis COVID-19

Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR) is the current gold standard for diagnosing suspected cases of COVID-19





Institute	Gene targets
China CDC, China	ORF1ab and N
Institut Pasteur, Paris, France	Two targets in RdRP
US CDC, USA	Two targets in N gene (previously 3)
National Institute of Infectious Diseases, Japan	Pancorona and multiple targets, Spike protein
Charité, Germany	RdRP, E, N
HKU, Hong Kong SAR	ORF1b-nsp14, N
National Institute of Health, Thailand	N

COMPARISON WHO VS. CDC METHOD FOR RTPCR SARC CORONA 2

Test	Molecular targets	Scope	Limit of blank	Reference specimens	Storage conditions
WHO					
	E gene	First-line screening	3.9 copies × reaction	Nasopharyngeal AND oropharyngeal swab or wash in ambulatory patients, lower respiratory specimens (sputum and/or endotracheal aspirate or bronchoalveolar lavage)	≤5 days: 2–8 °C
	RdRp gene	Confirmatory testing	3.6 copies × reaction		>5 days: ≤70 °C
	N gene	Additional confirmatory testing	N/A		(dry ice)
CDC					
	N1/2/3 gene	Combined assay	1.0–3.2 copies/μL	Nasopharyngeal AND oropharyngeal swabs, sputum, lower respiratory tract aspirates, bronchoalveolar lavage and nasopharyngeal wash/aspirate or nasal aspirate	≤4 days: 4 °C
	RNase P gene	Control assay	N/A		>4 days: ≤70 °C

E gene, envelop gene; N gene, nucleocapside gene; RdRp gene, RNA-dependent RNA polymerase gene; RNase P gene, human RNase P gene.

Troubleshooting and variables

**covid -19
lab tests**

**D. mehrdad vanaki
DCLS / EMBA
Trainer & consultant QMS**

WHY MIGHT COVID-19 TESTS FAIL?

They may be in the **early stage** of the disease with a **viral load that is too low to be detected**.

They may have **no major respiratory symptoms**, so there could be **little detectable virus** in the patient's throat and nose.

There may have been a **problem with sample collection**, meaning there was very little sample to test.

There may have been **poor handling and shipping** of samples and test materials.

There may have been **technical issues inherent in the test**, e.g. virus mutation.

preanalytical variables

in

covid 19

Lab tests

PREANALYTICAL

General

- Lack of identification/misidentification
- Inadequate procedures for specimen (e.g. swab) collection, handling, transport

Storage

- Collection of inappropriate or inadequate material for quality or volume
- Presence of interfering substances
- Manual (pipetting) errors

Specific

- Sample contamination
- Testing in patients receiving antiretroviral therapy

۳- جمع آوری، نگهداری و انتقال نمونه ها

نگهداری و مدیریت نمونه

۳-۸

آیا معیارهای رد یا پذیرش نمونه در آزمایشگاه وجود دارد و احتیاطات یا اقدامات لازم در صورت پذیرش نمونه های نامناسب، مشخص شده است؟

سنجه:

- معیارهای قبول یا رد نمونه ها برای آزمایشهای مختلف مشخص و مکتوب است.
- کارکنان واحد پذیرش و نمونه گیری از آن آگاهی دارند
- سوابق رد نمونه و دلایل آن ثبت و نگهداری می شود و در صورت تکرار آن، اقدامات اصلاحی انجام می گردد.

روش ارزیابی:

- بررسی فهرست موارد رد نمونه برای نمونه ها و آزمایش های مختلف
- سوال از مسئول پذیرش و مسئول نمونه گیری و ارزیابی آگاهی آنها از معیارهای رد نمونه برای آزمایش های مختلف
- بررسی سوابق مربوط به رد نمونه

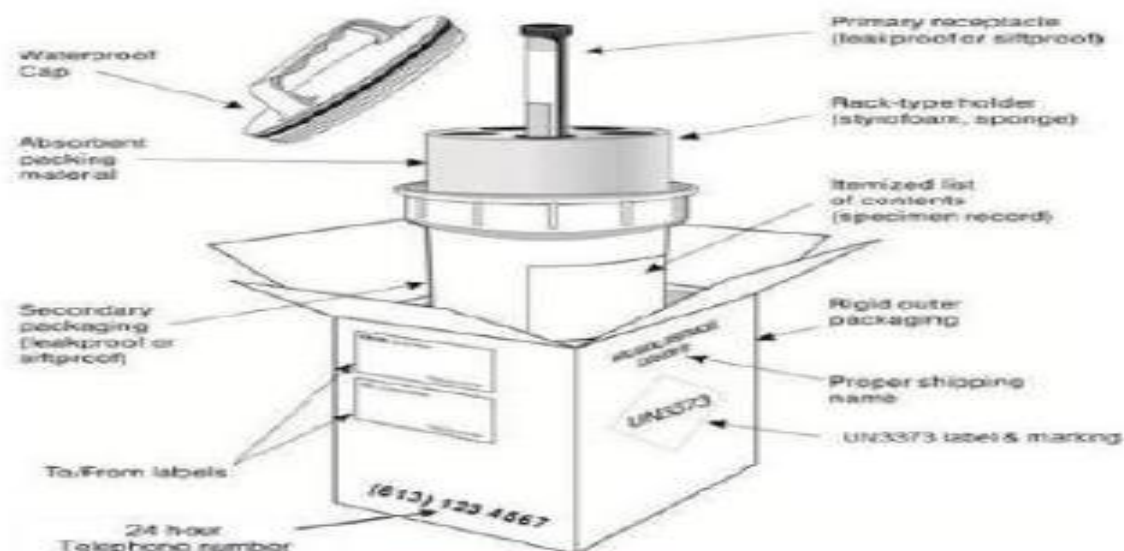
Specimen Collection and Transport Devices in molecular diagnostic tests

- in general, the anticoagulants EDTA and acid citrate dextrose (ACD) should be used because they are most compatible with molecular methods.
- **Heparin tubes should not be used for amplification methods because heparin is a potent inhibitor of polymerase enzymes.**
- **Other specimens, such as tissues, urine, body fluids, and stool, may be transported in clean containers to the laboratory.**
- **Specimens in fixatives such as alcohols or formalin should be extracted as quickly as possible after receipt by the laboratory. It can be more difficult to obtain good-quality DNA from fixed tissues**

آزمایشگاه مرجع کشوری COVID-19 دستورالعمل تهیه و ارسال نمونه محتمل به COVID-19

شماره سند: 66-LA-WI-120-00

شماره بازنگری: 00



۵-۳) در طی نمونه گیری رعایت مراحل زیر الزامی می باشد:

۵-۳-۱) استفاده از گان، دستکش لاتکس یکبار مصرف، استفاده از عینک یا شیلد و استفاده از ماسک مناسب که از ایجاد آئروسل جلوگیری می کنند؛

۵-۳-۲) هنگام نمونه گیری دقت شود تا ترشحات بیولوژیک فرد بیمار با بدن، خصوصاً چشم، مخاط و دهان و بینی فرد نمونه گیر تماس پیدا نکند؛

۵-۳-۳) پس از استفاده از سواب دقت شود سر سواب هیچگونه تماسی با بدن فرد نمونه گیر نداشته باشد و قسمت انتهایی سواب در ظرف مخصوص معدوم گردد.

۵-۳-۴) ضد عفونی کردن لوازم آلوده با ضد عفونی کننده های رایج از جمله اتانول 70٪ میباشد.

۵-۳-۵) ارسال نمونه به همراه فرم احراز هویت به آزمایشگاه مرجع کشوری COVID-19 الزامی می باشد.

۶) مستندات:

۶-۱) فرم احراز هویت بیمار

Extraction and Purification of Nucleic Acids

- Nucleic acid extraction and purification procedures can be a source of errors in diagnostic testing.
- If intact nucleic acids are not isolated, false-negative results can occur.
- In addition, the extraction and purification procedures can be a source of interfering substances if reagents such as phenol or alcohols are carried over into the final eluted material containing the target nucleic acid.

Extraction and Purification of Nucleic Acids

- Nucleic acid preparation methods are a critical component of molecular testing because for most assays, high-quality DNA or RNA is critical to assay performance; maintained (especially important for RNA assays), and inhibitory substances must be eliminated
- The quality of purified DNA and RNA, as well as the concentration and purity, affect results of hybridization, amplification, and detection methods. The target nucleic acid must be intact, in a sufficient concentration to be detected by the assay, and be free of inhibitory substances.

Inhibition in Amplification Assays

- Inhibition of amplification reactions is a well recognized phenomenon in the diagnostic.
- Many substances from a variety of sources can inhibit PCR reactions. Inhibitors can be present in the clinical specimen (e.g., hemoglobin and.....) **Hemoglobin is a potent inhibitor of PCR amplification and a well-characterized inhibitor of the Taq polymerase**
- **Inhibitors are especially problematic in quantitative assays because they may cause aberrant results (inaccurate quantitation) or they may inhibit amplification altogether**

Mechanisms by which Inhibitors Function

- There are several mechanisms by which inhibitors function, usually targeting the enzymes involved in amplification or interfering with binding of the enzyme to the target nucleic acid:
- **1. Blocking active site of enzymes:** Some substances block active sites of enzymes used in amplification reactions. Heme compounds from blood function to inhibit Taq polymerase in this manner.
- **2. Inactivating enzymes:** Inhibitors can also act by denaturing or degrading the enzymes used in amplification (e.g., if proteinases are present in the sample).
- **3. Binding target nucleic acids,** preventing the target from being accessible to primers or enzymes.
- **4. Binding divalent cations:** Inhibition can occur when divalent cations (Mg^{2+}) necessary as co-factors for polymerase enzymes are bound by EDTA.

TABLE 21.1 Common PCR Inhibitors

General Source	Inhibitory Substance
Specimens	Blood—hemoglobin, IgG, lactoferrin Blood—DNA binding proteins Muscles—myoglobin Sputum ^a Stool ^a —bile salts, complex polysaccharides Tissues—melanin Urine ^a —urea
Specimen collection tubes	EDTA Heparin
Nucleic acid extraction	Detergents (Sarkosyl, SDS) Proteinases Protein disrupting agents Guanidinium salts Phenol Alcohols

^aFor many complex clinical specimens, inhibitors have not been well-characterized.

منابع خطا در تهیه و ساخت محیط انتقال ویروس VTM

محیط انتقال ویروس محیطی مایع و مناسب است تا سواب های که بوسیله آنها نمونه گیری انجام شده درون آن قرار گیرد. این محیط قادر به حفظ نمونه تا زمان انجام واکنش های مرحله آنالیز می باشد. بدیهی است که ساخت و آماده سازی آن می بایست بوسیله مواد مناسب و فرمولاسیون درست و پیشنهاد شده توسط منابع معتبر انجام شود.

همچنین درون فالكون كه سواب ها درونش قرار می گیرد باید حجم مناسب باشد (حدود 2 میلی لیتر).

استفاده از حجم های بیشتر وی تی ام موجب رقیق شدن نمونه ویروسی و یا حتی از دست دادن تشخیص غلظت های پائین ویروس در واکنش باشد.

انتخاب تیوب یا لوله فالكون مناسب كه قابل استریل كردن باشد و بتوان محیط انتقال ویروس را در آن نگهداری كرد.

جنس تیوب مورد استفاده باید مناسب باشد. بطوری كه درون اتوكلاو تغییر شكل ندهد و با مواد موجود در وی تی ام واکنش ندهد.

منابع خطا در نمونه گیری تست کرونا



خطا : آلوده شدن محیط VTM نگهداری و ترانسپورت ویروس کرونا

علت ریشه ای : عدم رعایت شرایط استریل در ساخت و آماده سازی محیط

اقدام اصلاحی : استفاده از هود مناسب، گان ، دستکش، ماسک و وسایل بهداشتی و استریل و آماده سازی محیط ها در اتاق ایزوله

خطا : آلوده شدن محیط VTM در حین نمونه گیری

علت ریشه ای : یاز گذاشتن درب محیط در حین نمونه گیری، عدم رعایت اصول بهداشتی و تعویض نشدن دستکش ها، تهویه نامناسب

اقدام اصلاحی : افزایش دقت پرسنلی و استفاده از فضا با تهویه ی دوسویه

خطا: خطا در لیبلینگ نمونه های کووید

علت ریشه ای : خطای پرسنلی

اقدام اصلاحی : افزایش دقت پرسنلی

خطا : آلودگی پرسنلی و نمونه های کووید

علت ریشه ای : نمونه های عفونی ممکن است در حین انتقال موجب آلودگی نمونه های دیگر و خود پرسنل شوند.

اقدام اصلاحی : انتقال نمونه های بخش عفونی در ظرف های درب دار برای جلوگیری از انتقال آلودگی

۵-۱) به منظور قرارگیری نمونه ها در محل ذخایر باتکی آزمایشگاه و جلوگیری از فریز-دفریز شدن چند باره، پس از دریافت نمونه ها از بخش پذیرش، به منظور انجام تست درخواستی، نمونه ها حداکثر تا یک روز در 4°C نگهداری و بلافاصله پس از انجام آزمایش، به بانک 80°C - بدون محدودیت زمانی منتقل و نگهداری می شود.

۵-۲) نگهداری نمونه های ارسالی بیماران مشکوک به COVID-19 پس از انجام آزمایش:

ردیف	نوع سوابق	محل نگهداری	مدت نگهداری	سطح دسترسی
۱	محیط انتقال ویروس (سواب حلق، بینی، خلط، غرغره)	فریزر 80°C -	بدون محدودیت زمانی	مسئول پذیرش، مسئول آزمایشات، مسئول کنترل کیفی، مسئول آزمایشگاه، مسئول بانک نمونه ها
۲	نمونه های مربوط به طرح های تحقیقاتی	فریزر 80°C -	بدون محدودیت زمانی	

۵-۲) نگهداری DNA و RNA های استخراج شده پس از انجام آزمایش:

ردیف	نوع سوابق	محل نگهداری	مدت نگهداری	سطح دسترسی
۱	DNA یا RNA استخراج شده	فریزر 20°C -	بدون محدودیت زمانی	مسئول آزمایشات، کارشناسان مولکولی

۶) مستندات: این سند فاقد مستندات می باشد.

Analytical variables

in

covid 19

Lab tests

POTENTIAL PREANALYTICAL AND ANALYTICAL VULNERABILITIES IN THE LABORATORY DIAGNOSIS OF CORONAVIRUS DISEASE 2019 (COVID-19) USING (REAL TIME) RT-PCR.

Testing carried out
outside of the
diagnostic window

Active viral
recombination

Use of non-
adequately
validated assays

Lack of
harmonization of
primers and
probes

Instrument
malfunctioning

Insufficient or
inadequate
material

Non-specific PCR
annealing

Misinterpretation
of expression
profiles

۲- مستندات

روش های کنترل کیفیت

۲-۷

آیا دستورالعملها و روش های اجرایی مشخصی برای صحه گذاری و تصدیق روش ها و تجهیزات مربوطه وجود دارد ؟

سنجه:

- روش های آزمایش با کیت های تجاری که قبلاً توسط تولید کننده صحه گذاری (Validate) شده و ویژگی های عملکردی آن تعیین گردیده است، قبل از استفاده در آزمایشگاه تصدیق می شوند. توضیح: مشروط به اینکه بدون هیچ گونه تغییر یا تعدیلی مورد استفاده قرار گیرند.

برای انتخاب روش انجام هرآزمایش، ویژگی های عملکردی مورد نیاز پزشکان و کاربرد مورد نظر آن آزمایش برای بیماران مد نظر قرار می گیرد

در موارد مقتضی روش انجام آزمایش در آزمایشگاه صحه گذاری می شود. (مثلا در صورت طراحی و راه اندازی روش آزمایش توسط خود آزمایشگاه و یا استفاده از روش های تجاری صحه گذاری شده در صورتیکه آزمایشگاه تغییری در آنها اعمال کرده باشد و غیره)

روش ارزیابی:

- مصاحبه با مسئول فنی، گروه مدیریتی و کارکنان مرتبط در مورد نحوه صحه گذاری روش های آزمایش، و بررسی پروتکل های مورد استفاده برای صحه گذاری

- بررسی سوابق انجام صحه گذاری چند مورد از روش های انجام آزمایش (که باید صحه گذاری شوند)

Verification Requirements

CAP treats EUA assays similar to FDA cleared assays

Test Method Verification (COM.40300/COM.40325)

- **Analytical Interferences**
- **Precision**
- **Reportable Range**
- **Accuracy**

Precision

- **Closeness of agreement between independent test measures**
 - “Reproducibility/repeatability”
- **Typical sources of imprecision include differences in timing, temperature, mixing, pipetting, etc.**

Two aspects should be tested

- **Intra-assay precision**
 - Measurements collected under very similar conditions (i.e. same run)
- **Inter-assay precision**
 - Measurements collected under very different conditions (i.e. different operators, different instruments, different days, etc.)

Ideal to test concentrations at or near the level of detection

Accuracy

- **Extent to which a particular test is in agreement with a reference method or comparator**
 - “Trueness”
- **Ideal “comparator”: Specimens from patients with known COVID-19 infection (established through molecular testing)**
 - With the increasing prevalence of COVID-19 infections, most laboratories should be able to obtain these
- **Secondary “comparator”: Specimens with known positive and negative antibody status tested using another validated/verified antibody test**

Determination of Accuracy

- Qualitative test data typically analyzed in a 2x2 table

Specimen type	Reference Method		
		Positive	Negative
Method being evaluated	Positive	True positives	False positives
	Negative	False negatives	True negatives

Sensitivity: $TP / (TP + FN) \times 100$

Specificity: $TN / (TN + FP) \times 100$

Set goals for each prior to experiments (typically 95%)

Laboratory Determines:

-Reference method

-How many positive and negative samples to include

-Thresholds for acceptable sensitivity and specificity

مواردی که موجب عدم نتیجه گیری و رد تست ها می شود

1- آماده سازی نادرست محلول های کیت استخراج و

2- معیوب بودن کیت استخراج و پی سی ار

3- عدم رعایت مقادیر محلول های کیت استخراج

مواردی که موجب آلودگی تست ها و نتایج می شود

هفتگی یا دو هفته یکبار کلیه تجهیزات کلیدی بخش ملکولی بایستی الودگی زدایی و ضد عفونی شود / رک و سمپلر ها اتوکلاو شوند / ورک استیشن با لامپ یو وی و بلیچ و و الکل ضد عفونی و گندزدایی شود / سیفتی باکس ها تا یک سوم ظرفیت حاوی وایتکس رقیق شده باشند

عدم اتوکلاو دوره ای تمامی تجهیزات مصرفی در فرایند استخراج و پی سی ار

عدم رعایت بهداشت و عدم استفاده از لباس های مخصوص و دستکش های مخصوص

مرحله استخراج یکی از مراحل مهم در آلوده شدن نمونه هاست

امکان دریافت نتایج مثبت و یا حتی منفی کاذب در این مرحله بسیار بالاست. لذا باید با دقت تمامی تمهیدات لازم را برای از بین بردن منابع خطا در این مرحله بکار برد.

همیشه بعد از اتمام کار روزانه و قبل از شروع کار هر روز باید کف زمین و سطوح میزها و همچنین سطح کار زیر لامینار ایرفلو را باید چند بار بدقت بوسیله محلول های مناسب ضد عفونی کننده و نیز الکل 75 درجه تمیز کرد و سپس تحت تاثیر تابش اشعه یو وی قرار داد این اشعه در برخورد مستقیم با ایجاد صدمه در ساختارهای غشائی میکرو ارگانیسم ها و نیز ایجاد دایمر تیمین در اسیدهای نوکلئیک آنها موجب تخریب ساختار آنها و استریل کردن شود و سطوحی که تحت برخورد مستقیم یو وی قرار نمی گیرند بوسیله مولکولهای گاز ازونی که تولید می کند استریل میشوند (در اثر برخورد به مولکول موجب شکستن اکسیژن به دو رادیکال آزاد اکسیژن میگردد و این رادیکالها با برخورد به اکسیژن مولکولهای اکسیژن دیگر گاز اوزون را تولید می کند که با غلظت مناسب خاصیت میکروب زدائی دارد. در ادامه فرایند استریل کردن باید با دقت سمپلرها و کلیه وسایل مورد استفاده را نیز بوسیله محلولهای ضد عفونی کننده و قرار دادن تحت تابش یو وی استریل کرد و از سرسمپلرهای فیلتردار در تمام مراحل کار استفاده نمود.

مواردی که در شرایط رد شدن نمونه ها با آن مواجه می شویم

در وهله اول تکرار مرحله پی سی ار و بعد تکرار فرایند استخراج و در صورت عدم نتیجه گیری تکرار از مرحله نمونه گیری

۴- انجام آزمایش و کنترل کیفیت

۴-۵

آیا معیارها و اندیکاسیون های مربوط به تکرار آزمایش و یا تایید نتایج آزمایش، تعیین شده و موجود است؟

سنجه:

- دستورالعمل مدون در آزمایشگاه موجود باشد.
- کارکنان ذیربط تسلط به نحوه تفسیر نتایج و در صورت لزوم تکرار آزمایش داشته باشند

روش ارزیابی:

- چند مورد گزارش تایید شده و موارد تکرار آزمایش بر اساس دستورالعمل و اقدامات اصلاحی و پیشگیرانه موجود باشد.
- مصاحبه با کارکنان ذیربط و بررسی تسلط به نحوه تفسیر نتایج و در صورت لزوم تکرار آزمایش داشته باشند

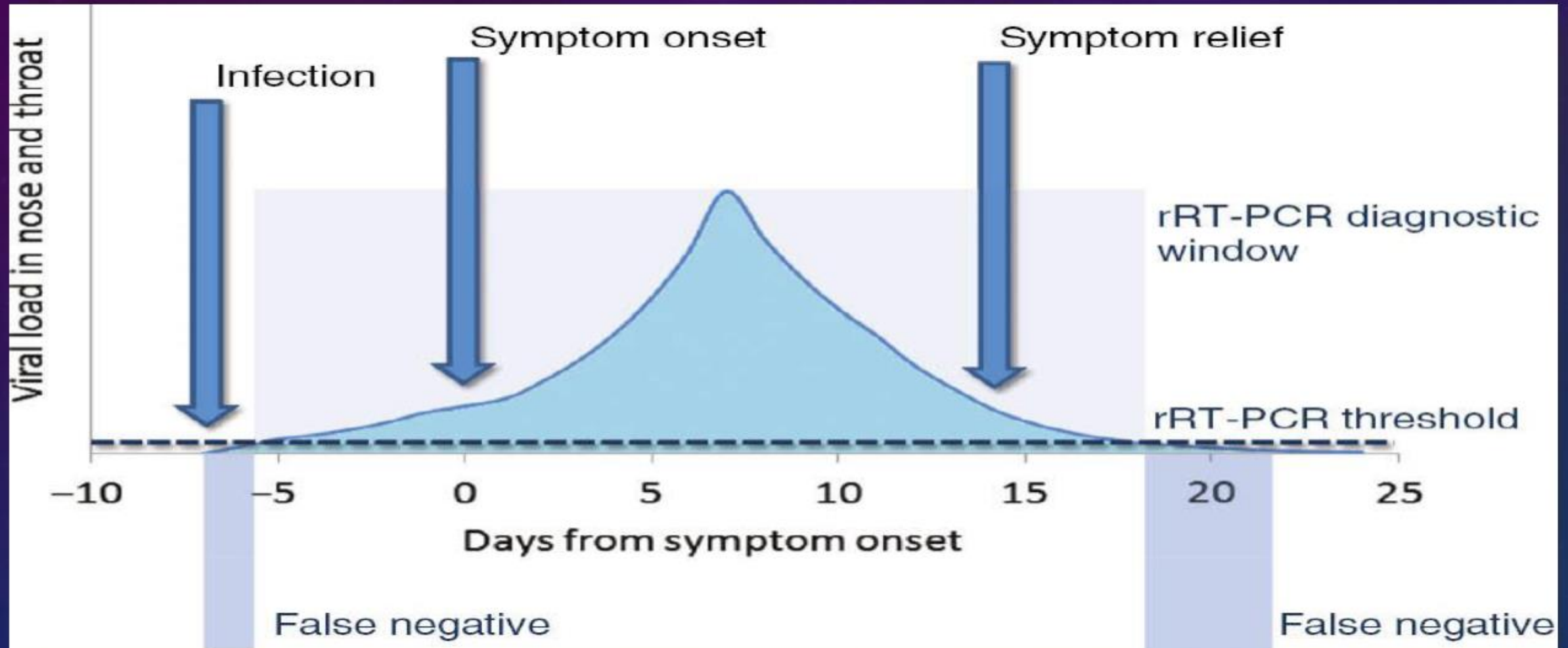
Troubleshooting Real time PCR curve & CT PCR - covid 19

D. mehrdad vanaki

DCLS / EMBA

Trainer & consultant QMS

CORRESPONDENCE BETWEEN DEVELOPMENT OF VIRAL LOAD DURING SARS-COV-2 INFECTION, CLINICAL COURSE AND POSITIVITY OF RRT-PCR ASSAYS



دو ژن ویروسی تکثیر نشود

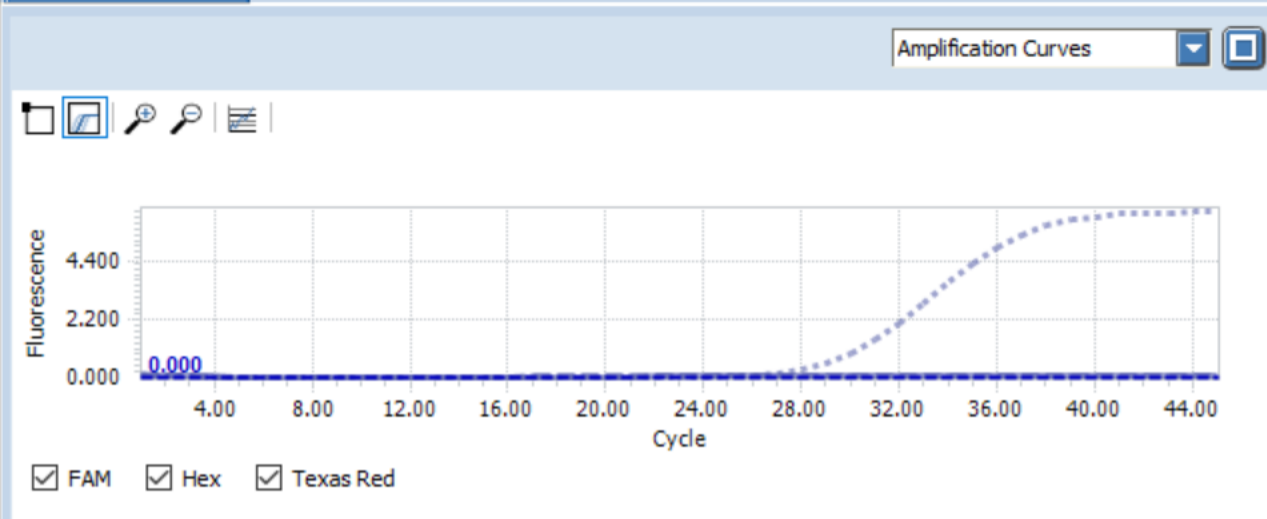
و اینترنال کنترل مثبت و در ناحیه مورد انتظار
تکثیر شود

نتیجه این واکنش پی سی ار کووید منفی است



Run Editor Sample Editor Raw Data Analysis

Qualitative Detection



Combined Call Heat Map

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												

☒ FAM
 ☐ Hex
 ☐ Texas Red

Positive
 Negative
 Invalid
 Inconsistent
 N/A

Heat Map

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C												
D												
E												
F												
G												
H												

☒ FAM
 ☐ Hex
 ☐ Texas Red

☒ Call
 ☐ Cq
 ☐ EPF
 ☐ Flag

Positive
 Negative
 Invalid
 N/A

Result Table

	Color	Position	Sample Name	Gene Name	Gene Type	Cq	Call	Combined Result
		G1	115800	RDRP	N/A	-	Negative	
		G1	115800	N GENE	N/A	-	Negative	
		G1	115800	IC	N/A	25.64	Positive	
		G2	115810	RDRP	N/A	25.95	Positive	
		G2	115810	N GENE	N/A	24.00	Positive	
		G2	115810	IC	N/A	25.27	Positive	
		G3	115851	RDRP	N/A	-	Negative	
		G3	115851	N GENE	N/A	-	Negative	
		G3	115851	IC	N/A	-	Negative	

Corona test pishtas teb 99-08-12 002

دو ژن ویروسی در ناحیه ی سایکل تایم مورد انتظار
برای مثبت بودن و اینترنال کنترل در محدوده مناسب
تکثیر شود

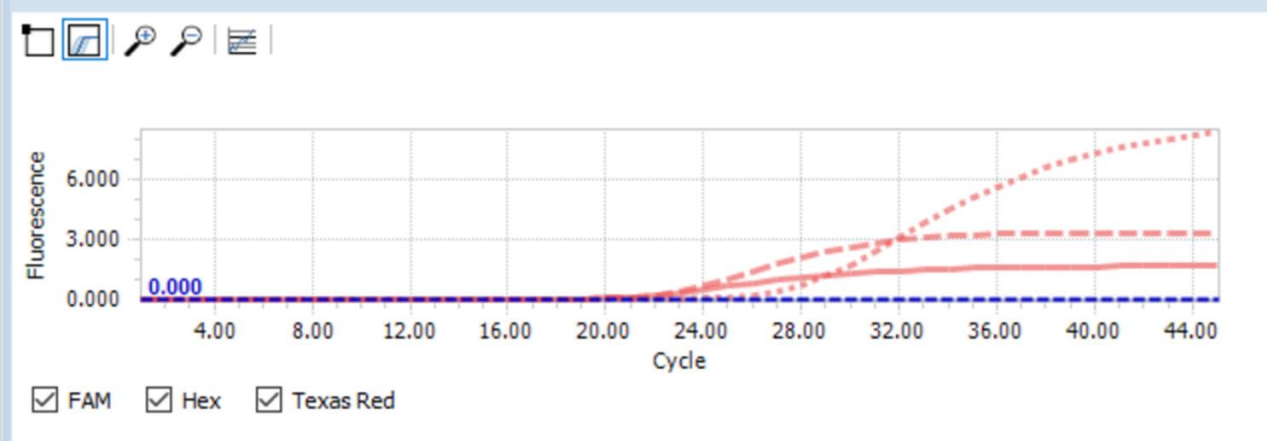
نتیجه این واکنش پی سی ار کووید مثبت می باشد



Run Editor Sample Editor Raw Data Analysis

Qualitative Detection

Amplification Curves



Combined Call Heat Map

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A														
B														
C														
D														
E														
F														

☒ FAM ☐ Hex ☐ Texas Red

Positive
Negative
Invalid
Inconsistent
N/A

Heat Map

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A														
B														
C														
D														
E														
F														

☒ FAM ☐ Hex ☐ Texas Red

☒ Call ☐ Cq ☐ EPF ☐ Flag

Positive
Negative
Invalid
N/A

Result Table

*	Color	Position	Sample Name	Gene Name	Gene Type	Cq	Call	Combined Result
		C1	115747	RDRP	N/A	19.76	Positive	
		C1	115747	N GENE	N/A	20.08	Positive	
		C1	115747	IC	N/A	23.73	Positive	
		C2	115769	RDRP	N/A	-	Negative	
		C2	115769	N GENE	N/A	-	Negative	
		C2	115769	IC	N/A	26.38	Positive	
		C3	115778	RDRP	N/A	-	Negative	
		C3	115778	N GENE	N/A	-	Negative	
		C3	115778	IC	N/A	26.66	Positive	

Corona test pishtas teb 99-08-12 001

هر دو ژن ویروسی در ناحیه ای نزدیک به CT
استانه مثبت بودن تکثیر شود

و

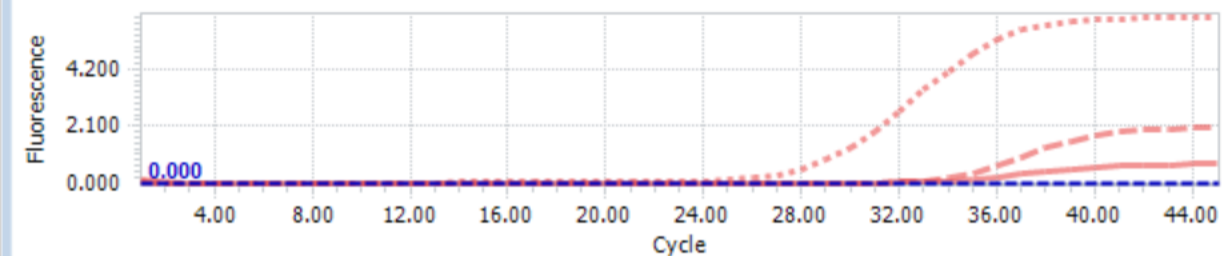
اینترنال کنترل در CT مورد انتظار تکثیر شود.
با در نظر گرفتن سابقه مراجعه کننده واکنش پی سی
ار کووید مثبت است



Run Editor Sample Editor Raw Data Analysis

Qualitative Detection

Amplification Curves



☒ FAM ☒ Hex ☒ Texas Red

Combined Call Heat Map

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												

☒ Positive
☒ Negative
☒ Invalid
☒ Inconsistent
☒ N/A

☒ FAM ☐ Hex ☐ Texas Red

Heat Map

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C												
D												
E												
F												
G												
H												

☒ Positive
☒ Negative
☒ Invalid
☒ N/A

☒ FAM ☐ Hex ☐ Texas Red

☒ Call ☐ Cq ☐ EPF ☐ Flag

Result Table

*	Color	Position	Sample Name	Gene Name	Gene Type	Cq	Call	Combined Result
		C1	115062	rdrp	N/A	33.43	Positive	
		C1	115062	n gene	N/A	32.69	Positive	
		C1	115062	IC	N/A	23.20	Positive	
		C2	115136	rdrp	N/A	-	Negative	
		C2	115136	n gene	N/A	34.38	Positive	
		C2	115136	IC	N/A	19.35	Positive	
		C3	115144-R	rdrp	N/A	32.58	Positive	
		C3	115144-R	n gene	N/A	32.24	Positive	
		C3	115144-R	IC	N/A	20.76	Positive	

Corona test pishtas teb 99-08-06 001

مواردی که در آن تنها یک ژن (از دو ژن) و
اینترنال کنترل تکثیر می شود

در صورت داشتن تایم بهتر است استخراج و پی
سی ار تکرار شود و در صورت تایید همان نتیجه
قبلی

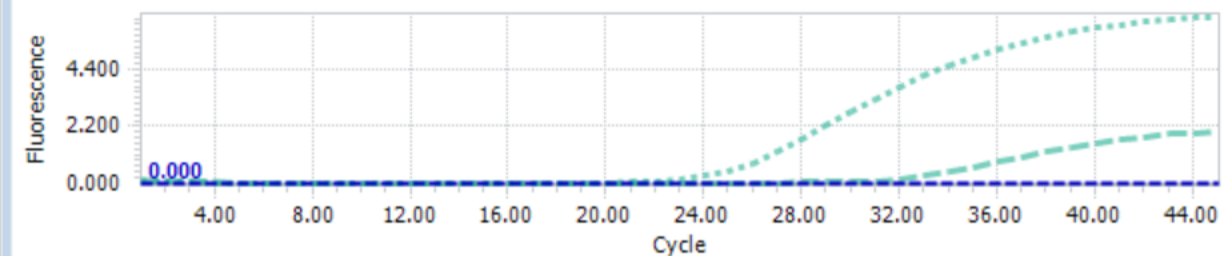
نتیجه واکنش پی سی ار کووید مثبت است



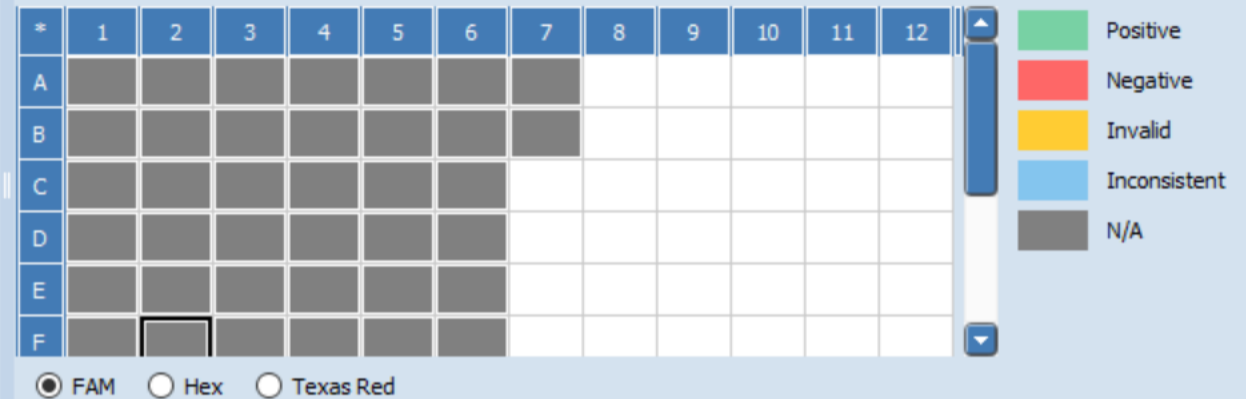
Run Editor Sample Editor Raw Data Analysis

Qualitative Detection

Amplification Curves



Combined Call Heat Map



Heat Map



Result Table

Sample Name	Gene Name	Gene Type	Cq	Call	Combined Result	Failure	Excluded
39-R	rdrp	N/A	-	Negative	N/A	None	
39-R	n gene	N/A	30.05	Positive	N/A	None	
39-R	IC	N/A	21.69	Positive	N/A	None	
47	rdrp	N/A	29.79	Positive	N/A	None	
47	n gene	N/A	28.85	Positive	N/A	None	
47	IC	N/A	25.35	Positive	N/A	None	
57	rdrp	N/A	-	Negative	N/A	None	
57	n gene	N/A	21.42	Positive	N/A	None	
57	IC	N/A	24.03	Positive	N/A	None	

Corona test pishtas teb 99-08-06 001

► مثال 1: اگر در منحنی Real time مقادیر CT دو ژن ویروسی و اینترنال کنترل به قرار زیر باشد تفسیر منحنی مزبور چگونه است؟

► $RdRP = 34.21$

► $N\ Gene = 33.87$

► $IC = 35.89$

► بخاطر بالا بودن سایکل تایم اینترنال کنترل اگر نمونه گیری صحیح انجام شده باشد واکنش استخراج کارایی لازم را نداشته و باید واکنش از استخراج تکرار کرد و اگر بعد از تکرار نتیجه مشابه بدست آمد باید نمونه گیری را تکرار کرد.

نتایج با Internal control ضعیف:

۱. تکرار فرایند استخراج در صورت عدم نتیجه گیری استخراج با حجم بیشتر
۲. رسوب نمونه اولیه با سانتیفریوژ و استفاده از رسوب نمونه در فرایند استخراج
۳. تغییر مقادیر RNA مصرفی در حین فرایند PCR (افزایش و کاهش مقدار RNA با توجه به غلظت آن)

نتایج به صورت مثبت ضعیف:

ابتدا تکرار تست در صورت تکرار نتایج مثبت ضعیف بعد از مرحله استخراج و PCR مجدد بهتر است ۲ روز بعد مجددا نمونه گیری انجام شود چون ممکن است در مراحل ابتدایی و یا انتهایی بیماری باشیم.

نتایج به صورت منفی کاذب:

در صورت داشتن علائم و منفی بودن نتیجه تست بهتر است دو روز بعد نمونه گیری مجدد انجام شود.

نتایج تست مثبت بدون Internal control:

Cause: مقادیر بالای ویروس در نمونه بیمار که مانع تکثیر ژن Internal control می شود.

Troubleshooting: کاهش غلظت RNA و یا نمونه بیمار در فرایند PCR و استخراج

آنالیز نتایج با فلورسنت پایین:

در این موارد لازم است در ابتدا تکرار تست از مرحله استخراج و PCR (تغییر غلظت RNA) انجام شود و در

صورت عدم نتیجه گیری تکرار از مرحله نمونه گیری

تنها یک ژن ویروسی (از دو ژن) با CT
مناسب تکثیر شود و

اینترنال کنترل هم تکثیر نشود

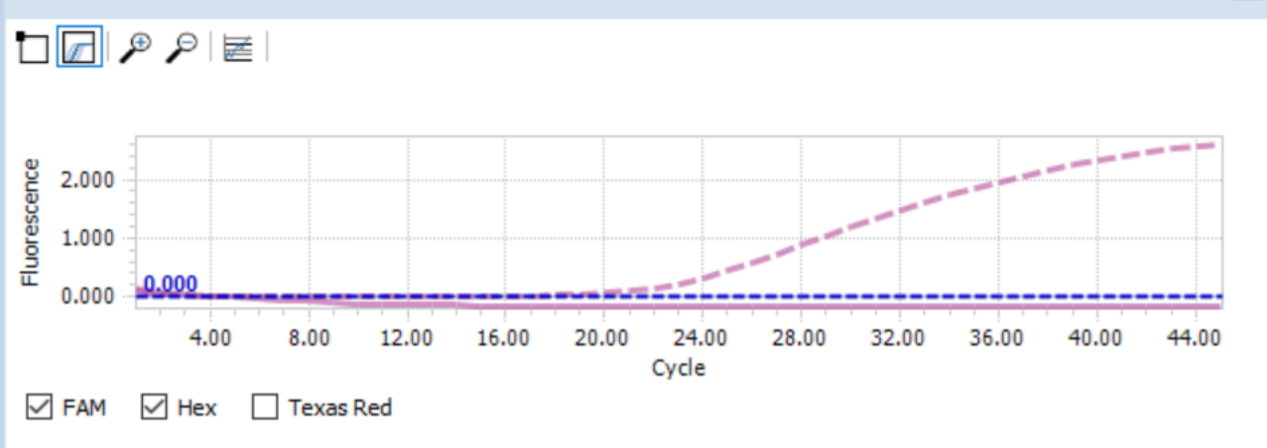
چون در واکنش مثبت نیازی به تکثیر اینترنال
کنترل نمی باشد. تکثیر یک ژن ویروسی با
سایکل تایم مناسب نشان دهنده مثبت بودن
واکنش است.



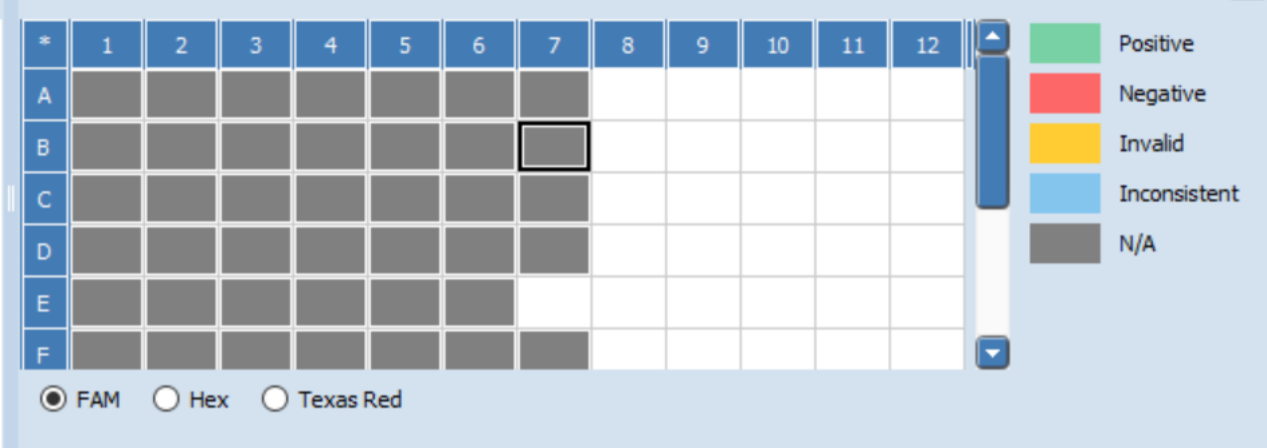
Run Editor Sample Editor Raw Data Analysis

Qualitative Detection

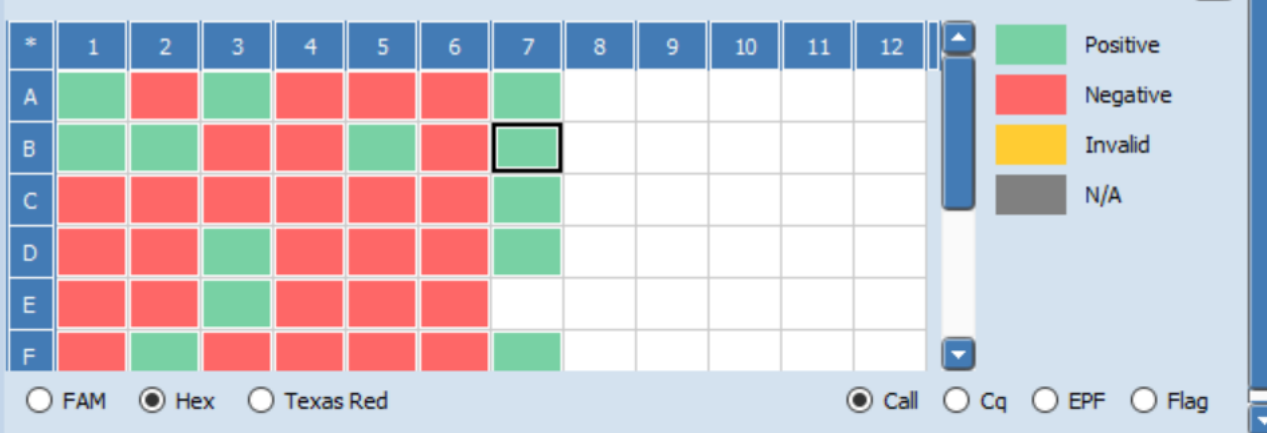
Amplification Curves



Combined Call Heat Map



Heat Map



Result Table

	Color	Position	Sample Name	Gene Name	Gene Type	Cq	Call	Combined Result
		B7	115311	RDRP	N/A	-	Negative	
		B7	115311	N GENE	N/A	19.56	Positive	
		B7	115311	IC	N/A	-	Negative	
		C1	115217	RDRP	N/A	-	Negative	
		C1	115217	N GENE	N/A	-	Negative	
		C1	115217	IC	N/A	24.12	Positive	
		C2	115232	RDRP	N/A	-	Negative	
		C2	115232	N GENE	N/A	-	Negative	
		C2	115232	IC	N/A	27.34	Positive	

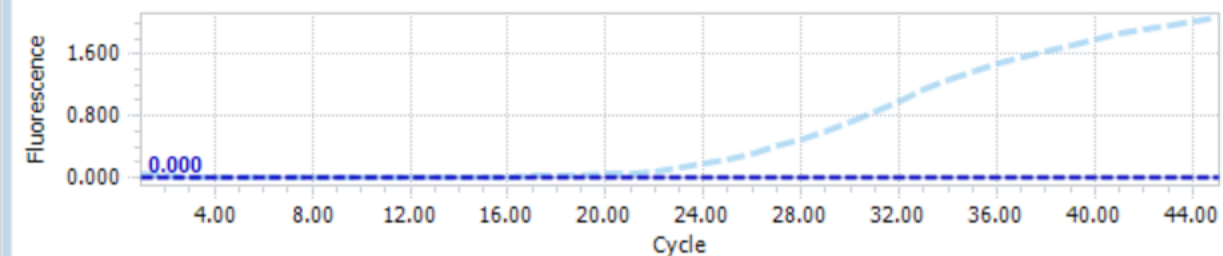
Corona test pishtas teb 99-08-07 001



Run Editor Sample Editor Raw Data Analysis

Qualitative Detection

Amplification Curves



☐ FAM ☒ Hex ☐ Texas Red

Combined Call Heat Map

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												

Positive
Negative
Invalid
Inconsistent
N/A

☒ FAM ☐ Hex ☐ Texas Red

Heat Map

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D												
E												
F												
G												
H												

Positive
Negative
Invalid
N/A

☒ FAM ☐ Hex ☐ Texas Red

☒ Call ☐ Cq ☐ EPF ☐ Flag

Result Table

*	Color	Position	Sample Name	Gene Name	Gene Type	Cq	Call	Combined Result
		F6	116058	RDRP	N/A	-	Negative	
		F6	116058	N GENE	N/A	20.09	Positive	
		F6	116058	IC	N/A	-	Negative	
		G1	115994	RDRP	N/A	-	Negative	
		G1	115994	N GENE	N/A	-	Negative	
		G1	115994	IC	N/A	23.41	Positive	
		G2	116003	RDRP	N/A	-	Negative	
		G2	116003	N GENE	N/A	-	Negative	
		G2	116003	IC	N/A	-	Negative	

Persian
Persian keyboard
To switch input methods, press
Windows key+Space.

Corona test pishtas teb 99-08-15 001

اگر اینترنال کنترل در محدوده مناسب تکثیر شود

و

یکی از ژن های ویروسی با سایکل تایم بالا تکثیر شود
با توجه به سابقه مراجعه کننده باید تست تکرار شود
نتیجه مشابه نشان دهنده مثبت بودن ویروس با
غلظت پائین (وایرال لود پایین)

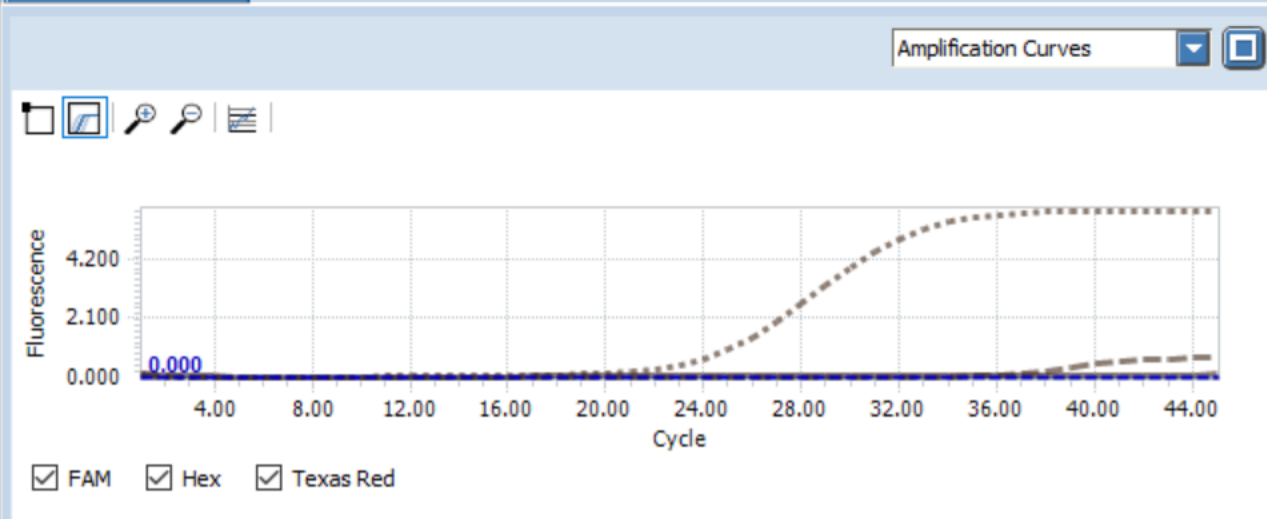
و

منفی بودن نشان دهنده نتیجه مثبت کاذب پی سی ار در مرحله قبل می باشد.



Run Editor Sample Editor Raw Data Analysis

Qualitative Detection



Combined Call Heat Map

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												

☒ FAM ☐ Hex ☐ Texas Red

Positive
 Negative
 Invalid
 Inconsistent
 N/A

Heat Map

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												

☐ FAM ☒ Hex ☐ Texas Red

☒ Call ☐ Cq ☐ EPF ☐ Flag

Positive
 Negative
 Invalid
 N/A

Result Table

	Color	Position	Sample Name	Gene Name	Gene Type	Cq	Call	Combined Result
		B1	115082	RDRP	N/A	-	Negative	
		B1	115082	N GENE	N/A	36.09	Positive	
		B1	115082	IC	N/A	18.09	Positive	
		B2	115090	RDRP	N/A	-	Negative	
		B2	115090	N GENE	N/A	36.41	Positive	
		B2	115090	IC	N/A	25.77	Positive	
		B3	115098	RDRP	N/A	-	Negative	
		B3	115098	N GENE	N/A	-	Negative	
		B3	115098	IC	N/A	24.81	Positive	

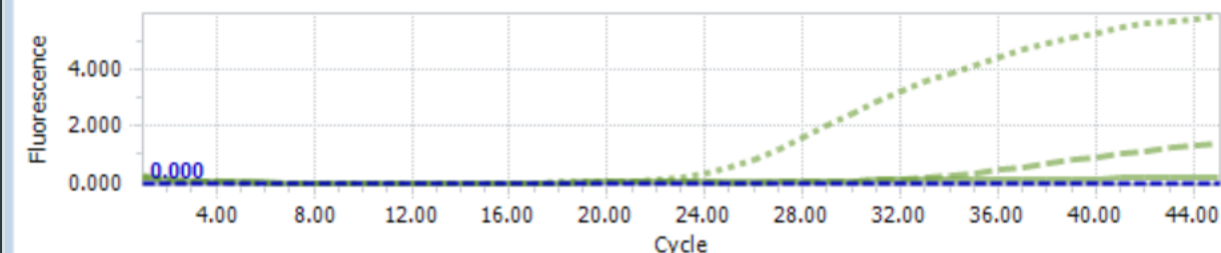
Corona test pishtas teb 99-08-06 002



Run Editor Sample Editor Raw Data Analysis

Qualitative Detection

Amplification Curves



☒ FAM ☒ Hex ☒ Texas Red

Combined Call Heat Map

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												

☒ Positive
☒ Negative
☒ Invalid
☒ Inconsistent
☒ N/A

☒ FAM ☐ Hex ☐ Texas Red

Heat Map

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												

☒ Positive
☒ Negative
☒ Invalid
☒ N/A

☐ FAM ☒ Hex ☐ Texas Red

☒ Call ☐ Cq ☐ EPF ☐ Flag

Result Table

*	Color	Position	Sample Name	Gene Name	Gene Type	Cq	Call	Combined Result
		C7	115273-R	RDRP	N/A	-	Negative	
		C7	115273-R	N GENE	N/A	30.05	Positive	
		C7	115273-R	IC	N/A	20.80	Positive	
		D1	115218	RDRP	N/A	-	Negative	
		D1	115218	N GENE	N/A	-	Negative	
		D1	115218	IC	N/A	24.81	Positive	
		D2	115233	RDRP	N/A	-	Negative	
		D2	115233	N GENE	N/A	-	Negative	
		D2	115233	IC	N/A	23.08	Positive	

Corona test pishtas teb 99-08-07 001

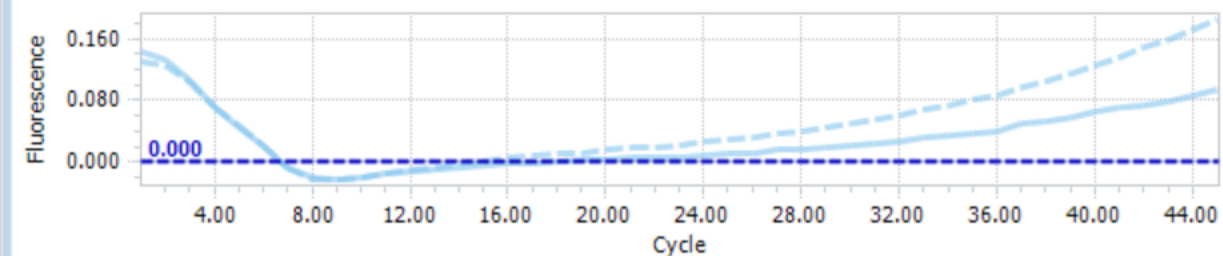
اگر دو ژن ویروسی و اینترنال کنترل
تکثیر نشود. کل واکنش **invalid** بوده
و باید با تغییر غلظت اسید نوکلئیک
تست استخراج تکرار شود



Run Editor Sample Editor Raw Data Analysis

Qualitative Detection

Amplification Curves



☒ FAM ☒ Hex ☐ Texas Red

Combined Call Heat Map

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												

☒ Positive
☐ Negative
☐ Invalid
☐ Inconsistent
☐ N/A

☒ FAM ☐ Hex ☐ Texas Red

Heat Map

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												

☒ Positive
☐ Negative
☐ Invalid
☐ N/A

☐ FAM ☐ Hex ☒ Texas Red

☒ Call ☐ Cq ☐ EPF ☐ Flag

Result Table

*	Color	Position	Sample Name	Gene Name	Gene Type	Cq	Call	Combined Result
		C3	115923	rdrp	N/A	-	Negative	
		C3	115923	N GENE	N/A	-	Negative	
		C3	115923	IC	N/A	-	Negative	
		C4	115931	rdrp	N/A	-	Negative	
		C4	115931	N GENE	N/A	31.81	Positive	
		C4	115931	IC	N/A	20.96	Positive	
		C5	115939	rdrp	N/A	-	Negative	
		C5	115939	N GENE	N/A	-	Negative	
		C5	115939	IC	N/A	21.68	Positive	

Corona test pishtas teb 99-08-14 001

با سپاس و تشکر

از توجه شما