In the name of Allah

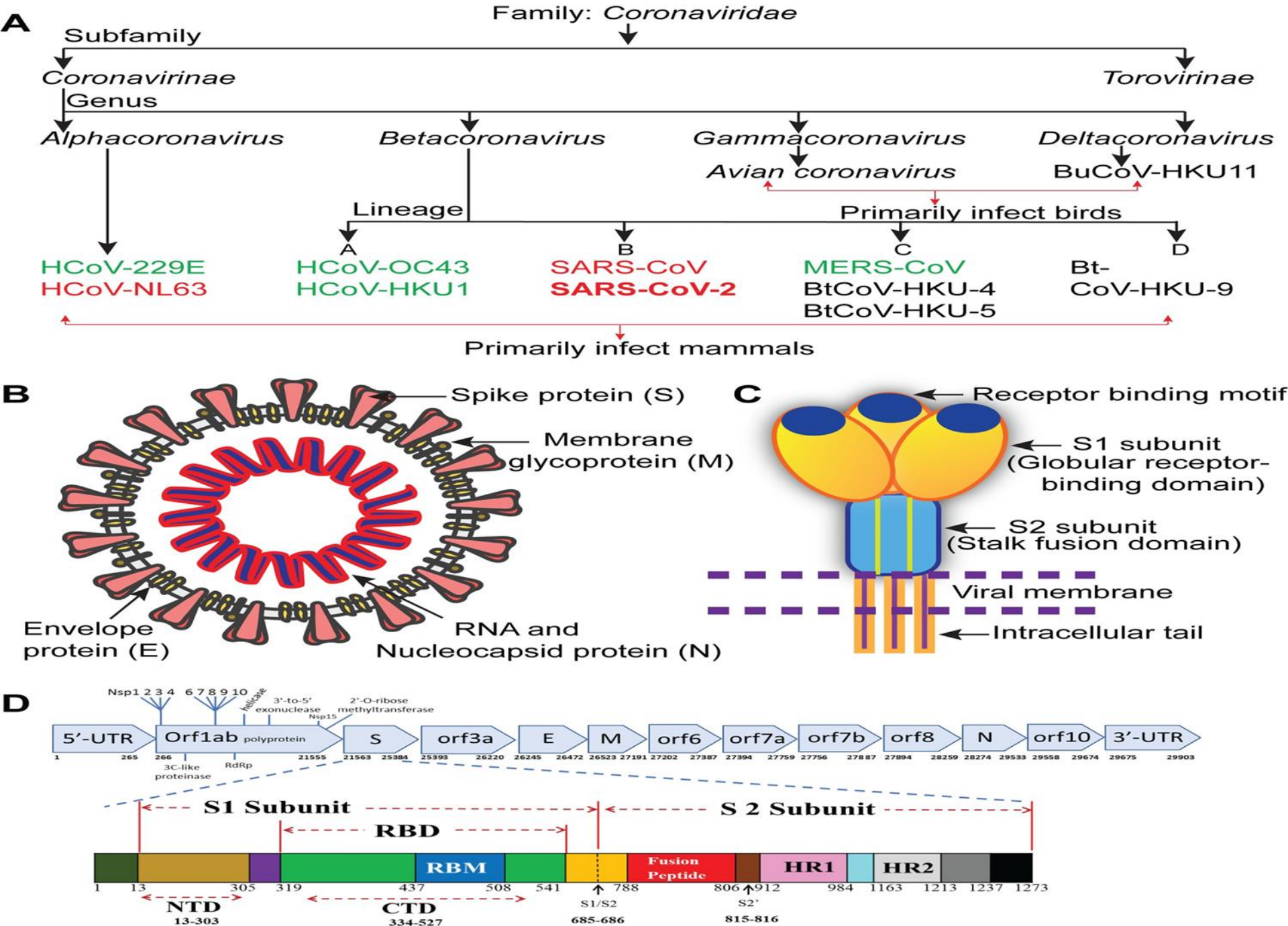
Laboratory diagnosis of Covid-19

by

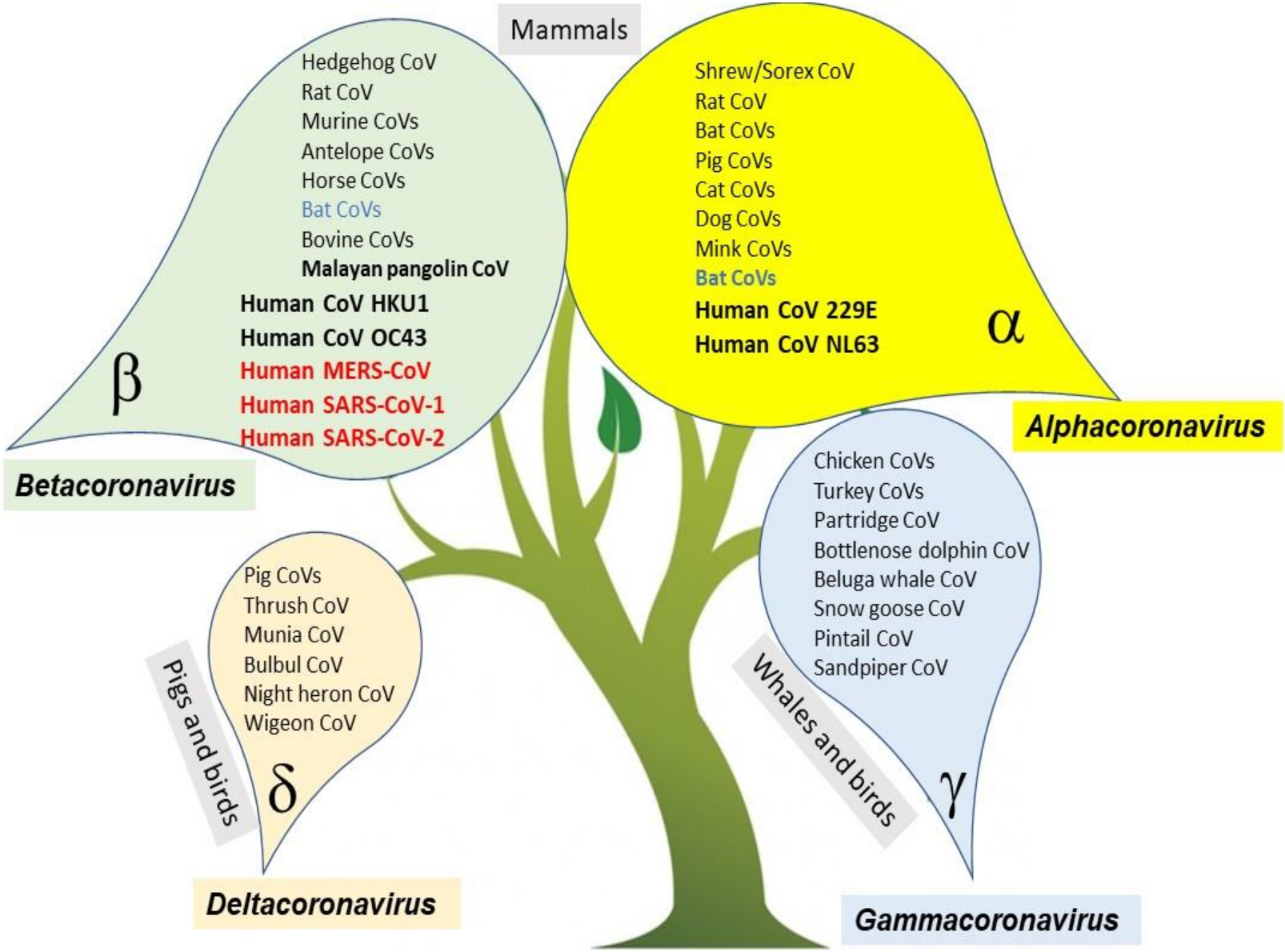
Prof Alijan Tabarraei

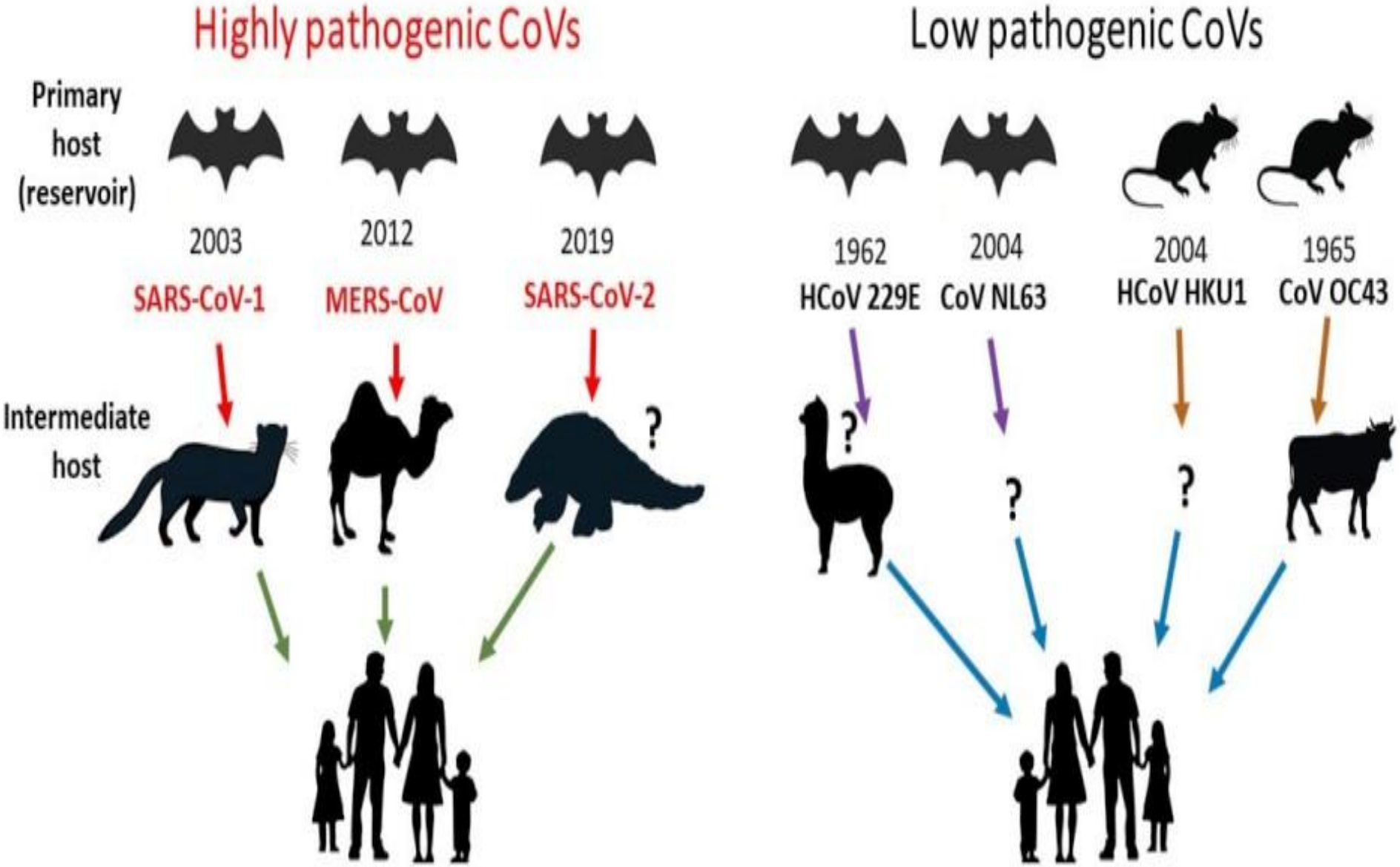
Faculty of Medicine
Golestan University of Medical Sciences

23.08.1402

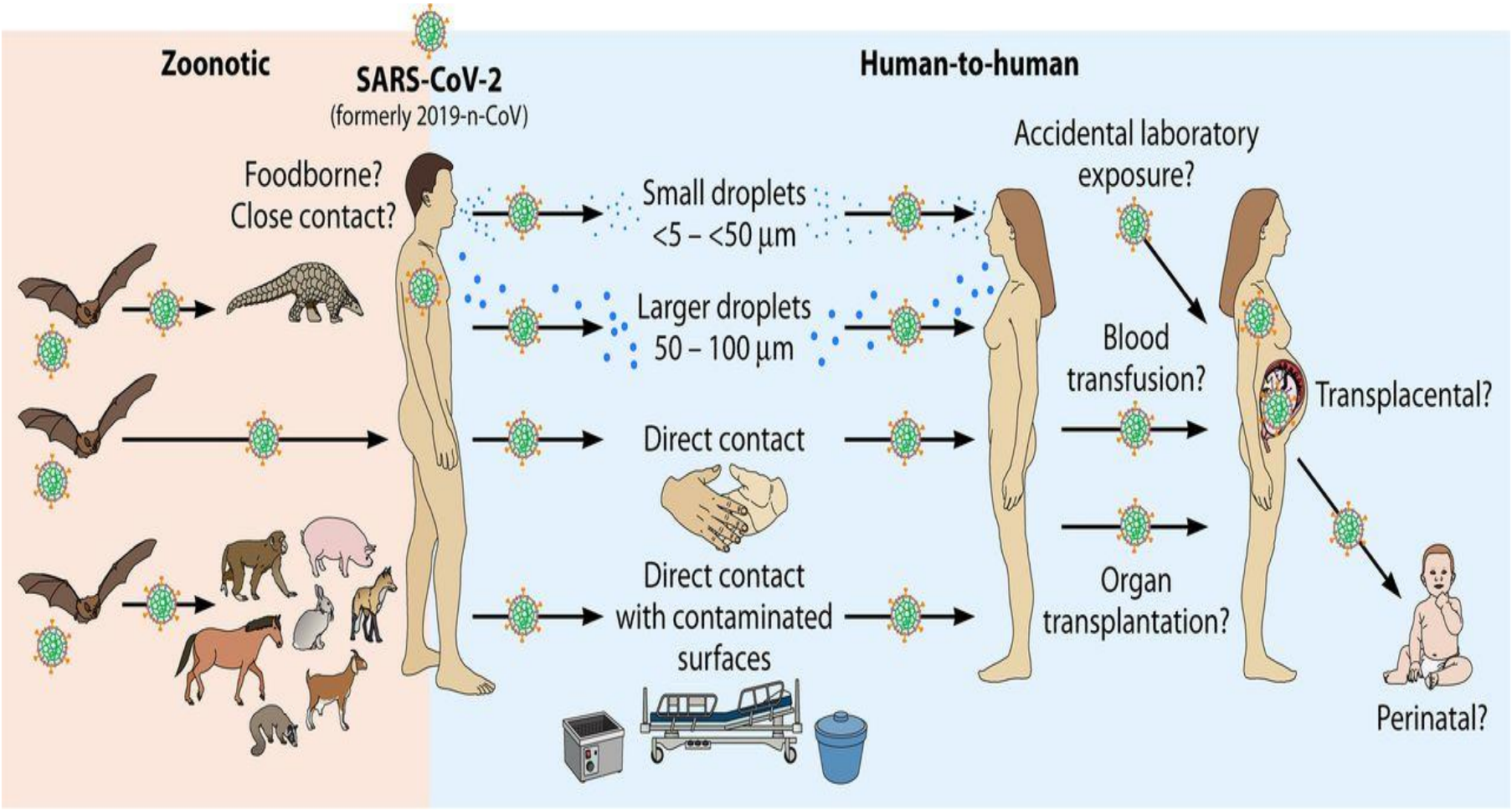

A
Family: Coronaviridae
Subfamily
Coronavirinae
Torovirinae
Genus
Alphacoronavirus
Betacoronavirus
Gammacoronavirus
Deltacoronavirus
Avian coronavirus
BuCoV-HKU11
Primarily infect birds
Lineage
A
B
C
D
HCoV-229E
HCoV-NL63
HCoV-OC43
HCoV-HKU1
SARS-CoV
SARS-CoV-2
MERS-CoV
BtCoV-HKU-4
BtCoV-HKU-5
Bt-CoV-HKU-9
Primarily infect mammals
B
Spike protein (S)
Membrane glycoprotein (M)
Envelope protein (E)
RNA and Nucleocapsid protein (N)
C
Receptor binding motif
S1 subunit (Globular receptor-binding domain)
S2 subunit (Stalk fusion domain)
Viral membrane
Intracellular tail
D
Nsp1 2 3 4 6 7 8 9 10
helicase
3'-to-5' exonuclease
Nsp15
2'-O-ribose methyltransferase
5'-UTR
Orf1ab polyprotein
S
orf3a
E
M
orf6
orf7a
orf7b
orf8
N
orf10
3'-UTR
1 265 266 21555 21563 25384 25393 26220 26245 26472 26523 27191 27202 27387 27394 27759 27756 27887 27894 28259 28274 29533 29558 29674 29675 29903
3C-like proteinase
RdRp
S1 Subunit
S 2 Subunit
RBD
RBM
Fusion Peptide
HR1
HR2
1 13 305 319 437 508 541 788 806 912 984 1163 1213 1237 1273
NTD
13-303
CTD
334-527
S1/S2
685-686
S2'
815-816

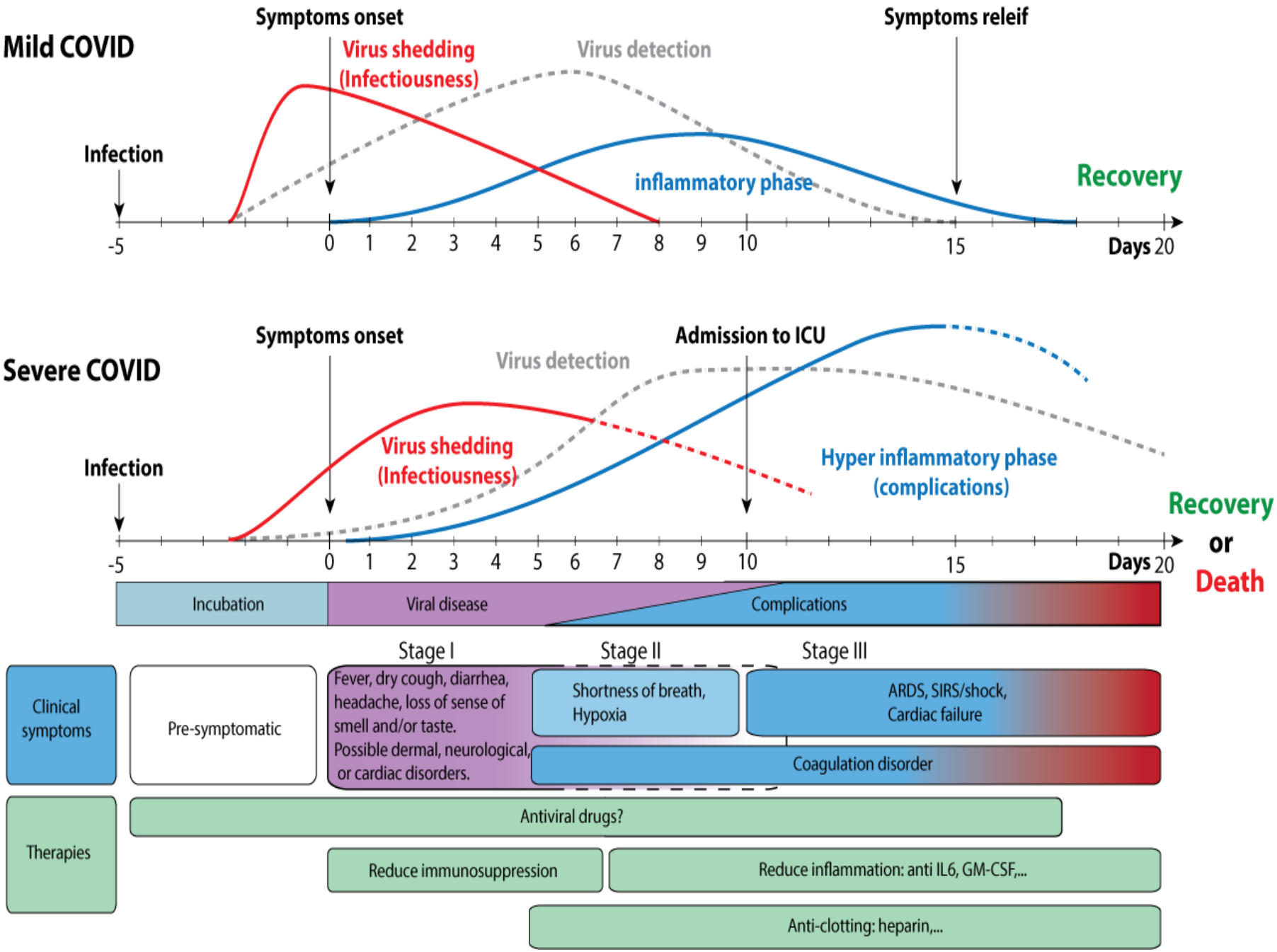
Toxonomy


Mammals
Hedgehog CoV
Rat CoV
Murine CoVs
Antelope CoVs
Horse CoVs
Bat CoVs
Bovine CoVs
Malayan pangolin CoV
Human CoV HKU1
Human CoV OC43
Human MERS-CoV
Human SARS-CoV-1
Human SARS-CoV-2
β
Betacoronavirus
Shrew/Sorex CoV
Rat CoV
Bat CoVs
Pig CoVs
Cat CoVs
Dog CoVs
Mink CoVs
Bat CoVs
Human CoV 229E
Human CoV NL63
α
Alphacoronavirus
Pig CoVs
Thrush CoV
Munia CoV
Bulbul CoV
Night heron CoV
Wigeon CoV
Pigs and birds
δ
Deltacoronavirus
Chicken CoVs
Turkey CoVs
Partridge CoV
Bottlenose dolphin CoV
Beluga whale CoV
Snow goose CoV
Pintail CoV
Sandpiper CoV
Whales and birds
γ
Gammacoronavirus

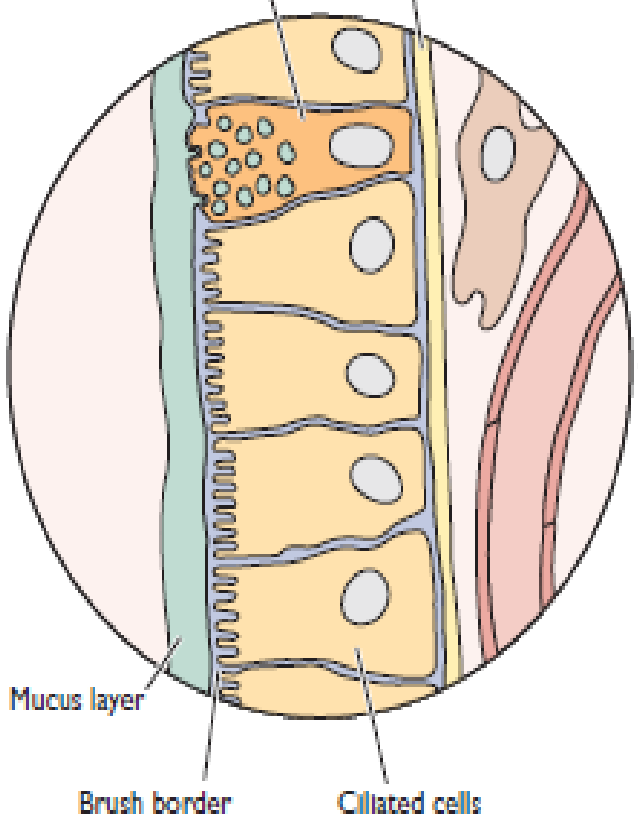

Highly pathogenic CoVs
Low pathogenic CoVs
Primary host (reservoir)
2003
SARS-CoV-1
2012
MERS-CoV
2019
SARS-CoV-2
1962
HCoV 229E
2004
CoV NL63
2004
HCoV HKU1
1965
CoV OC43
Intermediate host
?
?
?
?

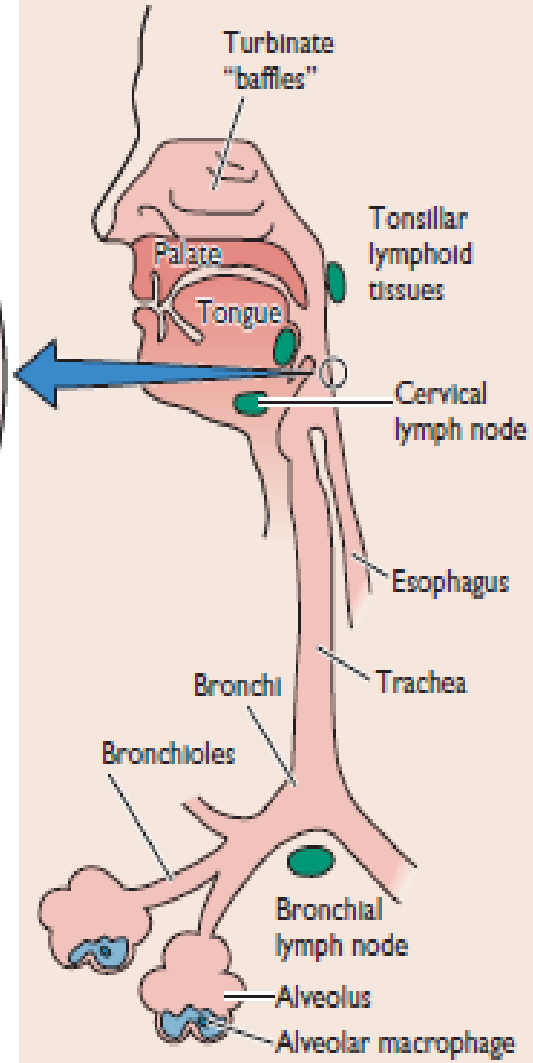
Transmission




Mild COVID
Symptoms onset
Virus shedding
(Infectiousness)
Virus detection
Symptoms releif
Infection
inflammatory phase
Recovery
-5
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
15
Days 20
Severe COVID
Symptoms onset
Admission to ICU
Virus detection
Virus shedding
(Infectiousness)
Infection
Hyper inflammatory phase
(complications)
Recovery
or
Death
-5
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
15
Days 20
Incubation
Viral disease
Complications
Stage I
Stage II
Stage III
Clinical symptoms
Pre-symptomatic
Fever, dry cough, diarrhea, headache, loss of sense of smell and/or taste.
Possible dermal, neurological, or cardiac disorders.
Shortness of breath, Hypoxia
ARDS, SIRS/shock, Cardiac failure
Coagulation disorder
Therapies
Antiviral drugs?
Reduce immunosuppression
Reduce inflammation: anti IL6, GM-CSF,...
Anti-clotting: heparin,...

Clinical manifestations

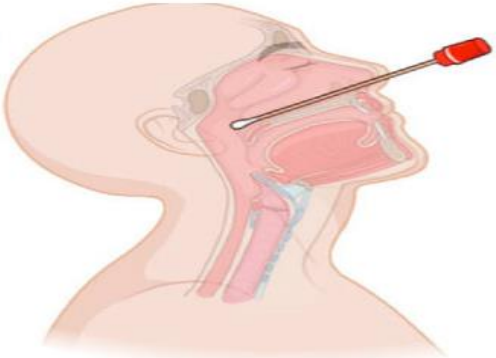




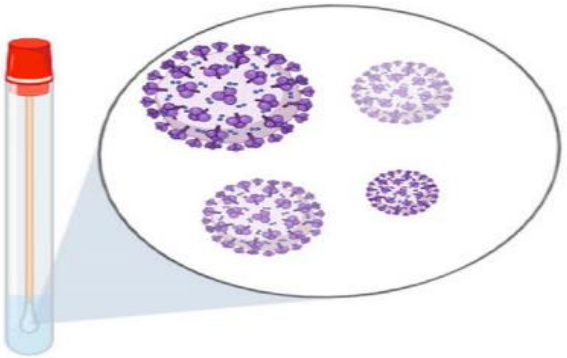
Site of replication	Clinical manifestation	Virus
	Rhinitis (common cold)	Rhinovirus Coronavirus Parainfluenza virus Respiratory syncytial virus Influenza virus Adenovirus Herpes simplex virus Epstein-Barr virus
	Pharyngitis	
	Laryngitis	
	Tracheitis	Parainfluenza virus Respiratory syncytial virus Influenza virus Adenovirus
	Bronchitis	
	Bronchiolitis	
	Bronchopneumonia	

Real-Time PCR

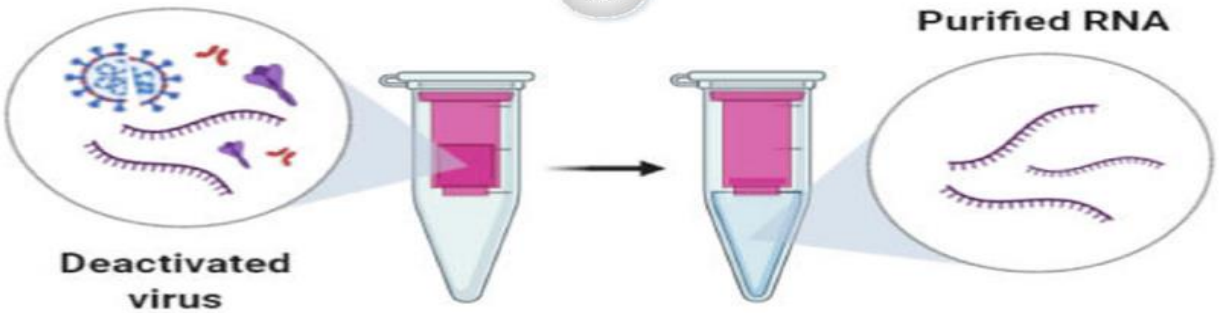
1



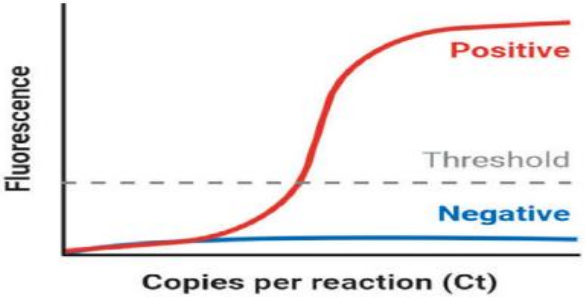
2



3

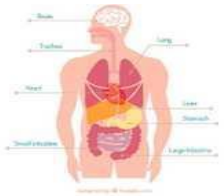


4



5

Extrapulmonary involvement of Covid-19



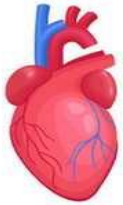
Multisystem and Kawasaki Disease
20.4%

Ocular
0.6%

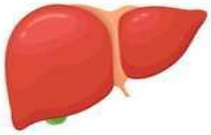
Neurological
9.2%

Hematological and lymphatic
6.1%

Gastrointestinal
32.5%



Cardiovascular
11.4%



Hepatic
1.9%

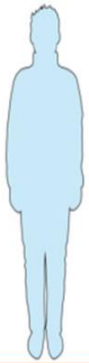
Olfatory and gustatory
0.5%

Renal
13.9%

Cutaneous
3.4%

J Pediatr (Rio J). 2021;97:116–39

Diagnosis



Screening criteria
- History of travel (2 weeks prior)
- Contact with patients

COVID-19 diagnosis criteria

Clinical Features

-Fever
-Fatigue
-Dry cough
-Dyspnea
-Myalgia
-Breathlessness

Screening laboratory tests

- ↓ Lymphocyte
- ↓ White cell count
- ↑ CRP and ESR
- ↑ CPK and LDH
- ↑ ALT/AST
- ↑ prothrombin time
- ↑ creatinine, D-dimer

Imaging

Chest X-ray:
-Bilateral infiltrates
CT imaging:
-Infiltrates
-Ground glass opacities
-Sub segmental consolidation

Molecular examination

- Real time-PCR
- Quantitative RT-PCR
- rtRT-PCR
- RT-iiPCR

Immunological

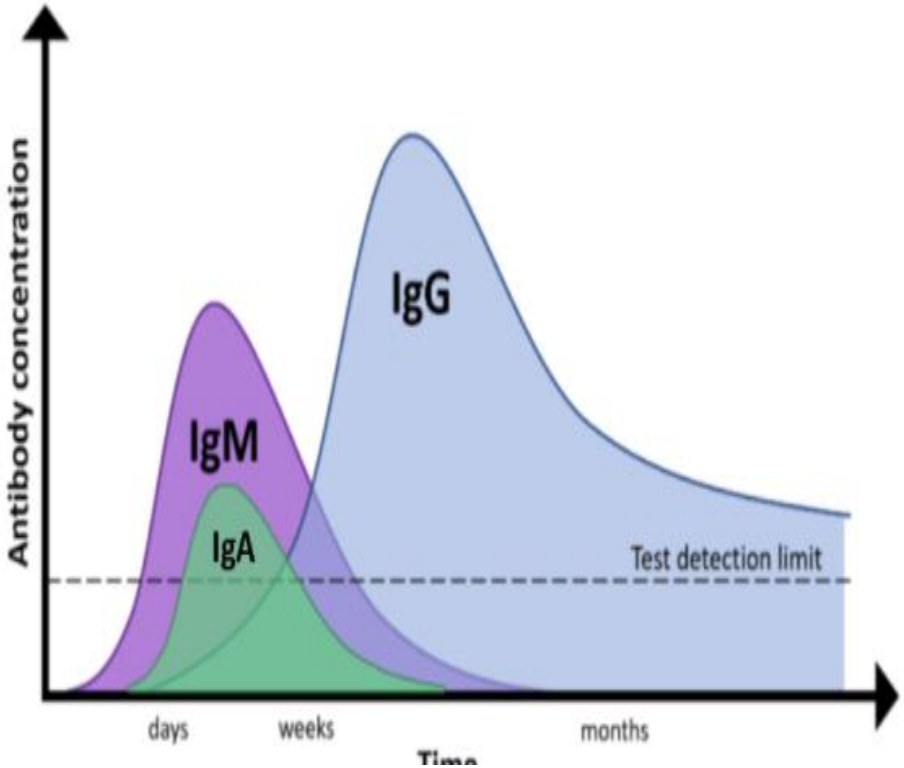
-Immunofluorescence assay
-Direct fluorescentantibody
Semiconductor Quantum dots
-Nucleocapsid protein detection assay
-Protein chip

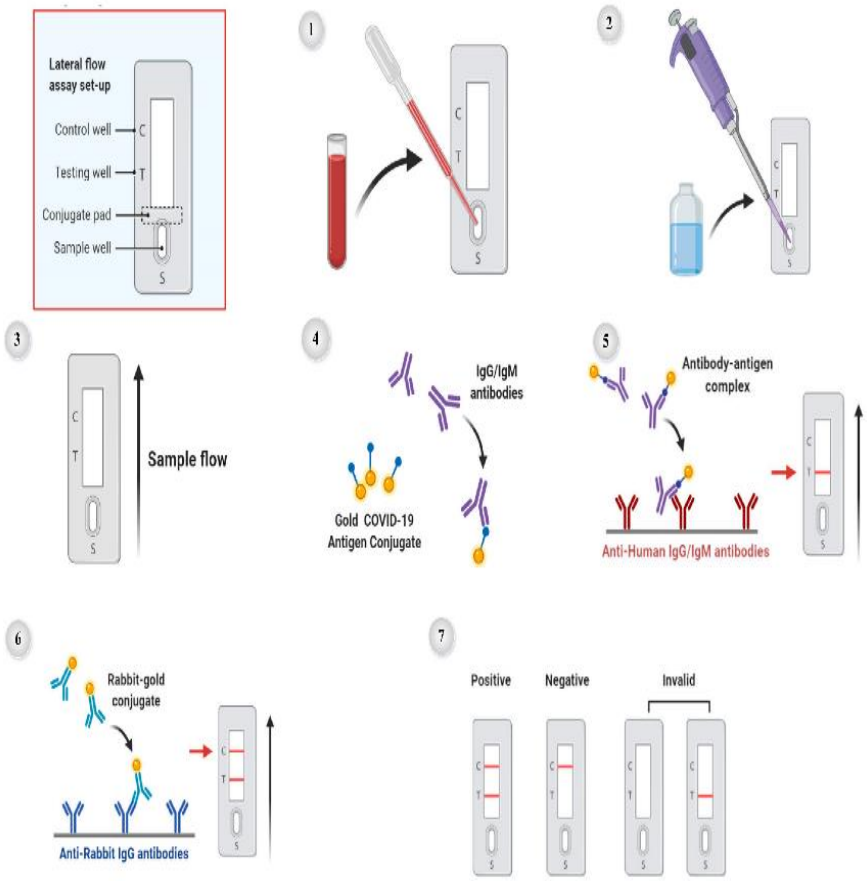
Novel technique

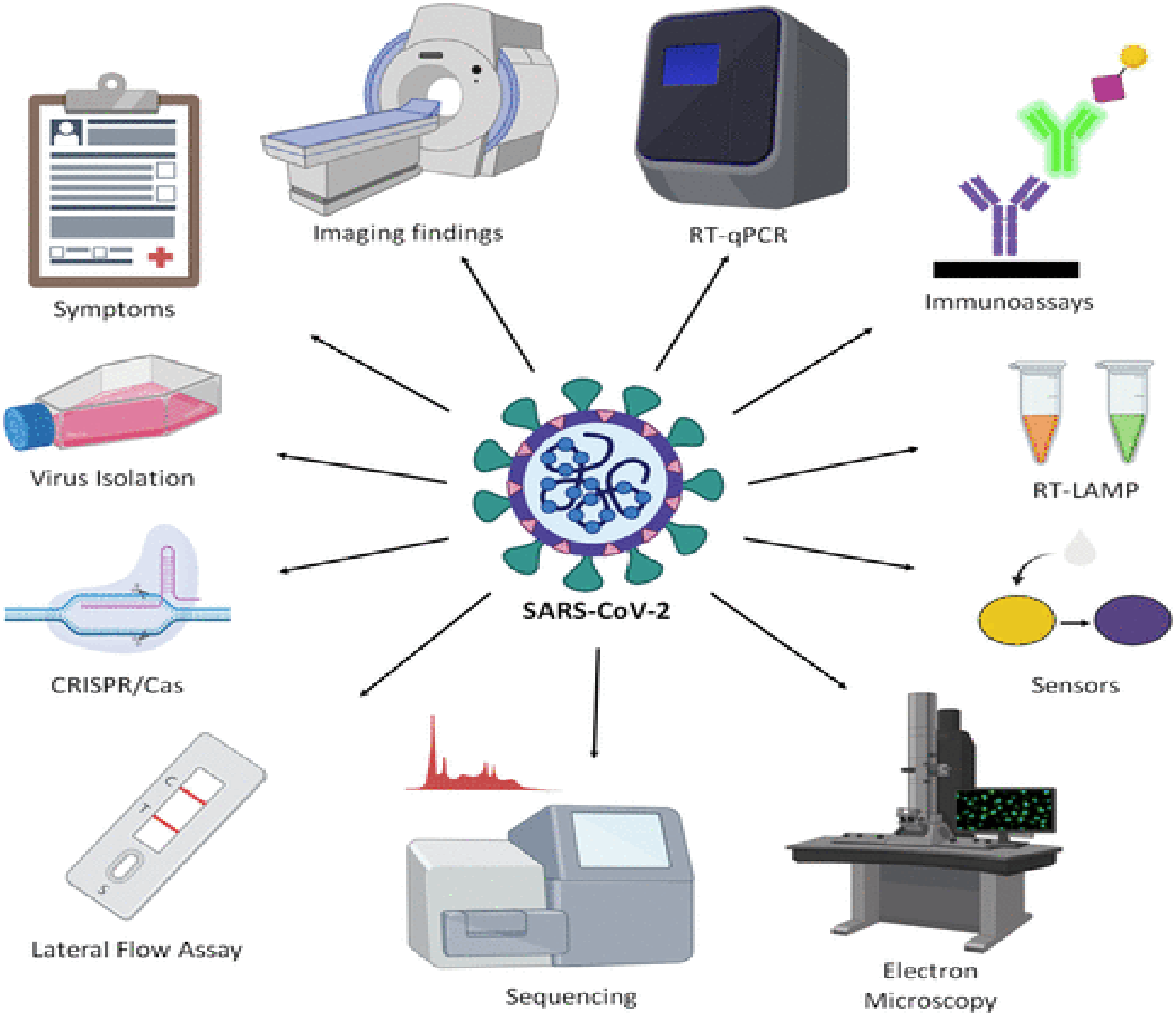
-Next generation sequencing
-CRISPR
-LAMP
-Penn RAMP
-Droplet Digital PCR

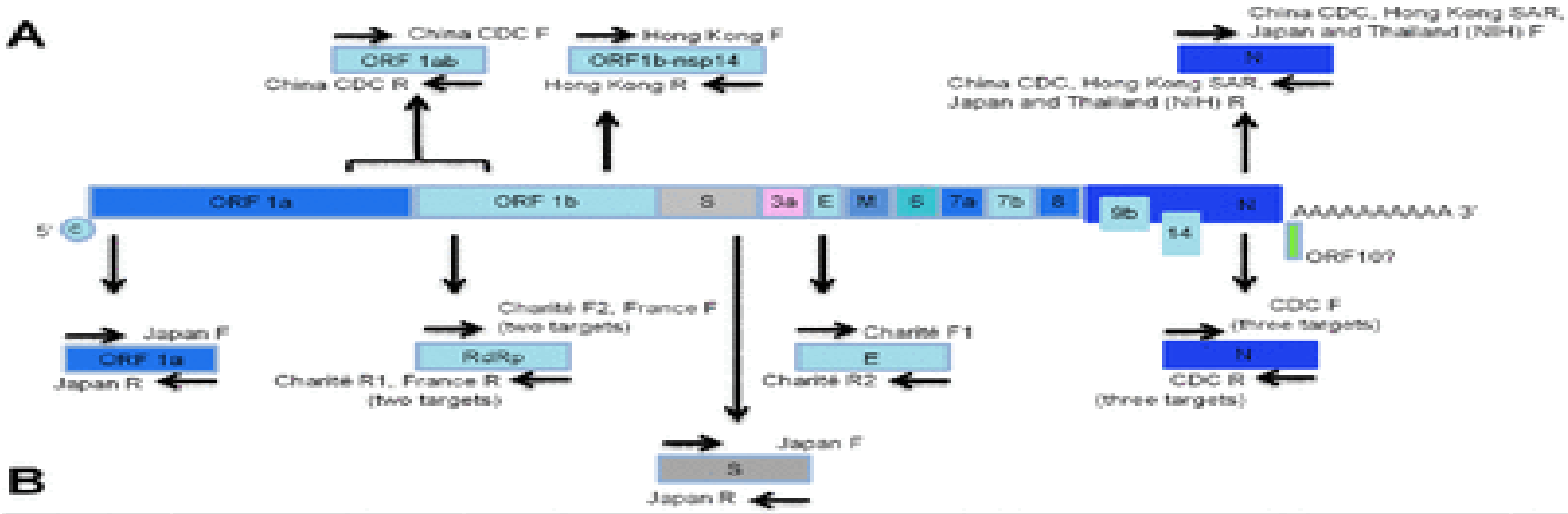
Serological (Rapid test)

Immunoglobulin (IgM) M, which are produced 10–18 days after the onset of symptoms.

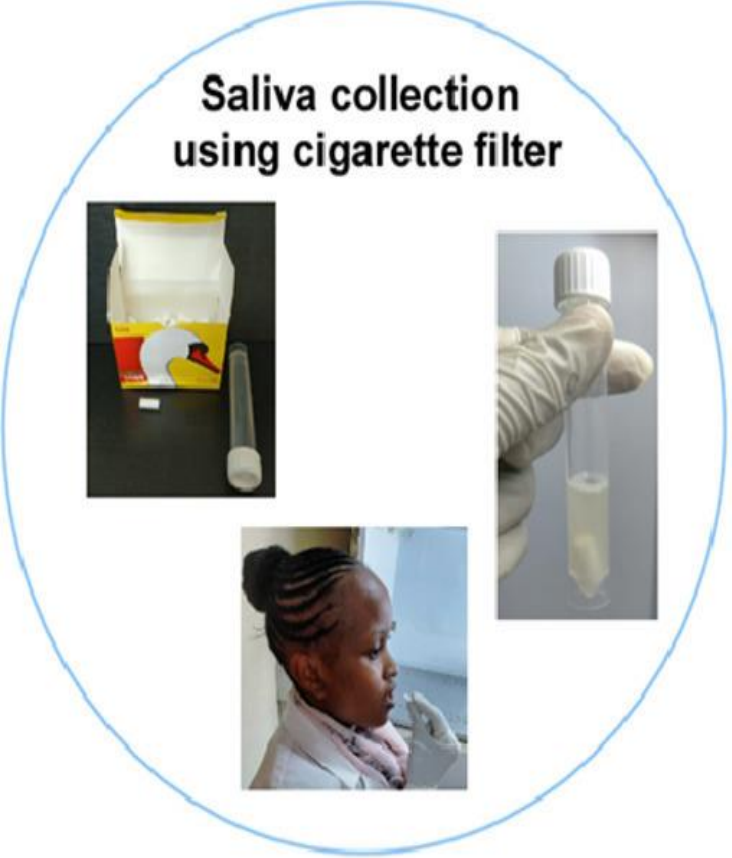


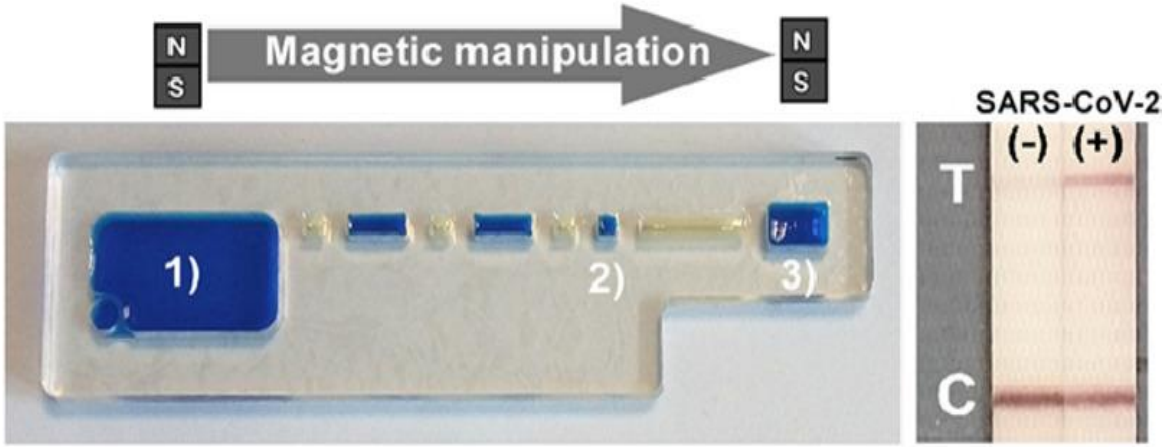



Symptoms
Imaging findings
RT-qPCR
Immunoassays
Virus Isolation
RT-LAMP
SARS-CoV-2
CRISPR/Cas
Sensors
Lateral Flow Assay
Sequencing
Electron
Microscopy



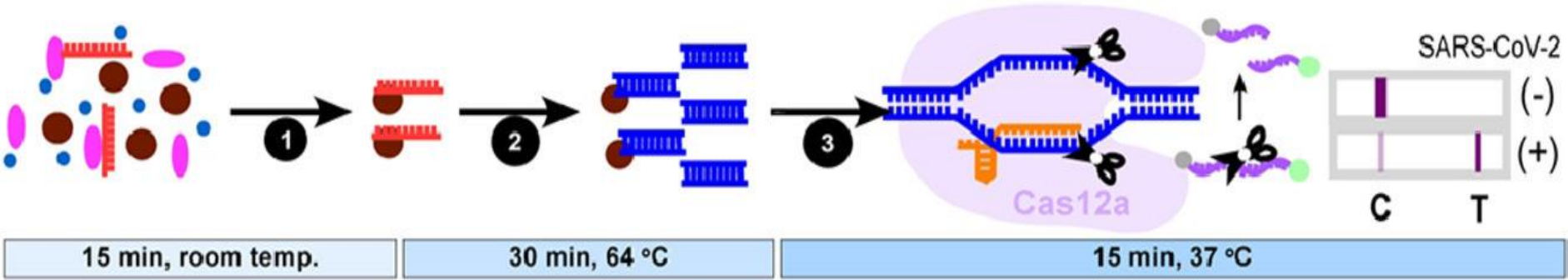
Country	Institute	Gene targets	Primers and probes sequence (5'-3')	Reference
China	China CDC	ORF1ab	F: CCCTGTGGGTTTTACACTTAA R: ACGATTGTGCATCAGCTGA P: FAM-CGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG-BHQ1	205
		N	F: GGGGAACTTCTCCTGCTAGAAT R: CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG P: FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA	
Germany	Charité	RdRP (confirmatory)	SARSr-F2: GTGARATGGTCATGTGTGGCGG RdRP_SARSr-R1: CARATGTTAAAASACACTATTAGCATA RdRP_SARSr-P1*: CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ RdRP_SARSr-F2*: FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	206
		E (first line)	E_Sarbeco_F1: ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT E_Sarbeco_R2: ATATTGCAGCAGTACGCACACA E_Sarbeco_P1: FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	
Hong Kong SAR	HKU	ORF1b-nsp14	HKU-ORF1b-nsp14F: TGGGGGTTTTACRGGTAACCT HKU-ORF1b-nsp14R: AACRCGCTTAACAAAGCACTC HKU-ORF1b-nsp14P: FAM-TAGTTGTGATGCWATCATGACTAG-TAMRA	207
		N	HKU-NF: TAATCAGACAAGGAACTGATTA HKU-NR: CGAAGGTGTGACTTCCATG HKU-NP: FAM-GCAAATTGTGCAATTTGCGG-TAMRA	
Japan	National Institute of Infectious Diseases	Pancorona and multiple targets ORF1a Nested PCR	NIID_WH-1_F501: TTCGGATGCTCCGAACTGCACC NIID_WH-1_R913: CTTTACCAGCACGTGCTAGAAGG NIID_WH-1_F509: CTCGAACTGCACCTCATGG NIID_WH-1_R854: CAGAAGTTGTTATCCGACATAGC	208
		S Nested PCR	WuhanCoV-spk1-f: TTGGCAAAATTCAAGACTCACTTT WuhanCoV-spk2-r: TGTGGTTCATAAAAATTCCTTTGTG NIID_WH-1_F24561: TCAAGACTCACTTTCTTCCAC NIID_WH-1_R24873: ATTTGAAACAAAGACACCTTCAC	
		N	NIID_2019-nCOV_N_F2: AAATTTTGGGGACCAGGAAC NIID_2019-nCOV_N_R2: TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC NIID_2019-nCOV_N_P2: FAM-ATGTCGCGCATTGGCATGGA-BHQ	
Thailand	National Institute of Health	N	WH-NIC N-F: CGTTTTGGTGGACCCTCAGAT WH-NIC N-R: CCCCACTGCGTTCTCCATT WH-NIC N-P: FAM-CAACTGGCAGTAACCA-BGH1	207
USA	USA CDC	Three targets in N gene N1	2019-nCoV_N1-F: GACCCCAAAATCAGCGAAAT 2019-nCoV_N1-R: TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG 2019-nCoV_N1-P: FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1	208
		N2	2019-nCoV_N2-F: TTACAAACATTGGCCGCAAA 2019-nCoV_N2-R: GCGCGACATTCCGAAGAA 2019-nCoV_N2-P: FAM-ACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG-BHQ1	
		N3	2019-nCoV_N3-F: GGGAGCCTTGAATACACCAAAA 2019-nCoV_N3-R: TGTAGCACGATTGCAGCATTG 2019-nCoV_N3-P: FAM-AYCACATTGGCACCCGCAATCCTG-BHQ1	
France	Institut Pasteur, Paris	Two targets in RdRP gene IP2	nCoV_IP2-12669Fw: ATGAGCTTAGTCCTGTTG nCoV_IP2-12759Rv: CTCCGCTTTGTTGTGTTGT nCoV_IP2-12696Probe: Hex-AGATGTCTTGTGCTGCCGGTA-BHQ-1	209
		IP4	nCoV_IP4-14059Fw: GGTAACTGGTATGATTTCG nCoV_IP4-14146Rv: CTGGTCAAGGTTAATATAGG nCoV_IP4-14084Probe: FAM-TCATACAAACCACGCCACG-BHQ-1	

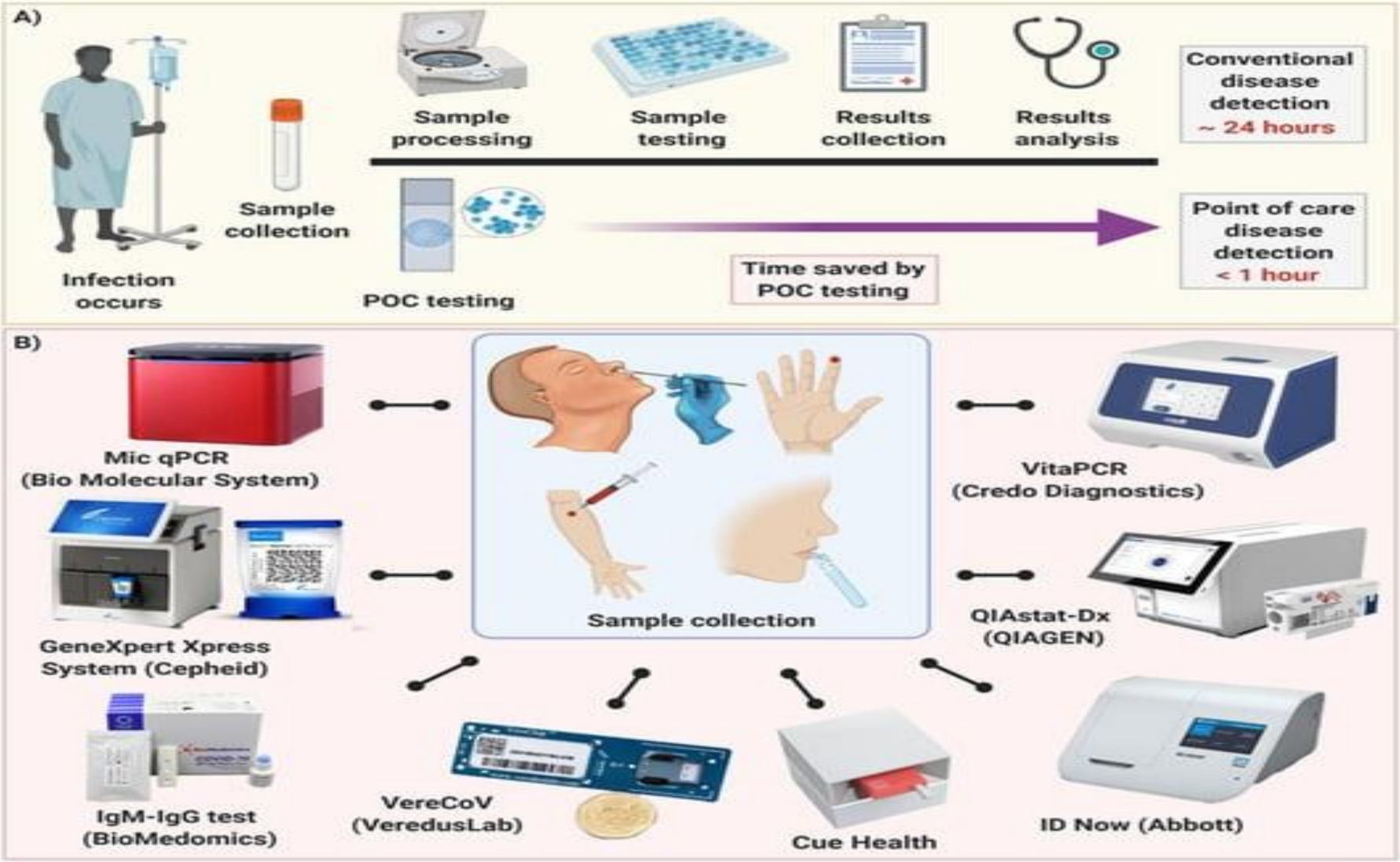




On-chip sample-to-answer integrated steps

1) RNA extraction
2) Isothermal amplification (RT-LAMP)
3) CRISPR-Cas12a detection with LF readout





- **Figure 3.** (**A**) Schematic illustration of disease detection using conventional methods relied on centralized laboratories and POC testing approaches. POC devices can drastically reduce the amount of time needed to detect disease. (**B**) Current rapid commercially available POC devices that possess FDA approval for COVID-19. After sample collection and processing, these devices are capable of testing the sample in a time frame of mostly less than 30 min.

نمونه گیری

نمونه های قابل جمع آوری

- ۱- نمونه های تنفسی
- فوقانی: نازوفارنژیال ، اوروفارنژیال و بزاق
- تحتانی : خلط ،آسپیره ، لاواژ و ...
- ۲- سرم و مایعات داخلی

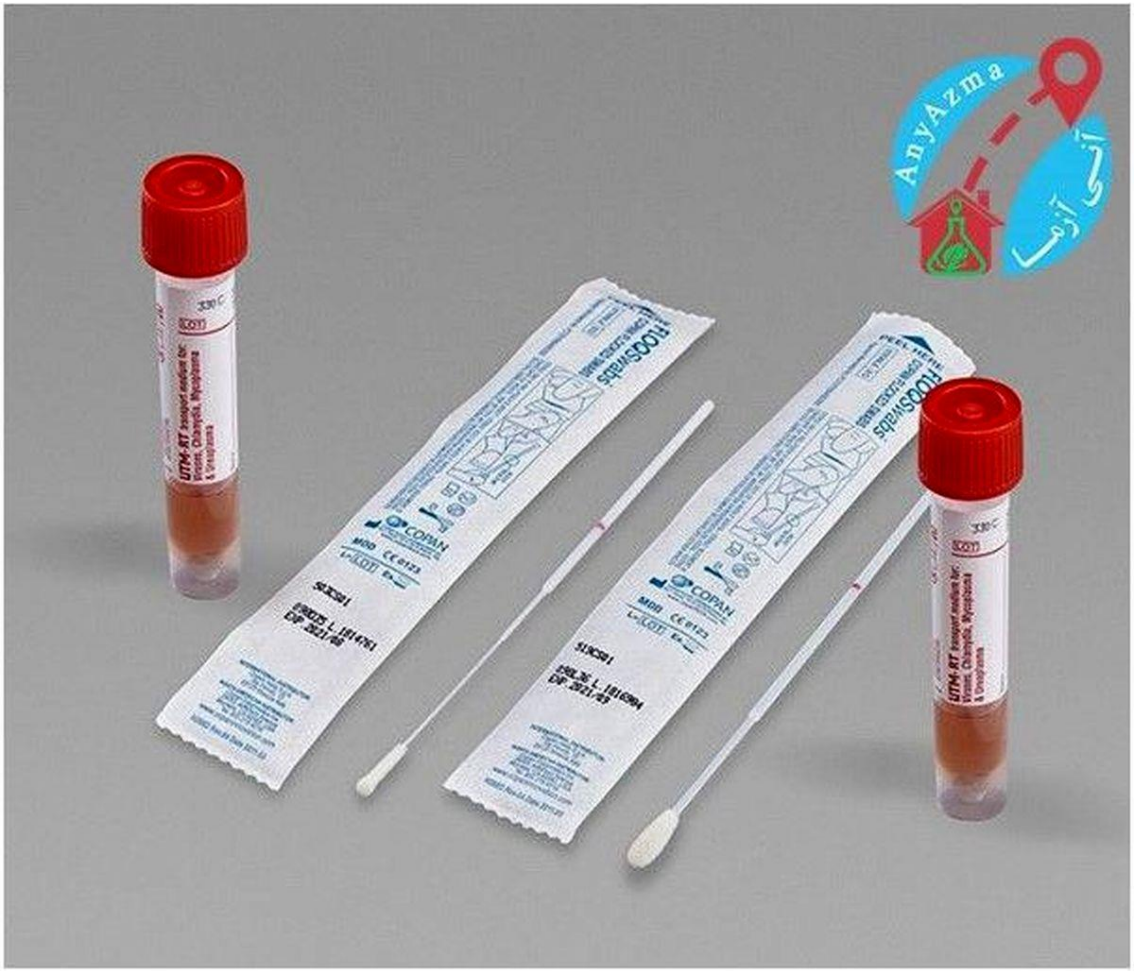
نمونه های تنفسی فوقانی

- وسایل نمونه گیری
- سواپ :
- الف) نوک سوآپ : پنبه ای – ریون – پلی استری
- ب) دسته سواپ : چوبی – پلاستیکی – فلزی
- سایز سوآپ
- طول ۱۵ الی ۲۰ سانتیمتر
- قطر ۲/۵ و ۵ میلیمتر

محیط انتقال ویروس (VTM-Viral Transport Media)

- محیط انتقال ویروس VTMیک محیط کشت مایع بافر و مغذی هست که برای جمع‌آوری، حمل و نقل و نگهداری طولانی مدت نمونه‌های بالینی آلوده به ویروس از جمله ویروس کرونا (COVID-19)، کلامیدیا، مایکوپلاسما و ... استفاده می‌شود.
- شامل DMEM، آلبومین سرم گاوی ((BSA) و محلول پنی‌سیلین استرپتومایسین می‌باشد.

- **ویژگی های محیط انتقال ویروس**
- قابل استفاده برای ویروس‌های آنفلوانزا نوع Aو B، SARS-CoV-2و ...
- پایداری بیش از یک هفته برای انجام آزمایش‌های مولکولی
- قابل فریز کردن
- بدون هیچگونه مهارکننده آزمایش‌های مولکولی (PCR)
- جلوگیری از خشک شدن نمونه
- جلوگیری از آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از طریق آنتی‌بیوتیکهای موجود در آن
- حفظ و پایداری نمونه تا حداقل ۴۸ ساعت در دمای یخچال


AnyAzma
آنی آزما
COPAN
FLOQSwabs
COPAN
FLOQSwabs

نمونه گیری نازوفارنژیال

- **طرز استفاده از سوآپ نازال داکرون:**
- ۱- شرح مراحل نمونه گیری به بیمار بدهید.
- ۲- آموزش نحو نشستن بر روی صندلی یا لبه تخت به بیمار
- ۳- از بیمار بخواهید که بینی خود را با استفاده از فین کردن تمیز کند.
- ۴- چک کردن مجرای بینی بیمار به وسیله چراغ قوه
- ۵ – از بیمار بخواهید که یکی از سوراخ‌های بینی خود را با دست نگه دارد و مجدداً فین کند تا از باز بودن مجاری بینی آن مطمئن شوید.
- ۶- سرفه کردن بیمار به منظور راندن ارگانیسم‌ها به فضای نازو فارنکس
- ۷- سوآپ را در حالی که هنوز از بسته خارج نکرده‌اید به‌صورت منحنی خم کنید و بدون آلوده کردن آزمایشگاهی آن را از بسته خارج کنید.
- ۸- سوآپ را به اندازه ۸ الی ۱۰ سانتی‌متر داخل بینی بیمار کنید.
- ۹- سوآپ آزمایشگاهی را در نزدیکی سپتوم بینی و کف بینی نگهدارید. سواب را سریعا چرخانده و بیرون بکشید.
- نکته: این کار باید حداکثر در زمان کوتاهی به اندازه ۱۰ الی ۱۵ ثانیه انجام شود.

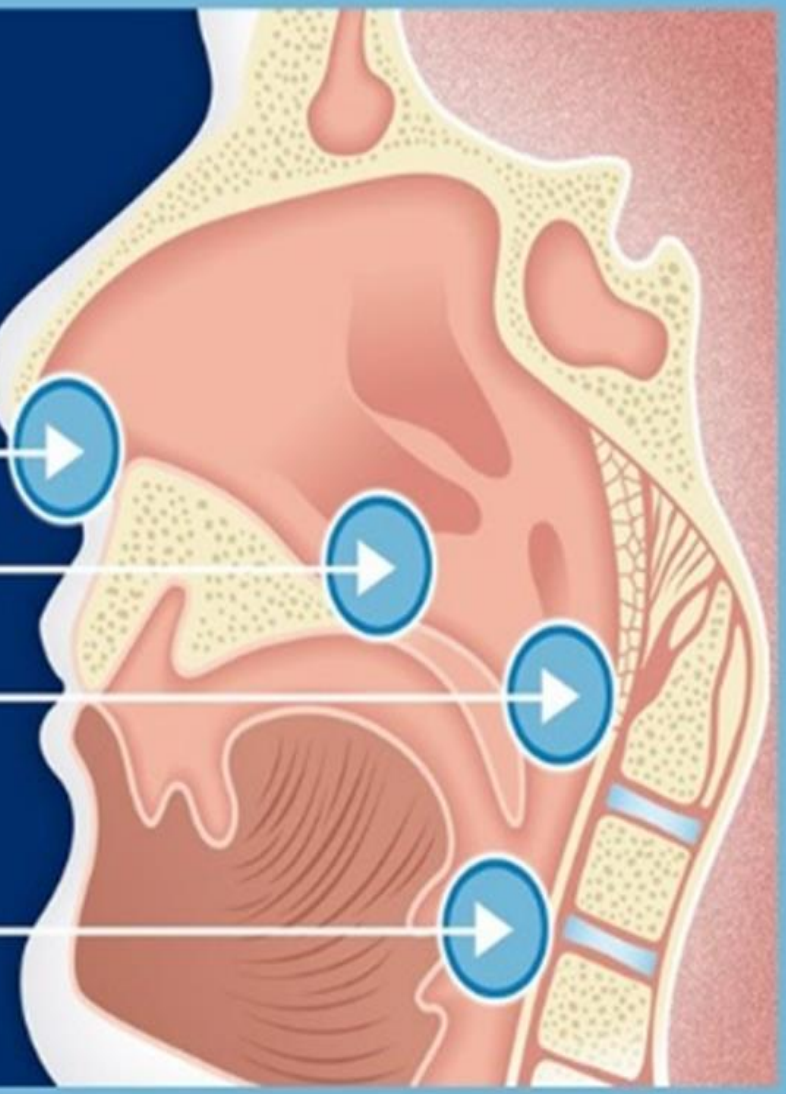
- ۱۰- اگر سوآپ دارای لوله استریل است، انتهای آن را بشکنید و آن را سریعاً داخل لوله قرار دهید.

NP

نمونه گیری از اوروفارنژیال

نحوه نمونه گیری بزاق

محل های نمونه گیری سوآب برای تست کرونا

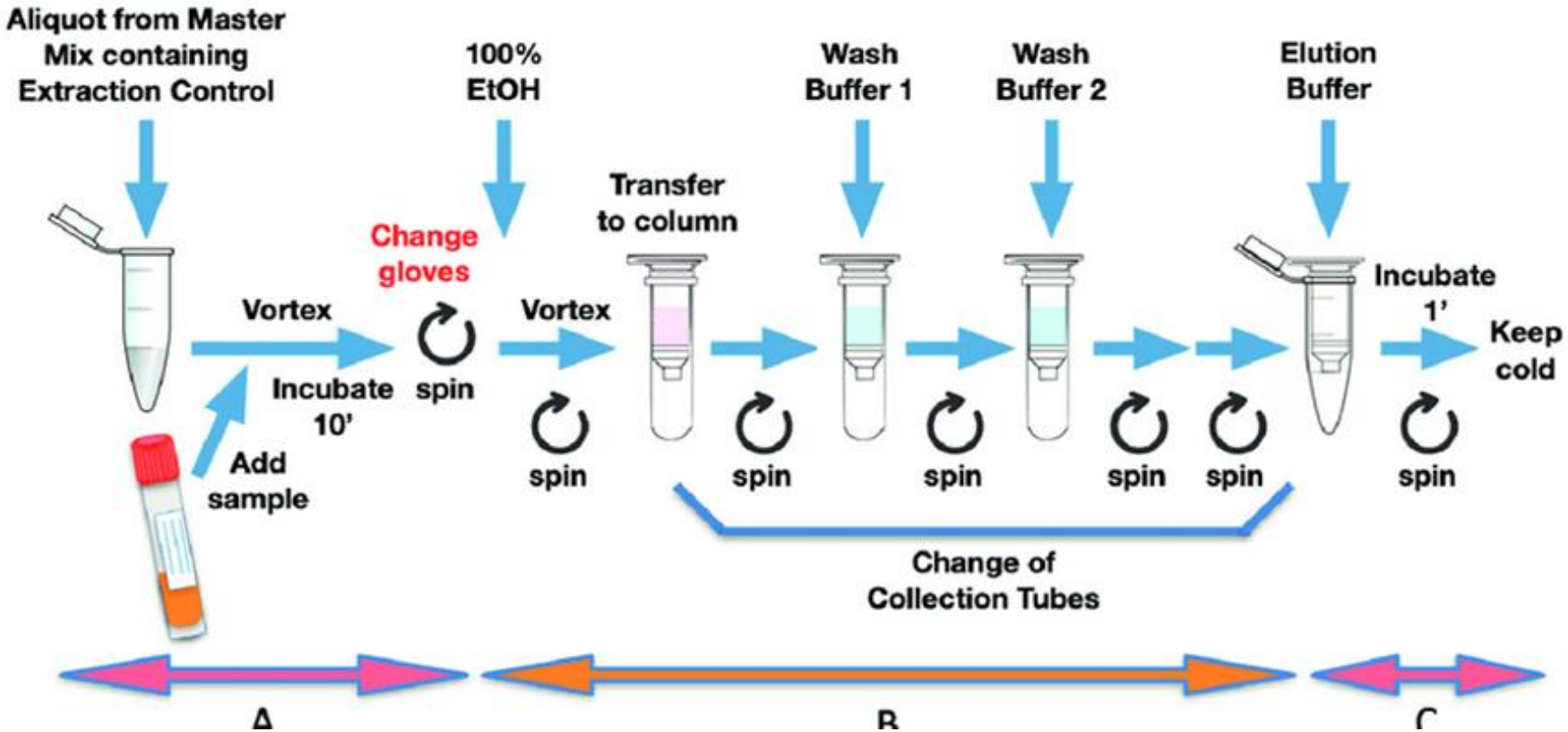


نمونه گیری تنفسی تحتانی

زمان و محل نمونه گیری

- اساس تشخیص ویروس - SARS-CoV2 شامل جمع آوری صحیح نمونه در زمان مناسب و از مکان مناسب است
- سوآپ نازوفارینکس ۶۰ -۷۰ درصد وسوآپ گلو ۳۰ – ۳۵ درصد نمونه ها را تشخیص میدهد .
- نمونه های تنفسی فوقانی بعد از شروع علائم بیماری تا هفته اول به اوج خود میرسد .
- نمونه های تنفسی تحتانی از هفته دوم تا سوم به اوج خود میرسد
- نمونه های گرفته شده در محیط VTM تا ۷۲ ساعت در یخچال پایدار هستند
- جهت نگهداری طولانی مدت بایستی فریز شود

استخراج ژنوم کوید-۱۹



مراحل استخراج RNA کرونا

- ۱-اضافه کردن PK، ۲۰ µl به یک میکروتیوب ۲ ،سپس اضافه کردن ۲۰۰µl نمونه و LB Buffer ۲۰۰ µl سپس ۱۵ ثانیه ورتکس
- ۲- انکوبه در دمای ۵۶ درجه به مدت ۱۰ دقیقه
- ۳- اضافه کردن ۲۵۰ µl الکل ۹۹ درجه و ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه
- ۴- اضافه کردن محتویات لوله به داخل فیلتر میکروتیوب و ساتریفیوژ کردن در دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۱ دقیقه ،دور ریختن محلول خارج شده از فیلتر
- ۵- اضافه کردن ۵۰۰ µl WB1 برروی فیلتر و سانتریفیوژ کردن در دور۸۰۰۰ rpm به مدت ۱ دقیقه
- ۶- اضافه کردن ۵۰۰µl WB2برروی فیلتر و سانتریفیوژ کردن در دور۸۰۰۰ rpm به مدت ۱ دقیقه
- ۷- تعویض تیوپ زیر فیلتر و سانتریفیوژکردن دردور ۱۴۰۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه
- ۸- قرار دادن میکروتیوب ۲ml در زیر فیلتر و اضافه کردن ۵۰µl EB به فیلتر و انکوبه در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه
- ۹- سانتریفیوژ کردن در دور ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱ دقیقه ، اوت کردن فیلتر و استفاده از مایع رسوب به عنوان RNA

Real Time PCR

- مشکلات و نواقص عدیده موجود در PCRهای معمولی، همراه با نیاز به یک روش تعیین کمیِ دقیق، زمینه گشایش عرصه ای نوین در تکنیک PCRرا فرآهم آورد
- Real Time PCR تکنیکی است برای مشاهده ی لحظه به لحظه فرایند تکثیر اسید نوکلئیک
- تمامی اصول و واکنش‌گرهایی که برای یک PCRمعمولی نیاز است در تکنیک Real time PCRهم بکار می‌رود، اما یک گزارشگر فلورسنت نیز در واکنش حضور دارد
- این گزارش‌گرها به گونه‌ای طراحی می‌شوند که در صورت تکثیر DNA نور تولید کنند
- در طی واکنش PCR، به موازات افزایش غلظت DNA، میزان ثبت جذب فلورسانس در واکنش توسط شناساگر دستگاه افزایش می یابد.
- با اندازه گیری شدت نور فلورسانس در انتهای هر سیکل، نهایتا یک منحنی بدست می آید.

Real Time PCR

- تکنیک PCRروشی کاربردی است که در آن با استفاده از سیکل های دمایی پیوسته اقدام به تکثیر یک ناحیه از ژن می گردد.
- به این ترتیب که ابتدا پیوندهای هیدروژنی دو رشته DNAدر دمای بالای ۹۰ درجه ازهم باز شده، سپس دما تا حدود ٦٠ درجه پایین آمده و پرایمر ها به تک رشته‌ای DNAدر دو جهت مخالف متصل می شوند.
- سپس آنزیم POLYMERASE سر ۳ پرایمر را شناخته و اقدام به ساخت رشته مکمل می کند.
- سه مرحله نام برده در حدود٤٠ سیکل تکرار شده و نهایتا از یک رشته الگوی اولیه دو به توان ٤٠ محصول ساخته می شود.

مراحل سه گانه تکنیک Real Time PCR

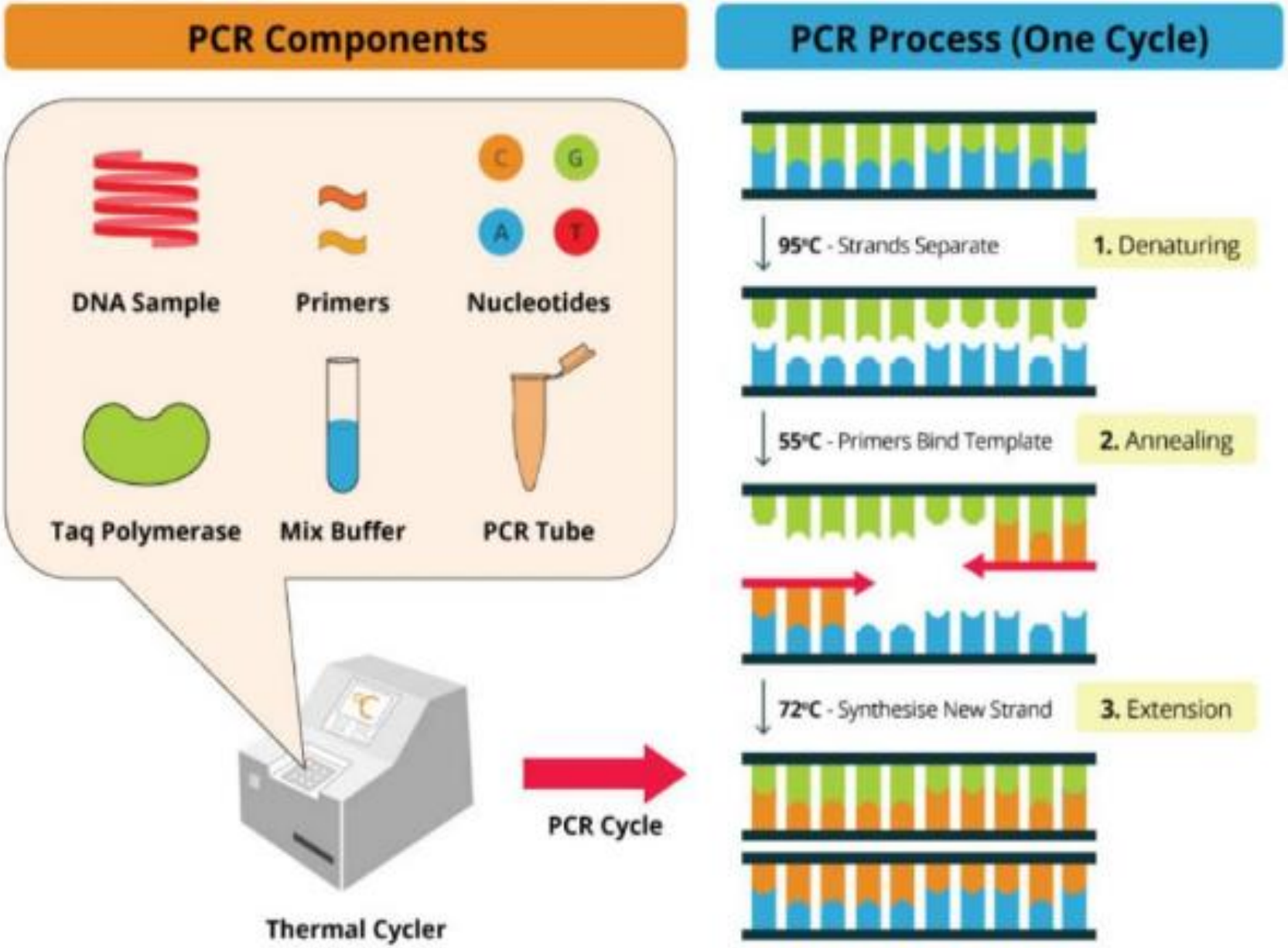
- مرحله اول تکنیک Real Time PCR : واسرشته شدن الگوی اولیه و نیز در صورت استفاده فعال سازی آنزیم DNAپلی مراز . Hot start holding stage

- مرحله دوم تکنیک Real Time PCR: در این مرحله اتصال پرایمر الگو به هدف و تکثیر انجام می شود
- می توان این دو مرحله را در ۲ پله انجام داد به این معنا که دمای اتصال و تکثیر را در یک بازه زمانی و یک مرحله انجام دهیم.
- توصیه می شود که اگر دمای اتصال پرایمر شما زیر ٦٠ درجه باشد، این کار را انجام دهید

- مزیت PCRدو پله ای نسبت به سه پله ای، زمانی است که قطعه محصول کوتاه با دمای اتصال پائینی دارید

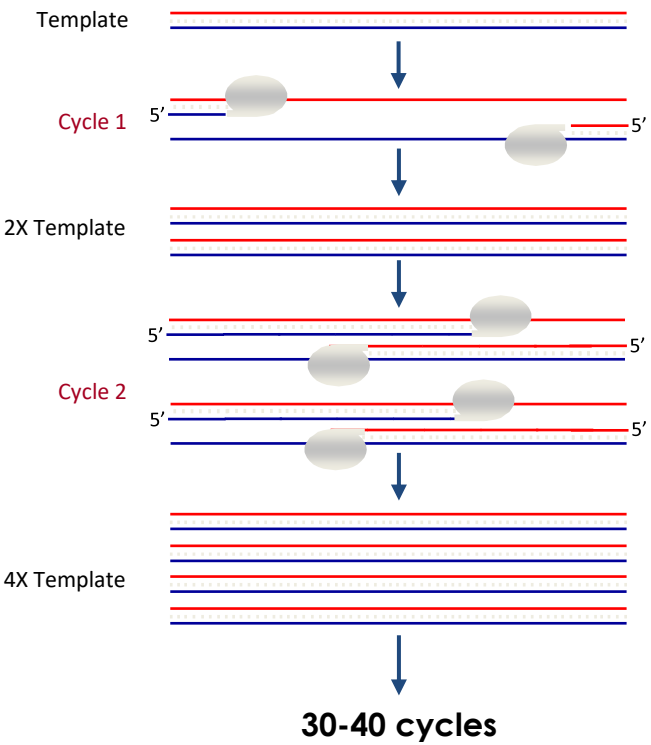
- زمانی که دمای اتصال پایین تر از ٦٠ درجه باشد می توان با حذف پله سوم و استفاده از توانایی عملکرد DNAپلی مراز در دمای ٥٥ تا ٧٥ درجه سانتیگراد مرحله اتصال و طویل سازی را در یک پله انجام دهید.

- ۳- مرحله ی سوم تکنیک Real Time PCR: منحنی آنالیز ذوب (Melting Curve)که در مورد رنگ های آزاد انجام می گیرد و این مرحله جزو قابلیت های دستگاه ریل تایم پی سی آر (Real Time PCR)نسبت به دستگاه ترموسایکلر PCRمعمولی است.

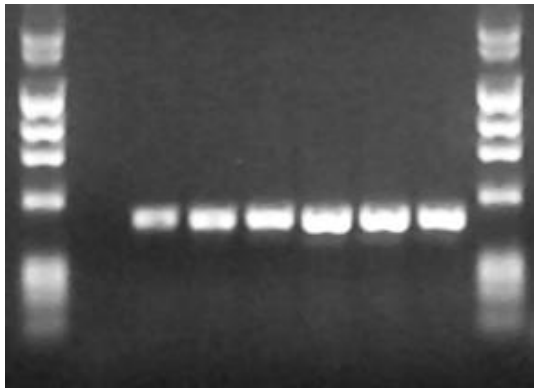

PCR Components
PCR Process (One Cycle)
DNA Sample
Primers
C
G
A
T
Nucleotides
Taq Polymerase
Mix Buffer
PCR Tube
Thermal Cycler
PCR Cycle
95°C - Strands Separate
1. Denaturing
55°C - Primers Bind Template
2. Annealing
72°C - Synthesise New Strand
3. Extension

Traditional PCR

- **Amplify DNA with end point analysis to distinguish products.**



End-point analysis



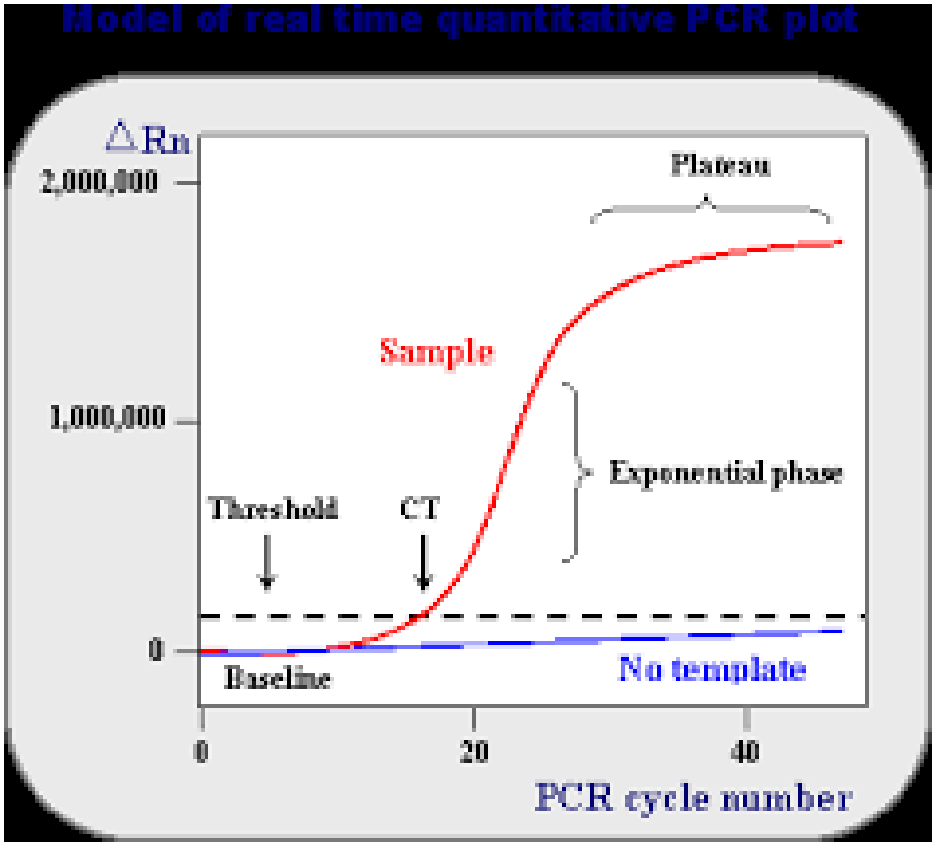
- دستگاه دارای یک دوربین است که این پروسه را به وسیله ی اندازه گیری فلورسانس ثبت میکند

- سپس به سادگی اطلاعات را به صورت گراف به عنوان منحنی ذوب (Melting curve) میزان فلورسانس در مقابل درجه حرارت را نشان می دهد.

- دمای ذوب دو رشته DNAدر حال باز شدن از هم کاملا قابل پیش بینی است که بستگی به توالی بازهای DNA (طول و میزان GC)دارد.

- مولکول های گزارشگرِ فلوروسنت یا به صورت رنگ هایی می باشند که به DNAدو رشته ای متصل می شوند، مانند SYBR® Greenو یا بصورت شناساگرهای توالی های خاص مانند TaqMan® Probesمی باشند

- بعد از اتمام واکنش PCR دستگاه Real Time به شما یک منحنی تکثیر می دهد که در بیشتر دستگاه ها به طور پیش فرض منحنی تکثیر به صورت محورهای سیکل بر فلورسانس Rn یا ΔRn نمایش داده می شود



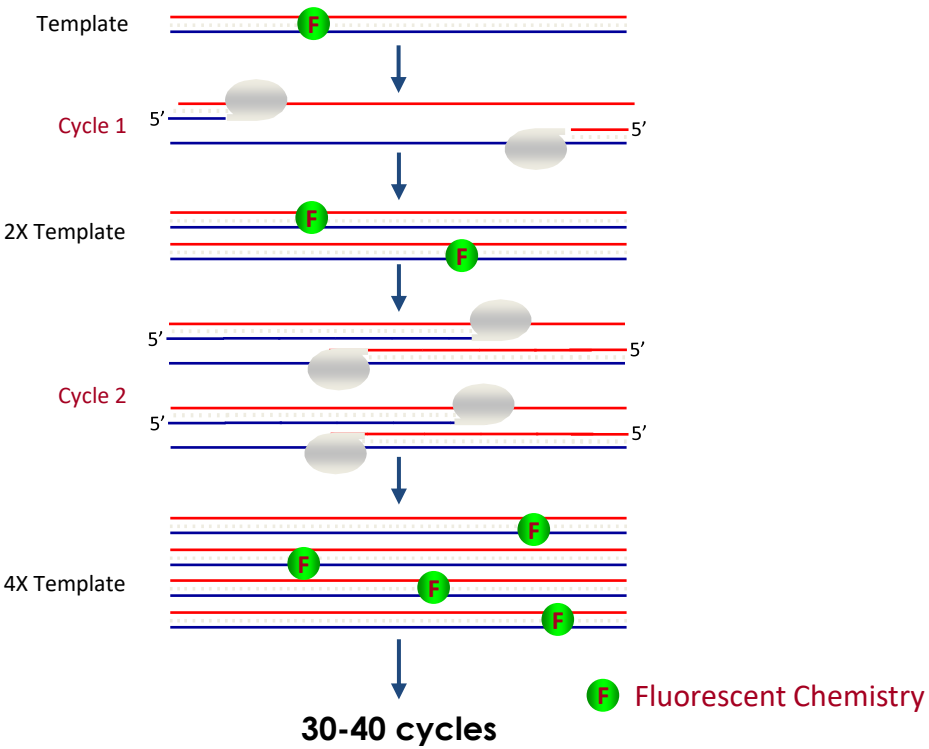
-
- Rn فلورسانس خام ناشی از گزارشگر تقسیم بر فلورسانس رنگ مرجع می باشد که سیگنال گزارشگر نرمال شده (Normalized Reporter signal) Rnنامیده می شود

- اگر Rnرا از فلورسانس پس زمینه کم کنید، ΔRnحاصل می شود.

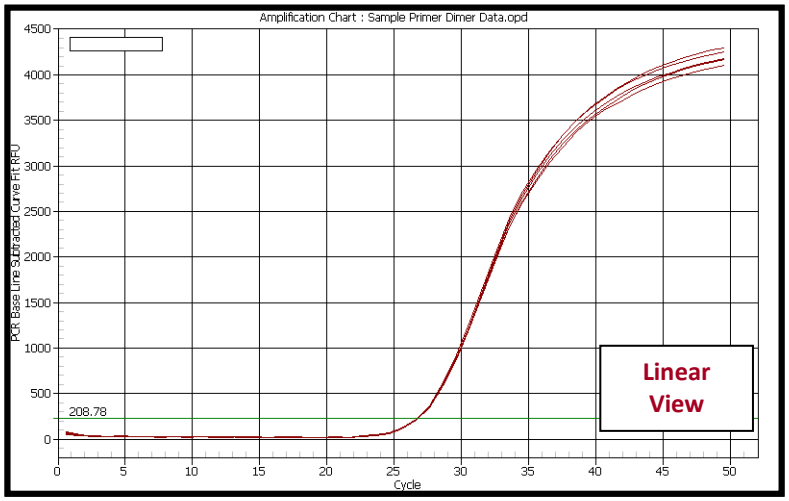
- در اکثر دستگاه ها تمامی این محاسبات بصورت خودکار صورت میگیرد و نمودار رسم میشود.

Real-time PCR

- **Quantify input nucleic acid by measuring the number of cycles required to reach a set level of product.**



Fluorescence detection



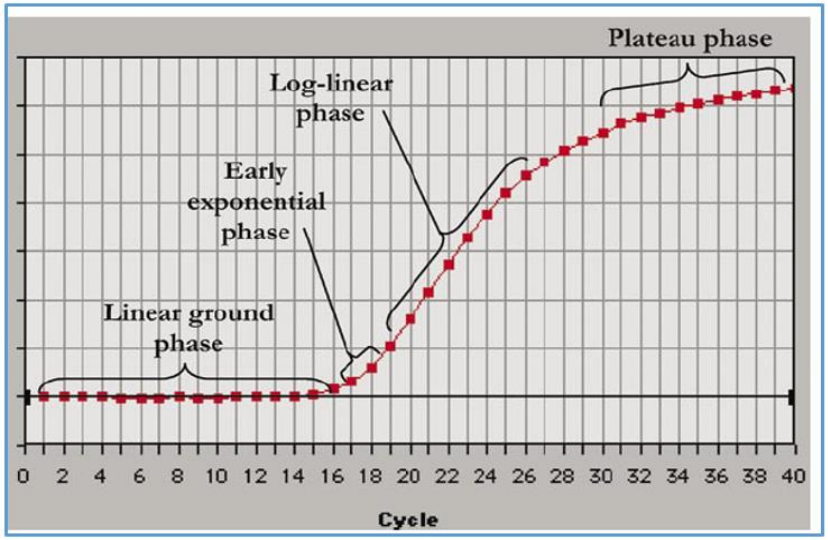
به طور کلی منحنی Real timePCR چند مرحله دارد

The Base line phase: با وجود اینکه محصول دو رشته ای وجود دارد ولی نور آن قابل ردیابی نیست.

The exponential phase: محصول دو رشته ای در هر چرخه دو برابر می شود و رشد نمایی مربوط به واکنش شروع می شود.

The linear phase: ترکیبات واکنش کم می شود و در نتیجه میزان دوبرابر شدن محصول کاهش می یابد..

The plateau phase: ترکیبات واکنش از بین می روند و افزایش در میزان فلورسنت مشاهده نمی شود. تولید محصول در این فاز به شدت کاهش می یابد.



رو شهاي رايج نشانه گذاري در Real Time PCR

- در دو دسته کلی قرار داد:

۱- روش مبتنی بر استفاده از رنگهای متصل شونده به DNA

- SYBR Green I
- Eva Green
- YO-PRO-1

۲- استفاده از پروب ها

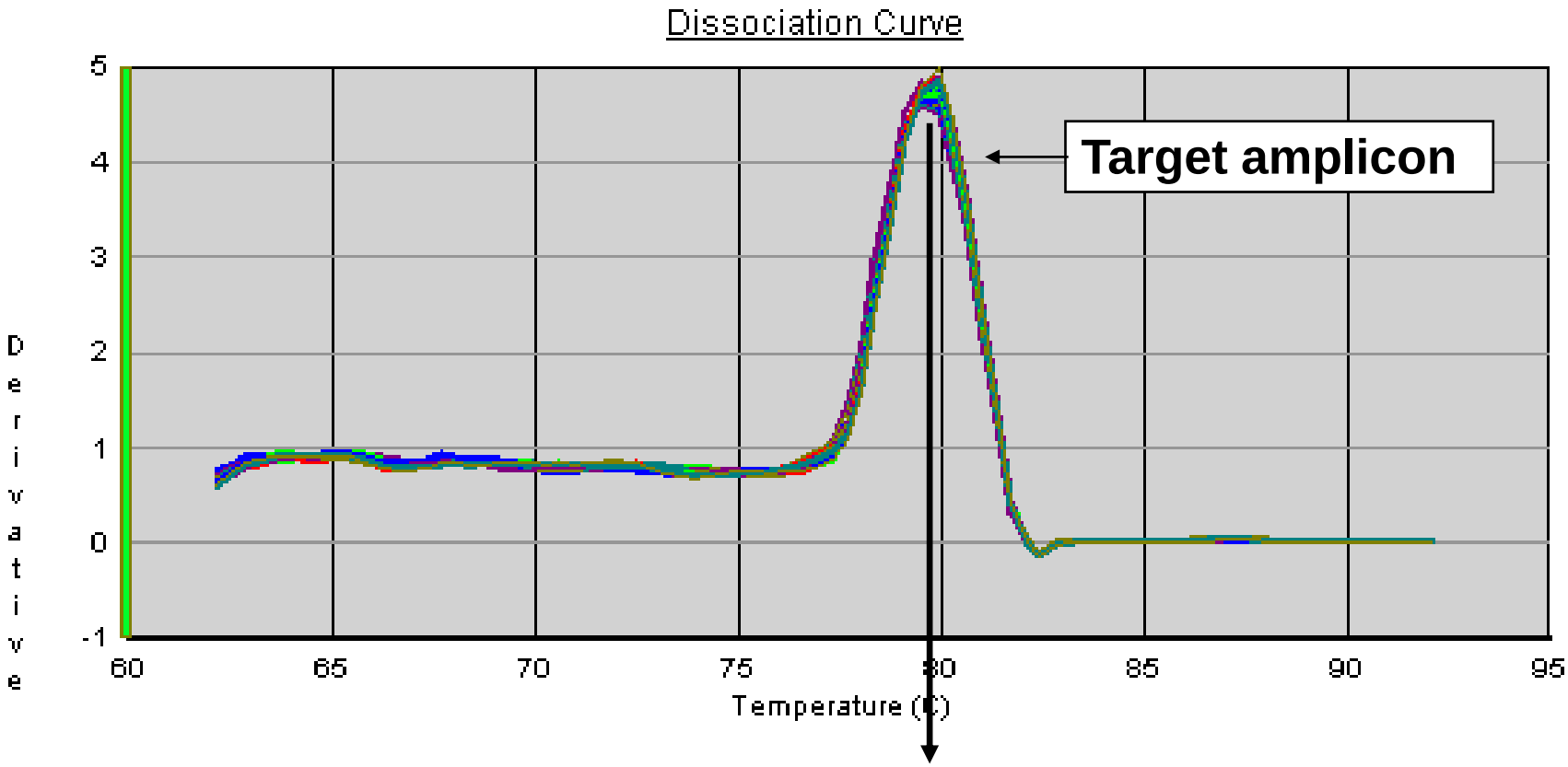
- رنگ سایبرگرین با اتصال و جایگزین شدن در DNA Minor groove در مرحله چسبیدن و تکثیر DNA، همزمان با افزایش دو رشته ای شدن DNA نور بیشتری را ساطع میکند که توسط دستگاه اندازه گیری میشود

- از آنجاییکه این ترکیب قابلیت افتراق بین محصول اختصاصی و غیر اختصاصی را ندارد باید منحنی Melt-Curve Analysis با توجه به نمودار ذوب برای هر نمونه رسم گردد.

- بدین صورت که پس از پایان PCR، دستگاه دمای محصولات را به دمای ۹٤ درجه سانتی گراد رسانده، که در این دما همهDNA ها تک رشته شده، سپس به طور منظم دما کاهش یافته و با دو رشته ای شدن DNA و جایگزینی و اتصال SYBR Green I و افزایش ناگهانی میزان فلورسانت ساطع شده، منحنی ذوب رسم میگردد که با آنالیز منحنی Mult curve می توان تمایز بین باند های غیر اختصاصی، اختصاصی و پرایمر دایمر را مشخص کرد

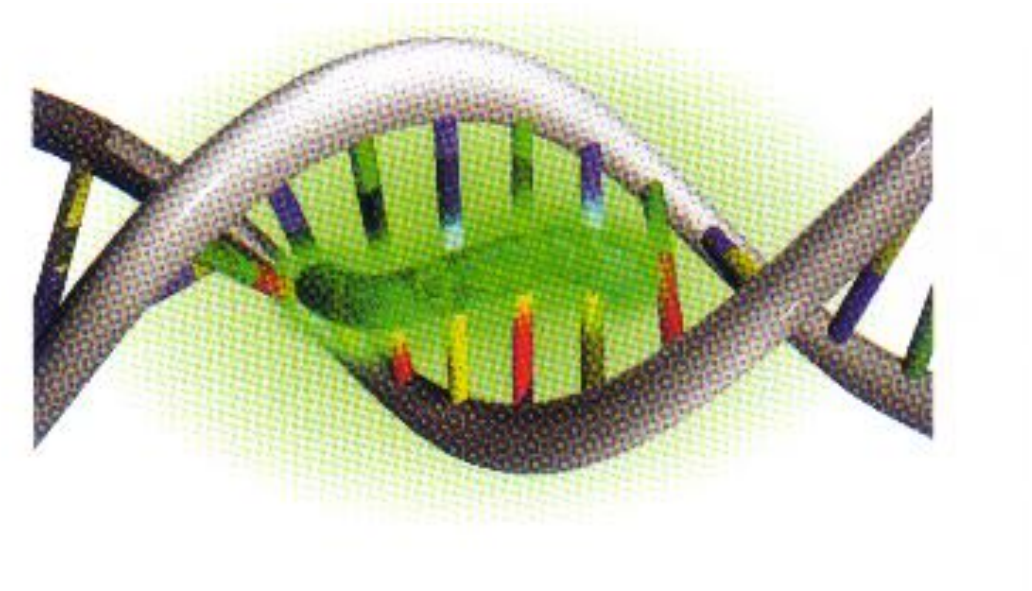
Dissociation Curve

Derivative Data View



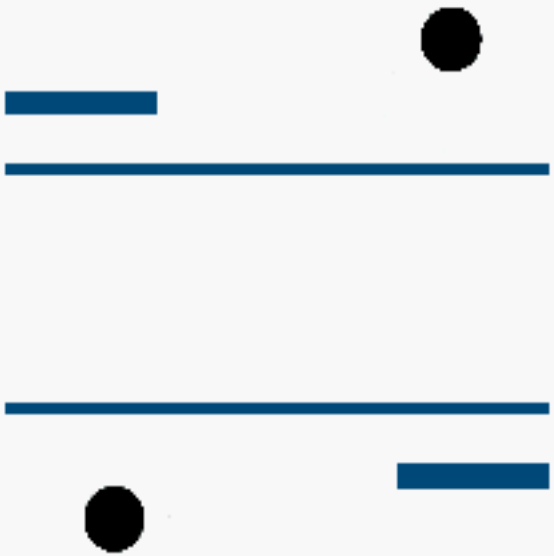
Tm = temperature when 50% dissociated

Signal Generation with SYBR® Green 1 dye

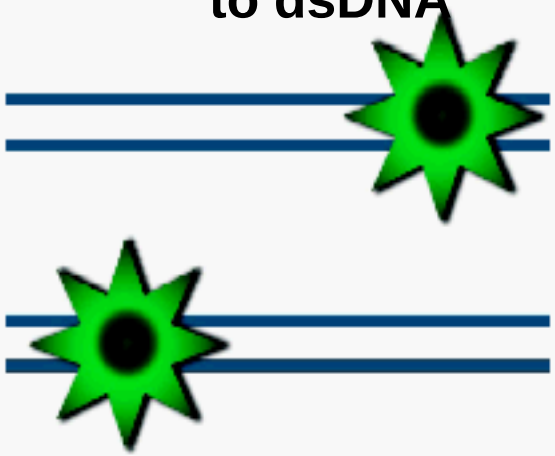


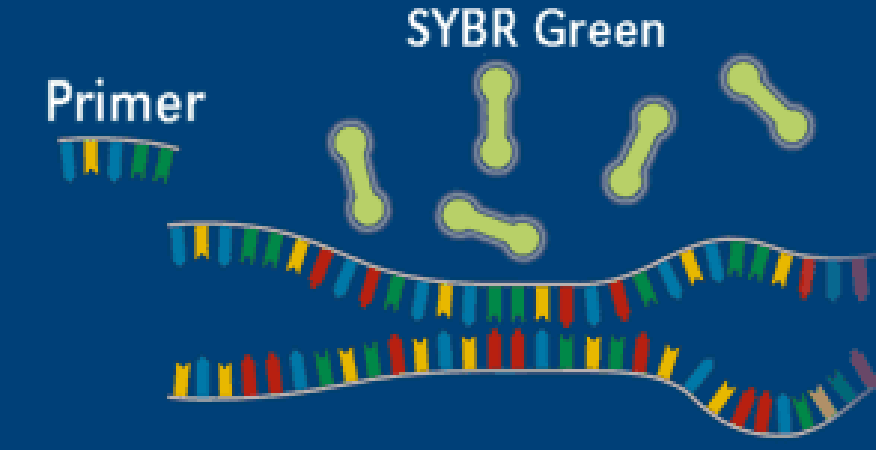
- SYBR® Green 1 dye binds to the minor groove of ds DNA
- Detects specific and unspecific products

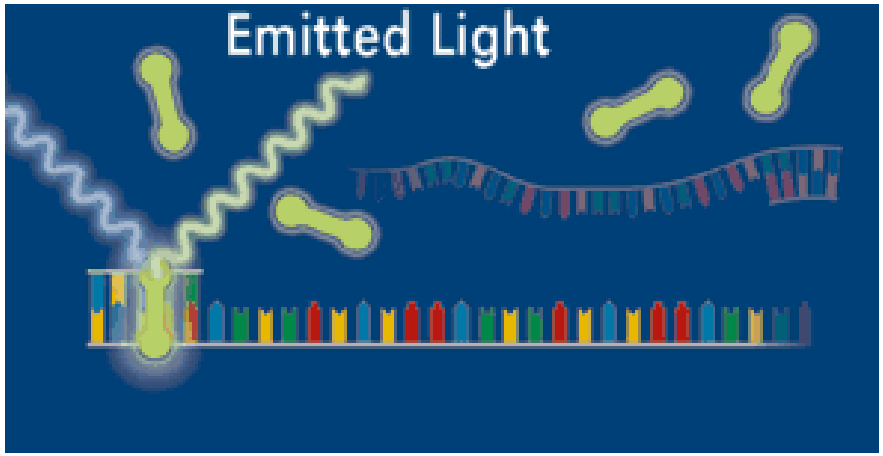
SYBR® Green Assay

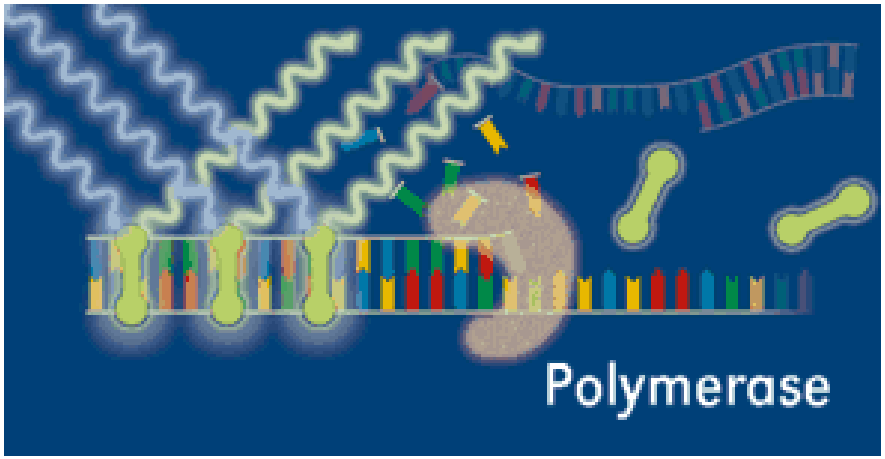


Fluoresces when bound to dsDNA



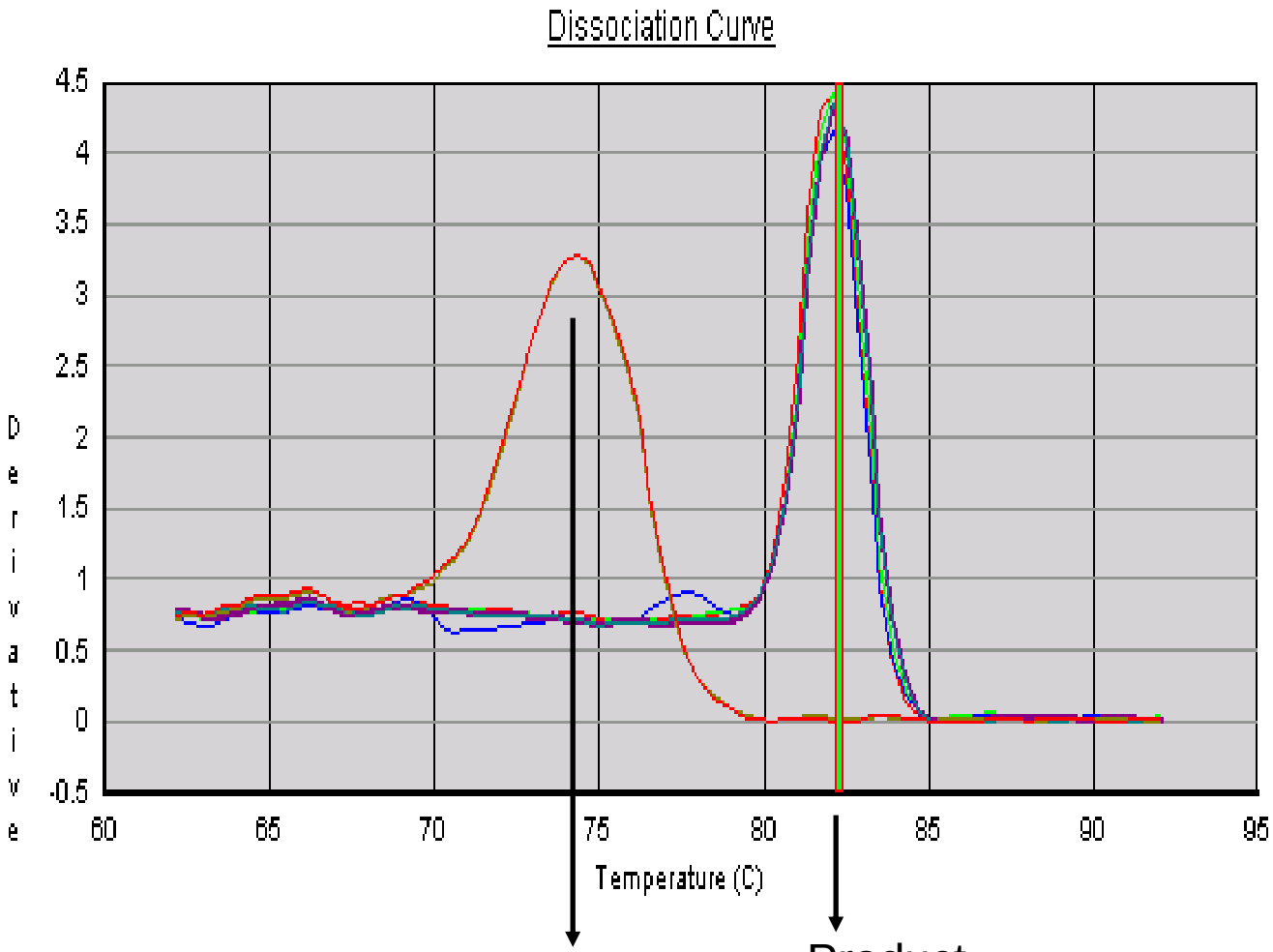

SYBR Green
Primer


Emitted Light


Polymerase

Dissociation Curve

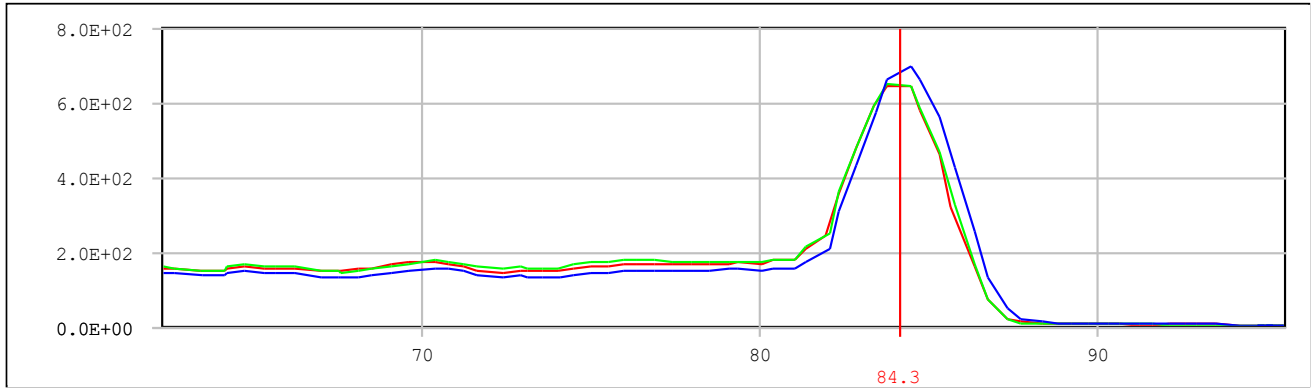
Example: Presence of Primer Dimers

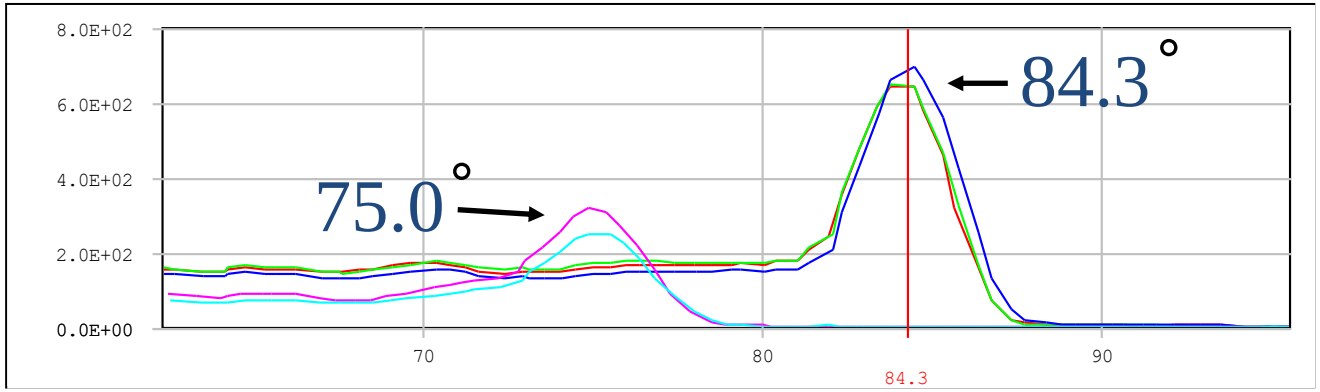


Primer dimers or aspecific product

Product

Melting Curve Analysis Can Show Specificity of Reactions





انواع پروب

- توالی های کوتاه ۱۵–۲۰ و حتی تا ۳۰ الیگونوکلئوئیدی هستند
- پروب های مورد استفاده در روش ریل تایم شامل: Molecular Beacons , TaqMan Probes , FRET Hybridization Probes و Scorpion Primers می باشند
- کاربردی ترین روش، TaqMan Probes, است
- یک Reporter در انتهای ۵ و یک Quencher درانتهای ۳ وجود دارد.
- در انتهای ۳ یک بلاکر هم وجود دارد (این بلاکر باعث می شود که پروب به عنوان پرایمر استفاده نشود).
- پروب حدود چندباز بعد از انتهای ۳ یکی از پرایمرها (Forward)طراحی می شود.

- اساس این روش خاصیت ۵′ Exonuclease Activityآنزیم Taq DNA Polymeraseمی باشد.

- آنزیم پس از نزدیک شدن به پروب با استفاده از خاصیت ۵′ Exonuclease Activityآن راتجزیه می کند.

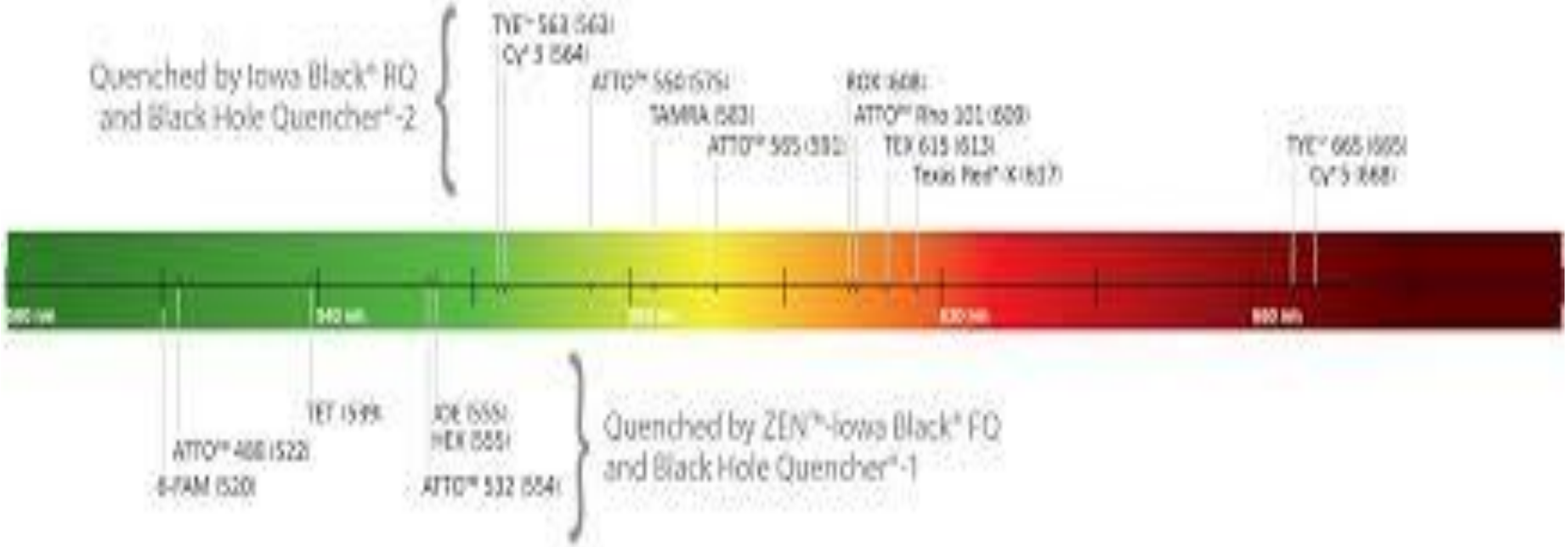
- رنگ فلوئوروسنت به انتهای َ۵ رشته الیگونوکلئوتیدی و ترکیب quencherبه انتهای دیگر رشته متصل می‌شود.

- این ترکیب وظیفه مهار سیگنال فلوئوروسنت را بر عهده دارد و این کار را با جذب انرژی از رنگ فلوئوروسنت انجام می‌دهد. این پدیده FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) نام دارد.

- وقتی پروب تجزیه شد ، Reporterاز تأثیر Quencherخارج شده واز خود فلورسانس ساطع می کند.

- در هر سیکل با آزادشدن بیشتر Reporter ماده فلورسانس بیشتری ساطع گردیده و توسط دستگاه ثبت می شود

FLUOROPHORE		DYE-5'-T EX	DYE-5'-T EM		BHQ Dye
Biosearch Blue™		352	447	BHQ-1	BHQ-0
FAM		495	520	BHQ-1	
TET		521	536	BHQ-1	
CAL Fluor® Gold 540		522	544	BHQ-1	
JOE		529	555	BHQ-1	
VIC		538	554		
HEX		535	556	BHQ-1	BHQ-1
CAL Fluor Orange 560		538	559	BHQ-1	
Quasar® 570		548	566	BHQ-2	
Cy™ 3		549	564		
NED		546	575		
TAMRA		557	583	BHQ-2	
CAL Fluor Red 590		569	591	BHQ-2	BHQ-2
Cy 3.5		581	596		
ROX		585	610	BHQ-2	
CAL Fluor Red 610		590	610	BHQ-2	
Texas Red®		587	616		
CAL Fluor Red 635		618	637	BHQ-2	
Pulsar® 650		450	650	BHQ-2	
Cy 5		649	669		
Quasar 670		647	670	BHQ-2™, BHQ-3	
Cy 5.5		675	694		
Quasar 705		690	705	BHQ-2™, BHQ-3	BHQ-3

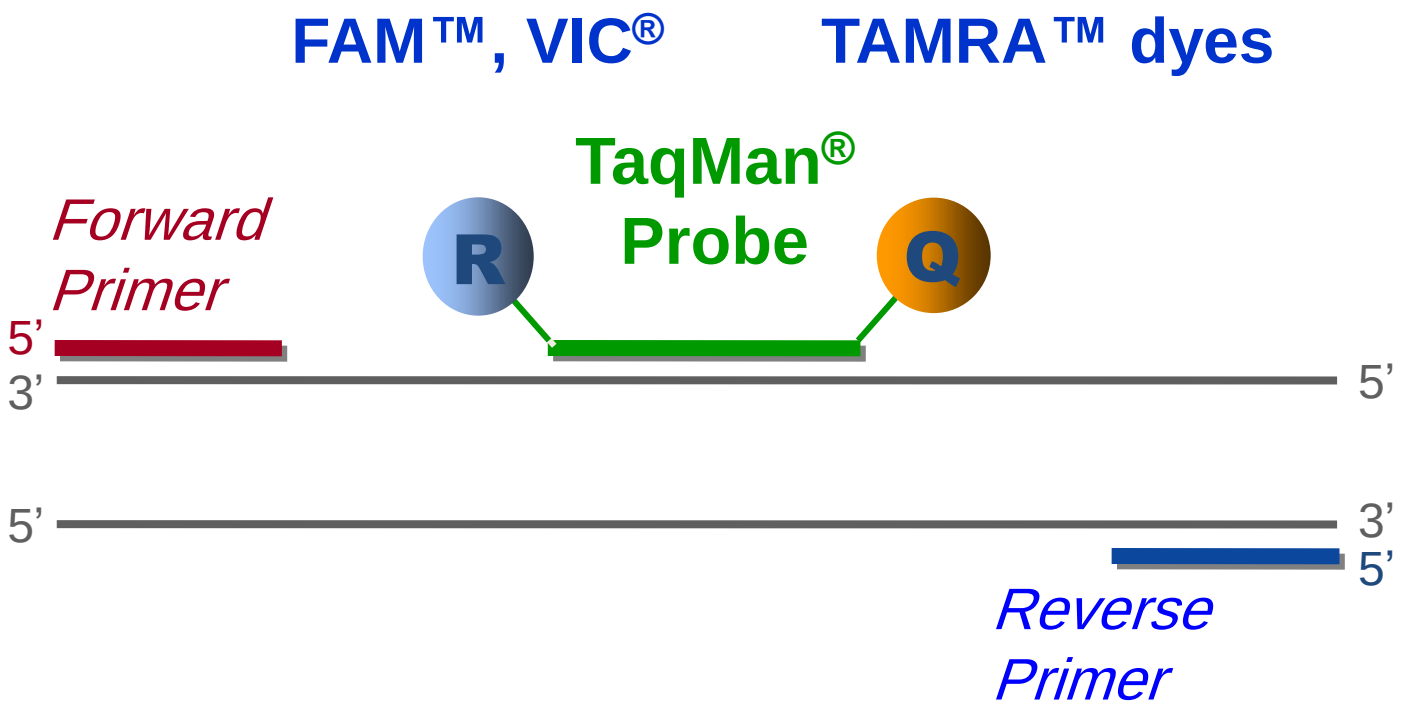

Quenched by Iowa Black® RQ
and Black Hole Quencher®-2
TYE™ 563 (563)
CY® 3 (564)
ATTO™ 550 (576)
TAMRA (583)
ATTO™ 565 (592)
ROX (608)
ATTO™ Rho 101 (600)
TEX 615 (613)
Texas Red® X (617)
TYE™ 665 (665)
CY® 5 (668)
TET (595)
ATTO™ 488 (522)
6-FAM (520)
JOE (555)
HEX (555)
ATTO™ 532 (554)
Quenched by ZEN™-Iowa Black® FQ
and Black Hole Quencher®-1

Dye Choice in Probe Design

Filter	Excitation Wv	Emission Wv
Alexa 350	350	440
FAM/SYBR Green	492	516
TET	517	538
HEX/JOE/VIC	535	555
Cy3	545	568
TAMARA	556	580
ROX/Texas Red	585	610
Cy5	635	665

5’ Nuclease Assay

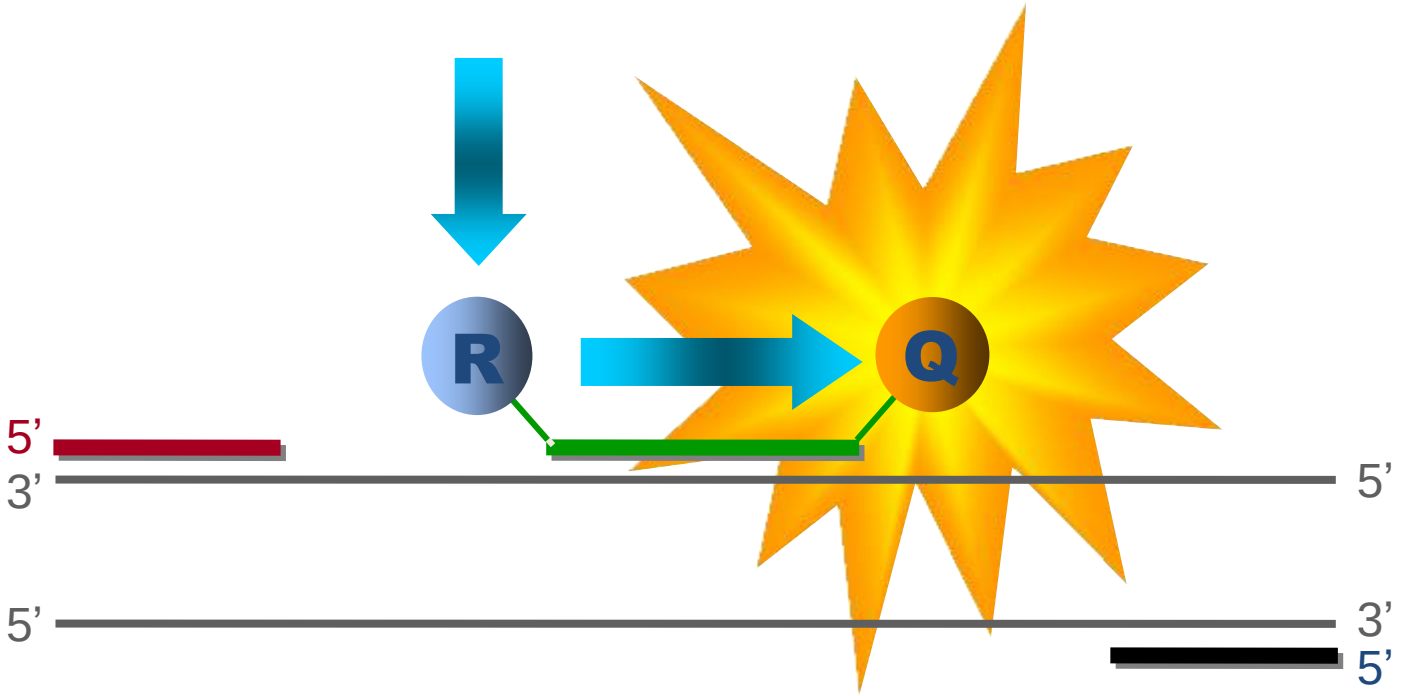
using TaqMan® probes



- PCR specificity (primer)
- Hybridization specificity (probe)

5’ Nuclease Assay

using TaqMan® probes

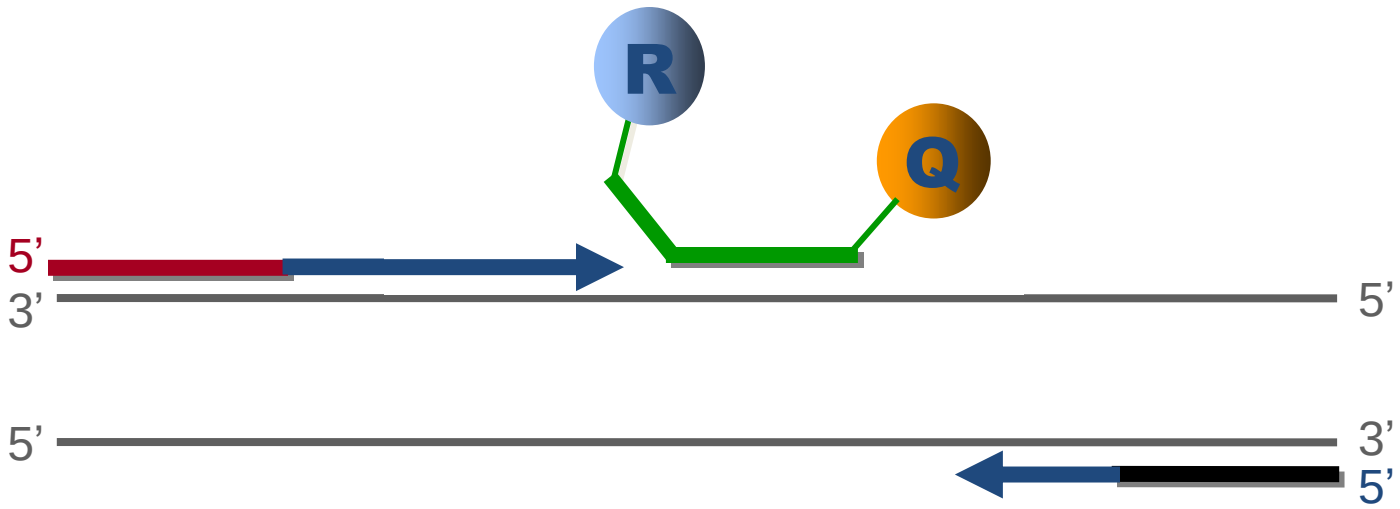


Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) from high energy to low energy dye

➔ No reporter signal with intact probe

5’ Nuclease Assay

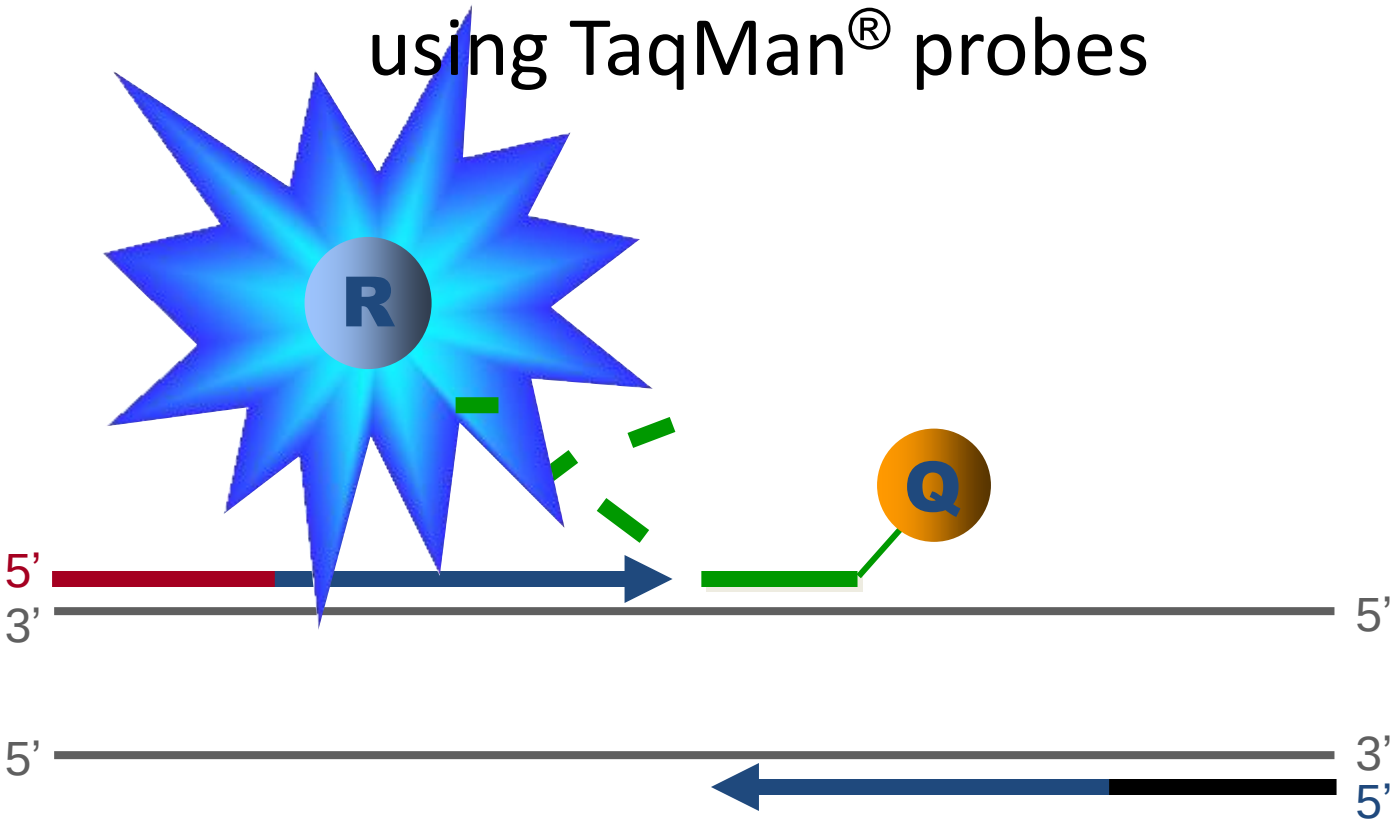
using TaqMan® probes



Displacement of probe by 5‘ nuclease activity of polymerase

5’ Nuclease Assay

using TaqMan® probes

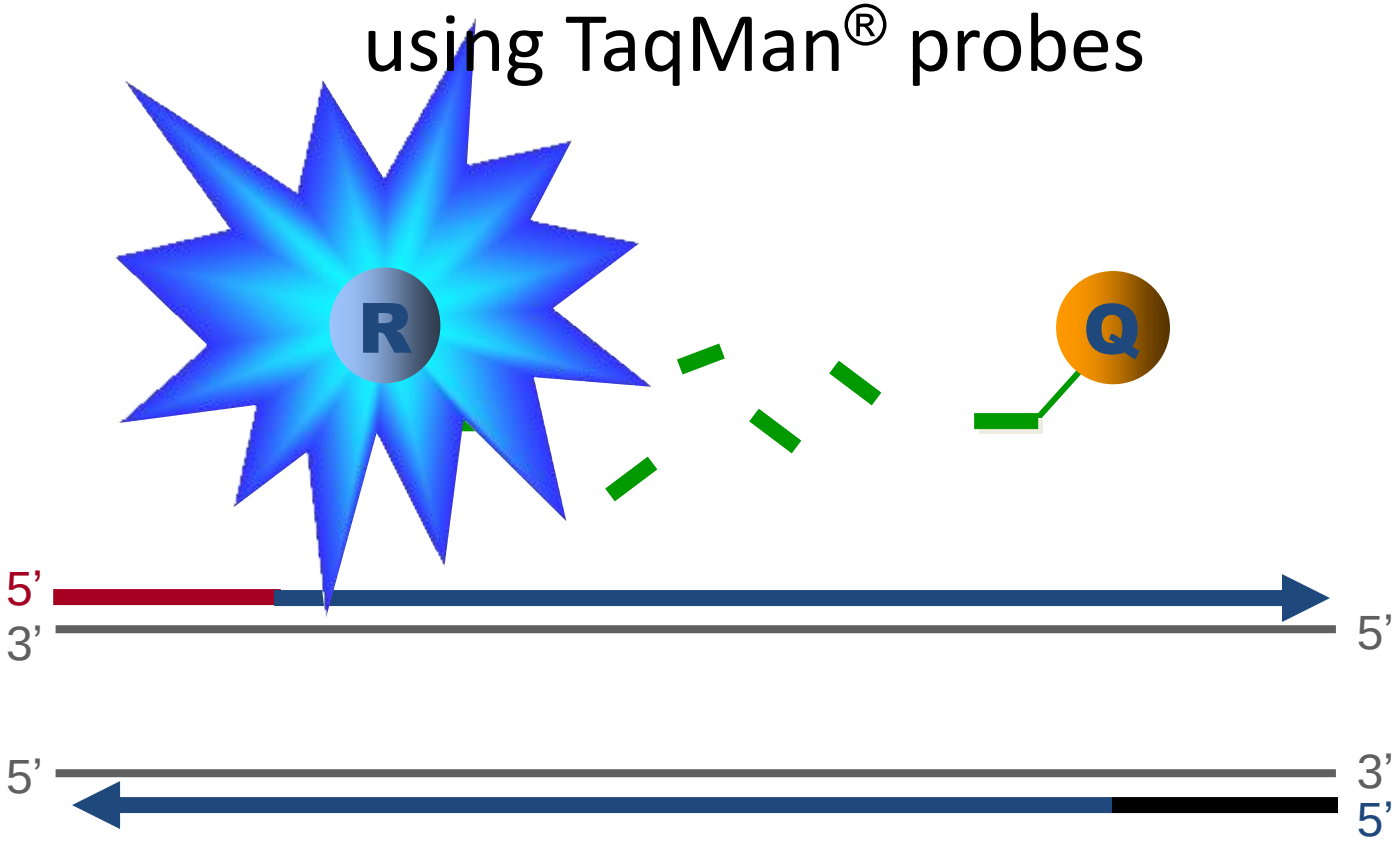


Cleavage of probe by 5‘ nuclease activity of Taq polymerase

➔ FRET disabled, generation of reporter signal

5’ Nuclease Assay

using TaqMan® probes



Polymerization completed

One reporter signal for each new DNA copy

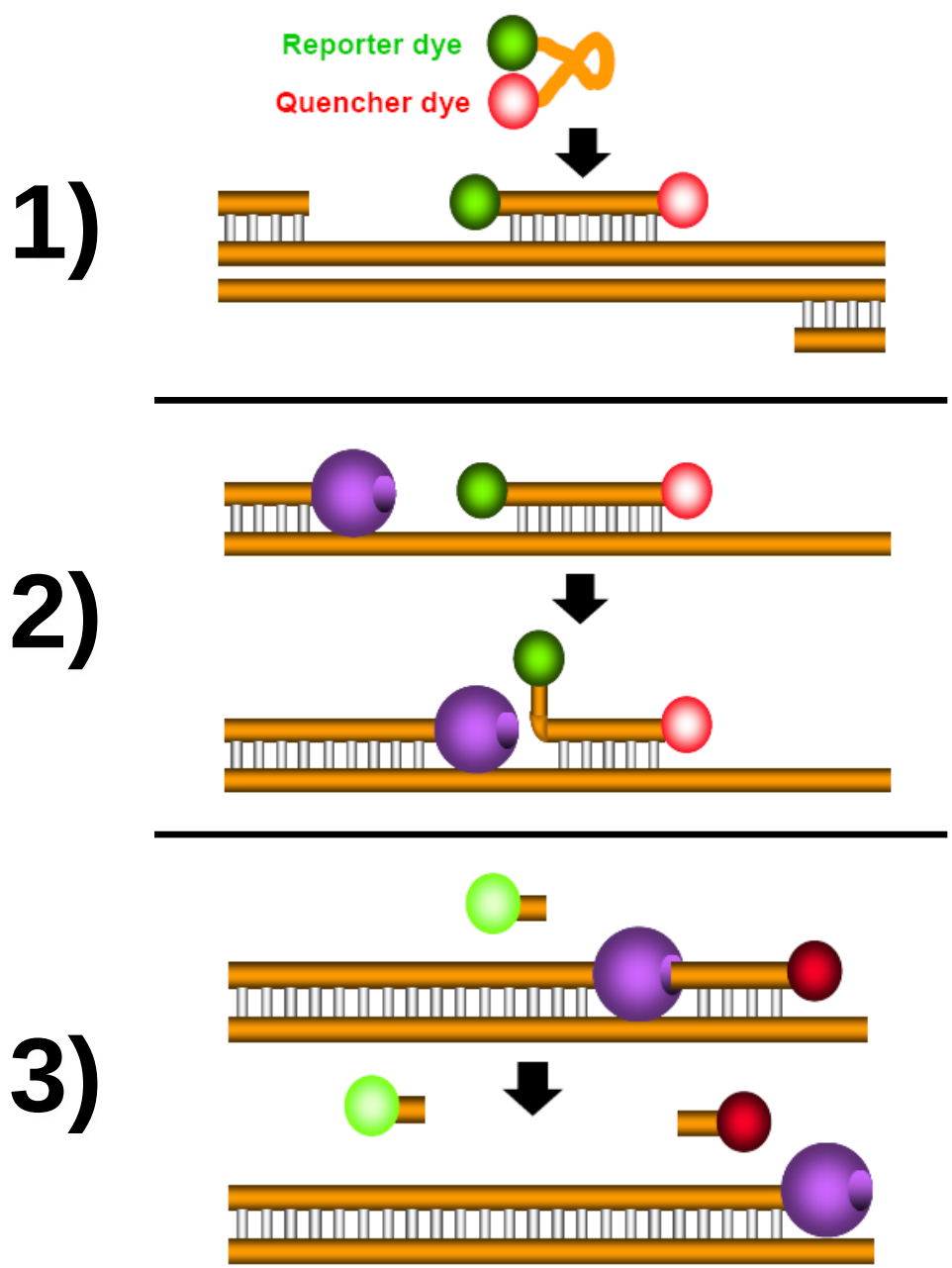
5'-nuclease activity of Taq polymerase

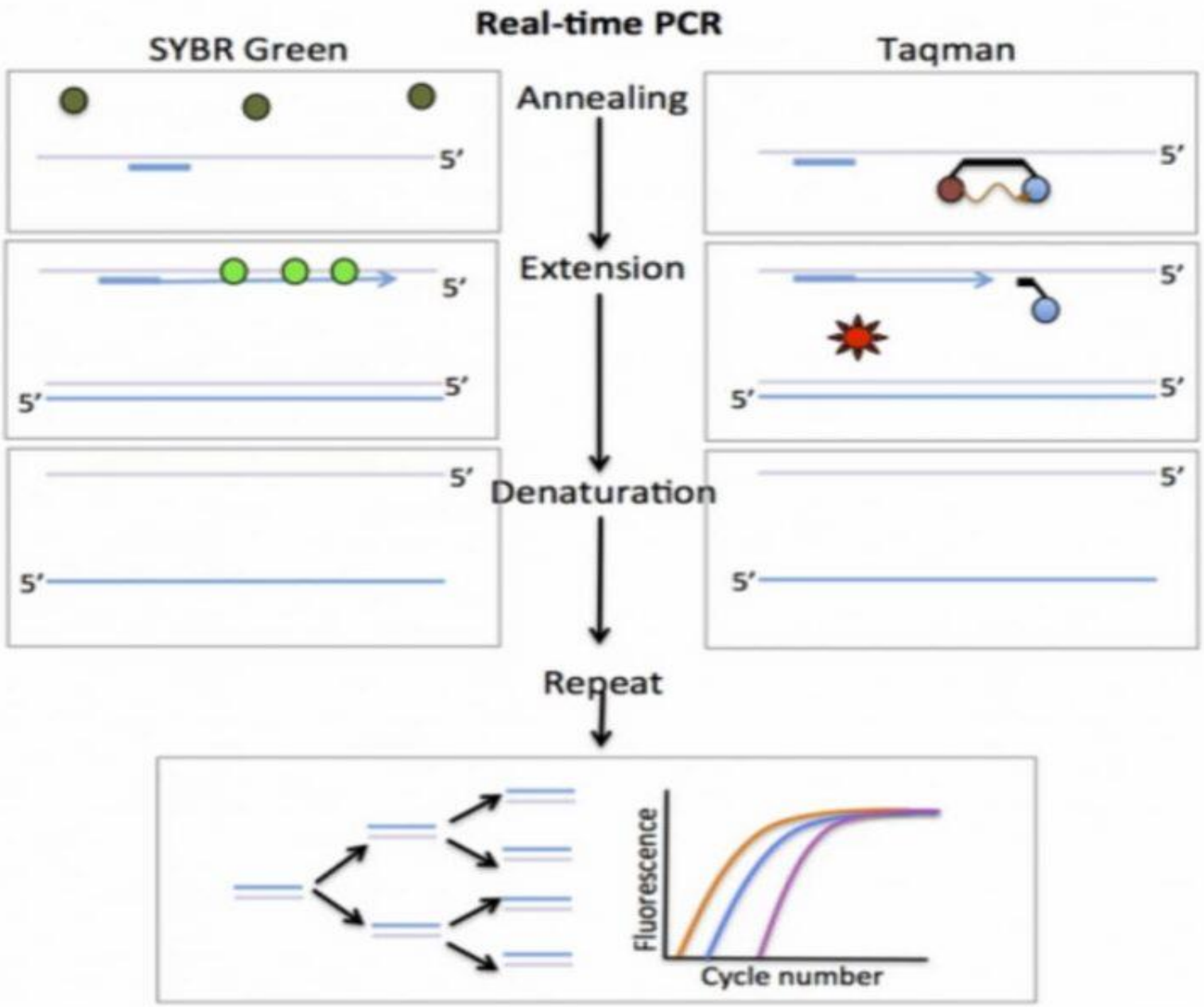
1) **Denaturation** and hybridization of probe

2) **Extension of primer and strand displacement of probe**

3) **Cleavage of probe and fluorescence from the reporter dye**

Fluorescence from reporter dye is directly proportional to the number of amplicons generated

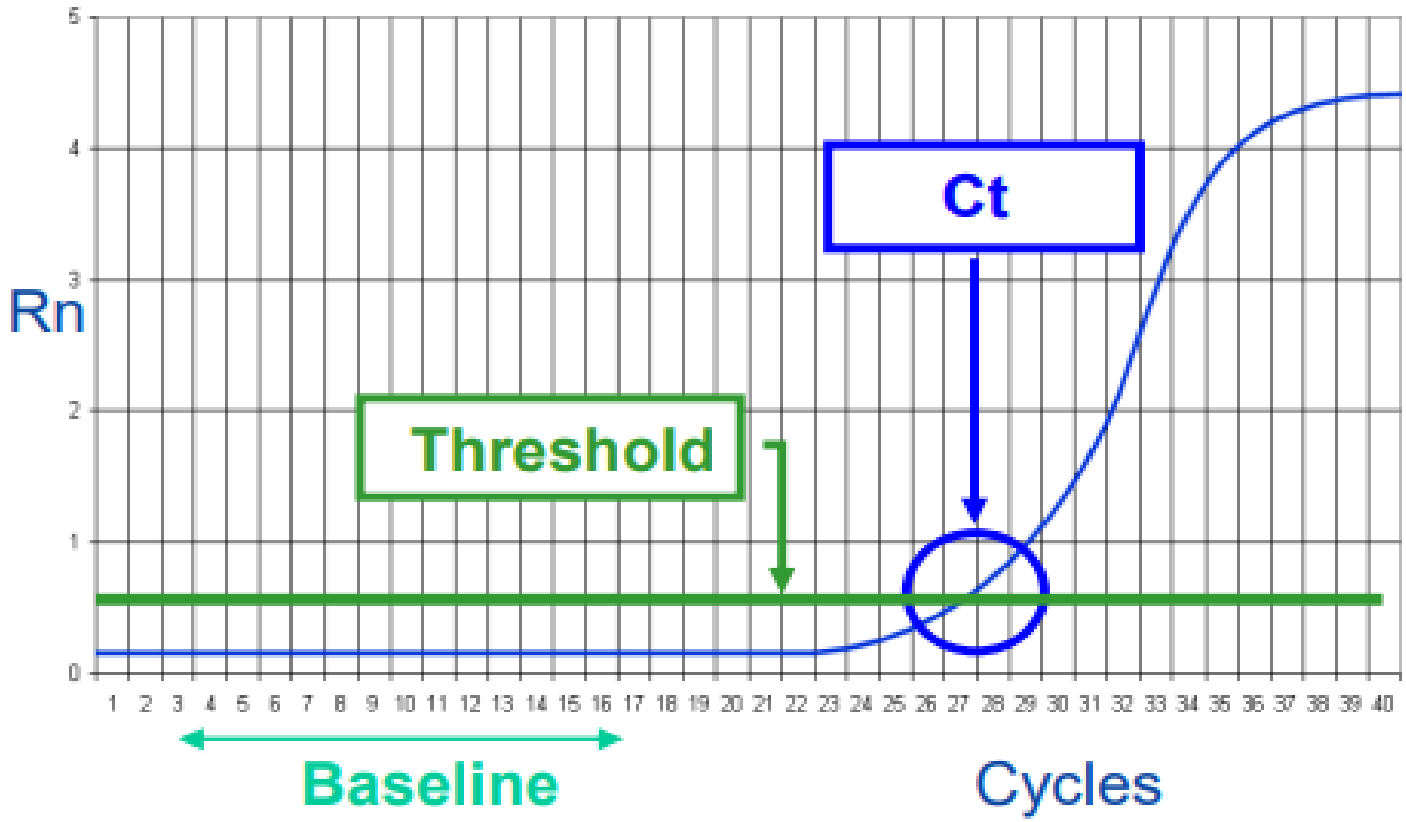



Real-time PCR
SYBR Green
Taqman
Annealing
Extension
Denaturation
Repeat
5'
Fluorescence
Cycle number

- در جایی که گراف نمونه ها از خط زمینه یا پایه جدا میشوند میتوان خطی رسم کرد که آنرا Thresholdمی نامند.
- به اولین چرخه‌ای که شدت فلورسنت بیشتر از خط پایه باشد چرخهٔ آستانه یا CTگویند.
- عدد CTبا مقدار الگوی اولیه رابطهٔ معنی‌دار دارد و از روی آن می‌توان مقدار mRNAاولیه را مورد تخمین قرار داد.

- به عبارت دیگر در فاز اولیه مرحله تصاعدی مقدار فلورسنت افزایش می یابد تا به آستانه‌ای می رسد، که به مقدارمشخصی از سطح backgroundبالاتر است، این چرخه (سیکلی از PCRکه قطعه تکثیر از حد آستانه عبور می کند) به عنوان CTشناخته می شود.

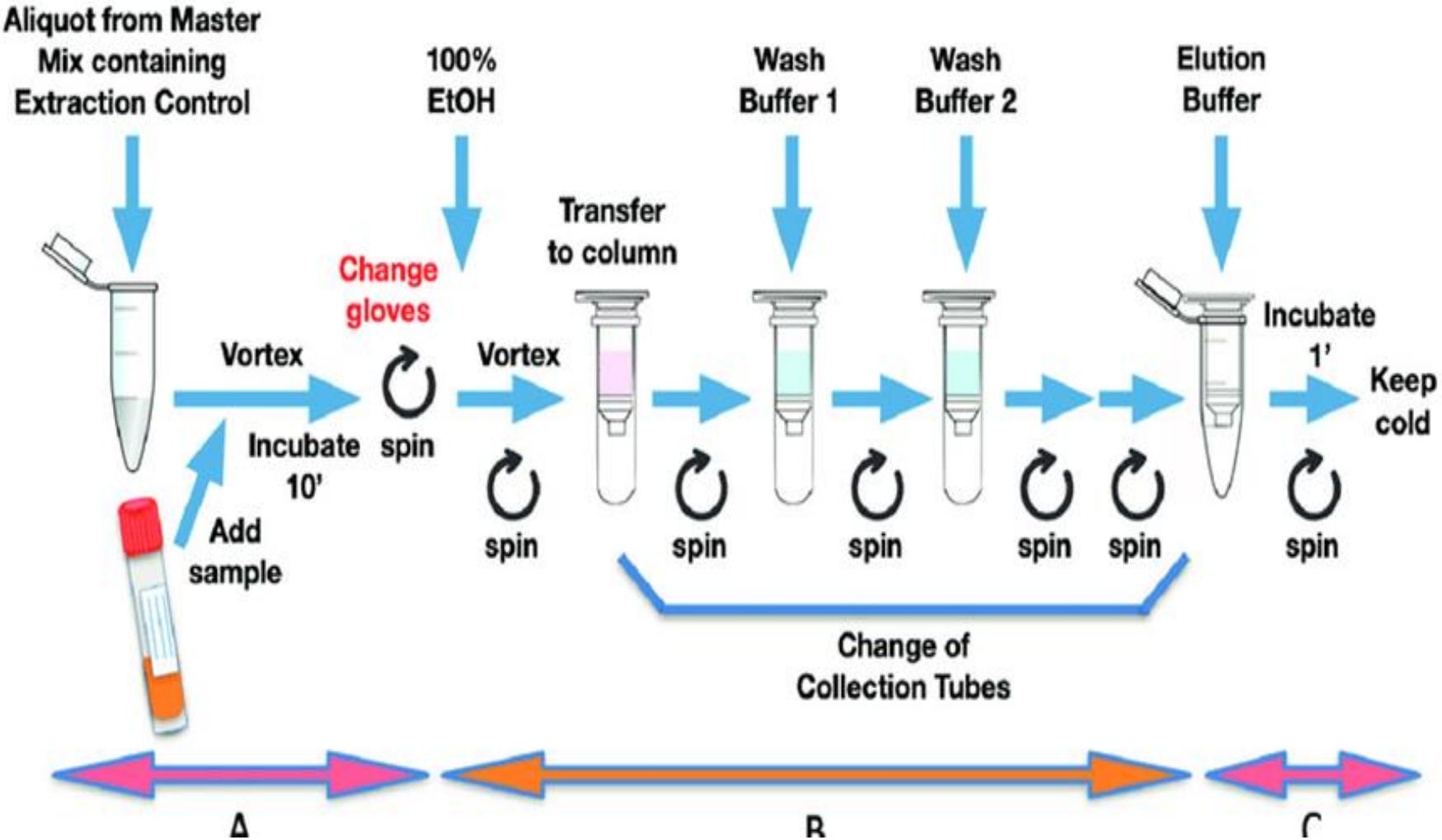
Concept of Threshold and Ct Value



روش های تشخیص اسید نوکلئیک سارس کروناویروس۲:

- تشخیص اسید نوکلئیک راه اصلی برای یافتن توالی اسید نوکلئیک اختصاصی ویروس سارس کروناویروس۲ در نمونه‌های بیمار است
- تکنیک‌های تشخیصی زیادی وجود دارد، از جمله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی real-time (RT-qPCR)، فناوری‌های مبتنی بر CRISPR، توالی‌یابی، و فناوری‌های هیبریداسیون
- تجزیه و تحلیل ۱۱۲ روش تشخیصی برای RNA سارس کروناویروس۲ نشان داد که ۹۰٪ از این روش‌های تشخیص از فناوری PCRیا RT-PCR، ٦٪ از فناوری تقویت همدما(Isothermal amplification)، ۲٪ از فناوری CRISPR و ۲٪ از فناوری هیبریداسیون استفاده می‌کنند.

استخراج ژنوم کوید-۱۹



complementary DNA(cDNA)

- در وهله اول برای انجام آزمایش real-time PCR نیاز به نمونه هایی داریم که **سنتز cDNA** شده اند

- قبل از فرآیند سننتز cDNA بایستی از نمونه ها، RNA استخراج کرده باشیم و RNA استخراج شده را مورد سنجش غلظت یا خلوص قرار دهیم(اسپکتروفتومتری) که ببینیم نمونه های RNA که استخراج شدند قابلیت این که ما بخواهیم با آنها cDNA را سنتز کنیم، دارند یا خیر و در مرحله بعد سنتز cDNA را انجام می دهیم

- مولکول RNAیا ریبونوکلویک اسید به دلیل داشتن اکسیژن در کربن شماره ۲ و همچنین تک رشته و کوتاه بودن آن، نسبت به مولکول های DNAواکنش پذیر تر بوده و تخریب پذیری بالایی دارد.

- از آنجا که mRNAناپایدار است، و در مدت زمان کمی از بین می رود، به همین دلیل یکی از اهدافی که cDNAانجام می دهیم این است که mRNAرا از حالت ناپایدار تبدیل به فرم پایدار کنیم تا مدت زمان نگهداری mRNAبیشتر شود.

- برای این کار از روش نسخه برداری معکوس استفاده میشود و به یک آنزیم پلی مرازی DNA)پلی مراز وابسته RNA) نیاز داریم که RNAرا به cDNAتبدیل کند (Reverse transcriptase)

- مهمترین آنزیمی هایی(آنزیم نسخه بردار معکوس) که برای این کار استفاده میشود، آنزیم MMLV و AMV هستند که مقاومت دمایی بالایی دارند

- هر چه مقاومت دمایی آنزیم (thermal stability) بالاتر باشد کاراتر و بهتر است زیرا در دماهای بالاتر، ساختارهای دوم RNA باز می شود و بازده تولید cDNAافزایش می یابد.

از دیگر مواد مهم برای سنتز cDNA، پرایمرها هستند. برای این کار ۳ نوع پرایمر وجود دارد:

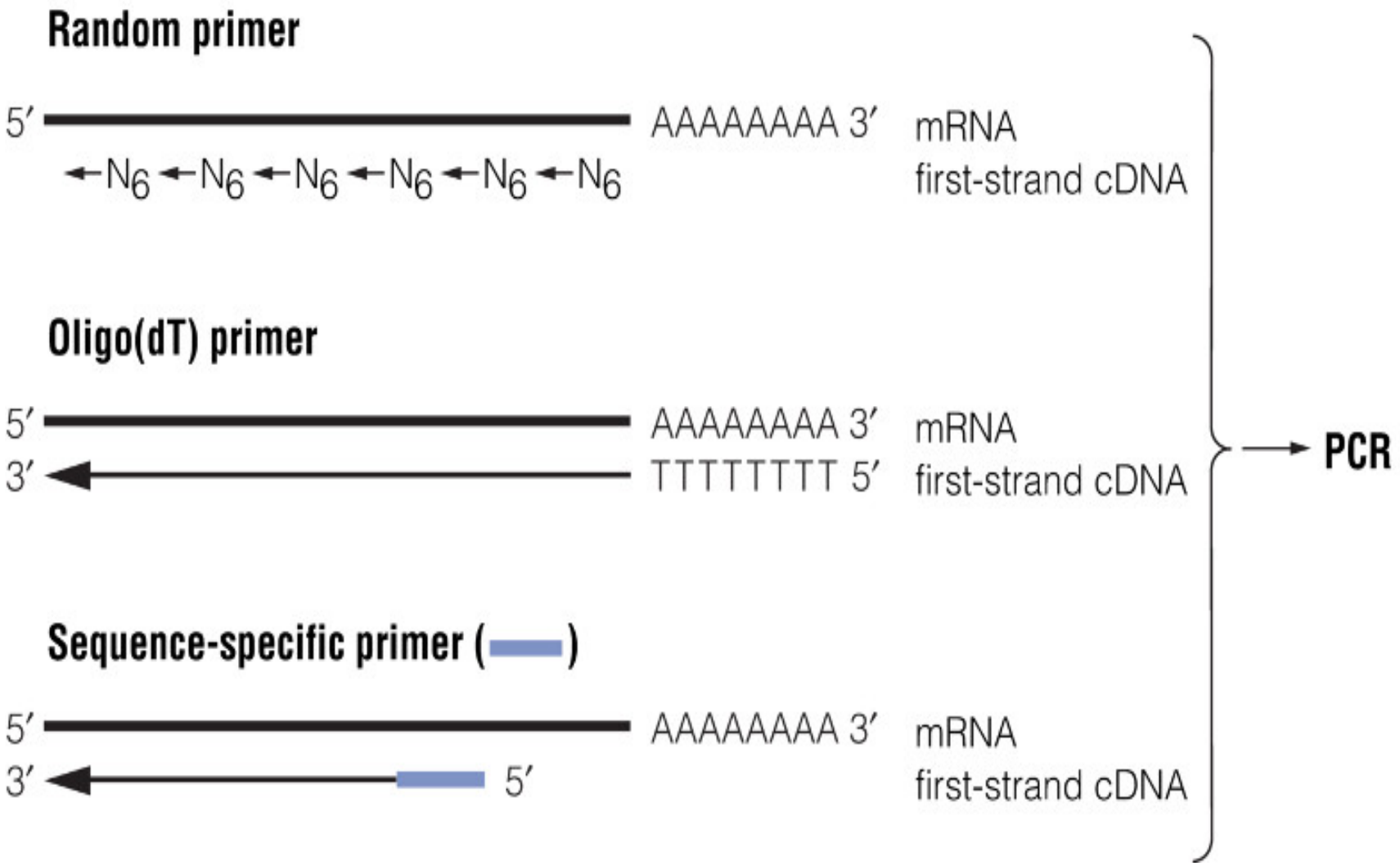
- **پرایمرهای رندوم هگزامر** (**Random Hexamer):** توالی های کوچک ٦ نوکلئوتیدی که به صورت تصادفی به هر جایی از RNA امکان اتصال دارند. این پرایمرها زمانی که بخواهیم بیان تمام ژن ها را تحت هر شرایطی با هر ژن کنترلی حتی rRNA ۱۸s بررسی کنیم کاربرد دارد.

- **پرایمرهای OligodT:** این پرایمرها به انتهای mRNA دارای توالی polyA متصل می شوند.

- **پرایمرهای اختصاصی**: این پرایمرها برای نقاط شناخته شده ای از mRNAها با توالی مشخص طراحی می شوند و در واقع باعث بهینه سازی توالی مورد نظر می گردند

Primers	Selection Guidelines
Oligo $d(T)_{16}$	• Use to reverse transcribe only eukaryotic mRNAs and retroviruses with poly-A tails • Avoid long mRNA transcripts or amplicons greater than 2 kilobases upstream
Random primers	• Try first for use with long reverse transcripts or reverse transcripts containing hairpin loops • Use to transcribe all RNA (rRNA, mRNA, and tRNA)
Sequence-specific reverse primers	• Use to reverse transcribe RNA-containing complementary sequences only • Use in one-step reactions

First Strand Synthesis:



- مواد دیگری که در سنتز cDNAنقش دارند شامل
- نوکلئوتیدها(dNTPها)
- بافر
- آنزیم RT
- آنزیم ریبونوکلئاز
- RNase Hکه وظیفه ی جداسازی دو رشته ی RNAو cDNAسنتز شده از هم را دارد، می باشد.
- معمولا همه این مواد به صورت مخلوطی در کیت های سنتز cDNAدر ویالی تحت عنوان **Master Mix**موجود می باشد و نیازی به افزودن آن ها به صورت جداگانه نیست.

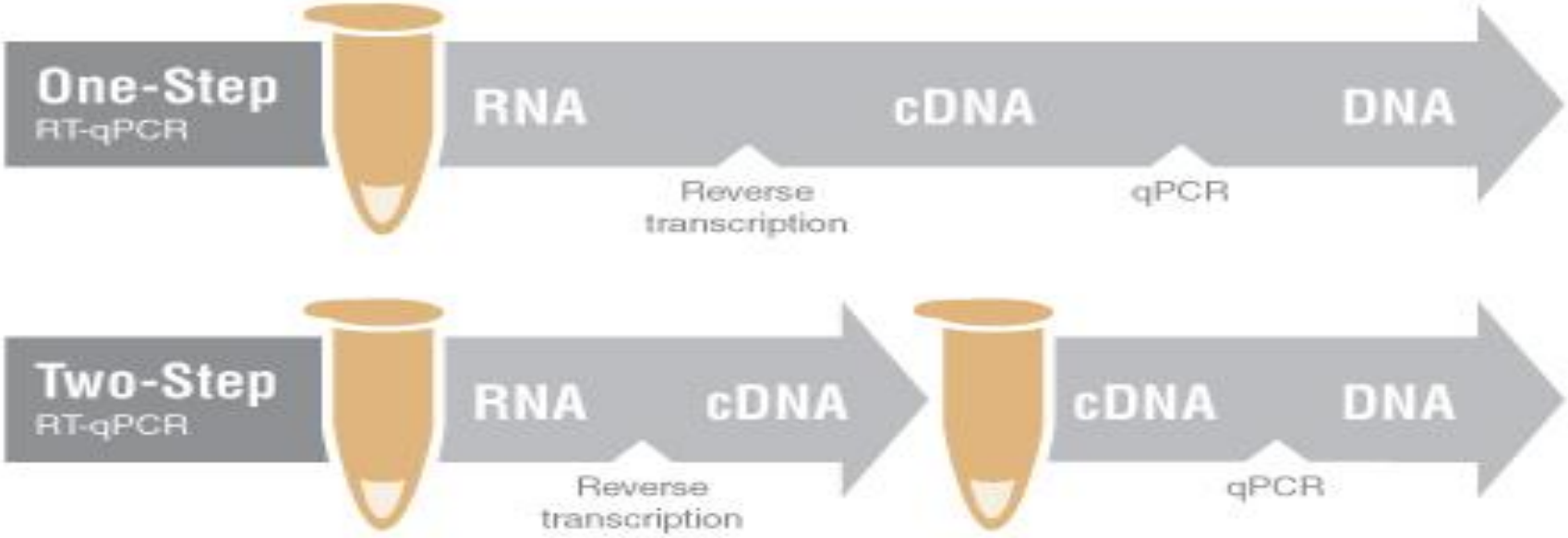
- برای انجام آزمایش سنتز cDNA، برخی کیت ها به صورت One stepو برخی Two stepمی باشند.

- در حالت Two step: ابتدا سنتز cDNAدر یک ویال انجام می شود
- سپس PCRمعمولی در جهت بررسی بیان ژن cDNA سنتزشده در ویالی دیگر انجام می شود.

- این کیت ها دقت بیشتری دارند و باعث آسانتر شدن Trouble shootingدر هر مرحله می شوند.

- در حالت One step: همه ی مراحل سنتز cDNAتا بیان ژن در یک ویال انجام می گیرد و برای افرادی که تسلط زیادی دارند مناسب تر است.
- RNAاستخراج شده جهت سنتز cDNAباید کیفیت و غلظت مناسبی داشته باشد چون چیزی معادل ۱ µgیا همان ۱۰۰۰ ngاز RNAدر هر بار استفاده جهت سنتز مورد نیاز است.
- سپس RNAمورد نظر را با موادی که در بالا گفته شد بر روی یخ مخلوط کردیم ویال را به دستگاه ترموسایکلر منتقل می کنیم تا دماهای لازم را با برنامه زمانی که بسته به کیت متفاوت است اعمال کنیم.

complementary DNA(cDNA)



- سیستم واکنش RT-qPCR برای تشخیص کوید ۱۹، شامل حد اقل یک جفت پرایمر اختصاصی و یک پروب TaqMan اختصاصی برای اسید نوکلئیک هدف است.

- بر اساس اطلاعات ژنوم سارس کروناویروس۲، تکنیک‌های مختلف RT-qPCR برای شناسایی مناطق خاص ژن ویروسی با RNA استخراج‌شده از نمونه‌های بالینی طراحی شد.
- در ابتدا، سه ژن هدف، یعنی چارچوب خوانش باز 1ab (ORF1ab)، نوکلئوپروتئین (N) و انولوپ (E)، از طریق RT-qPCR برای دستیابی به اختصاصیت و حساسیت بالا مورد ارزیابی قرار گرفتند.
- نتایج نشان داد که تکنیک‌های مبتنی بر ژن ORF1ab و N اختصاصی هستند و دقیقاً با ژن‌های هدف در سارس کروناویروس۲ مطابقت دارند.

- RT-qPCR مبتنی بر ژن E واکنش متقاطع را با سایر ویروس‌های بتا کرونا، مانند سارس کروناویروس نشان داد.

- بنابراین، RT-qPCR مبتنی بر ژن E به عنوان یک ابزار غربالگری جهانی برای دودمان بتاکرونا ویروسها، از جمله سارس کروناویروس، سارس کروناویروس۲، کروناویروس شبه‌سارس خفاش و بقیه پیشنهاد شد.

- برای جلوگیری از منفی کاذب ناشی از جهش ژن، دو ژن هدف ORF1ab و Nانتخاب شد.
- علاوه بر این، RT-qPCR مبتنی بر ژن ORF1ab و N استانداردهایی هستند که در دستورالعمل‌های فنی تستهای آزمایشگاهی کووید-۱۹ در چین توصیه و شرح داده شده‌اند و به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

- تایید آزمایشگاهی موارد مثبت مستلزم نتایج مثبت RT-qPCR برای هر دو ORF1ab و N در یک نمونه، یک نتیجه مثبت RT-qPCR برای تنها یک هدف (ORF1abیا N) در دو نوع نمونه، یا دو نتیجه مثبت از یک نمونه است.
- قابل ذکر است، نتایج منفی تشخیص اسید نوکلئیک نمی‌تواند عفونت سارس کروناویروس۲ را رد کند. بنابراین، عوامل تداخل باید با دقت در نظر گرفته شوند

- اهداف تشخیص اسید نوکلئیک سارس کروناویروس۲ توصیه‌شده توسط هر کشور ممکن است متفاوت باشد
- CDC چین مناطق ژن ORF1ab و N را به عنوان ژن‌های هدف برای تشخیص توصیه می‌کند
- در حالی که سه هدف در ژن N به عنوان ژن‌های هدف توسط CDC ایالات متحده و موسسه ملی بهداشت در تایلند توصیه می‌شود
- ژن‌های RNA پلیمراز وابسته به RNA،(RdRP),E,و N به عنوان ژن‌های هدف در آلمان
- و دو هدف در RdRP به عنوان ژن‌های هدف توسط انستیتو پاستور فرانسه توصیه می‌شوند
- مؤسسه ملی بیماری‌های عفونی در ژاپن، ژن‌های ORF1a، N و S را به‌عنوان ژن‌های هدف برای تشخیص توصیه کرده‌است

برخی از کیت های مورد استفاده برای تشخیص بیماری کوید ۱۹

کیت تشخیصی	ژن‌های هدف	کنترل داخلی(Rnase P)
Biosensor nCoV	RdRp: FAM E: JOE(VIC,Hex)	Cy5
lighmixSarbecov Roche	E: FAM	660طول موج
2019-nCoV	N: FAM RdRp: VIC	Cy5
COVITECH	E: FAM S: ROX	Hex
Pishtazteb	N: Hex RdRp: FAM	ROX

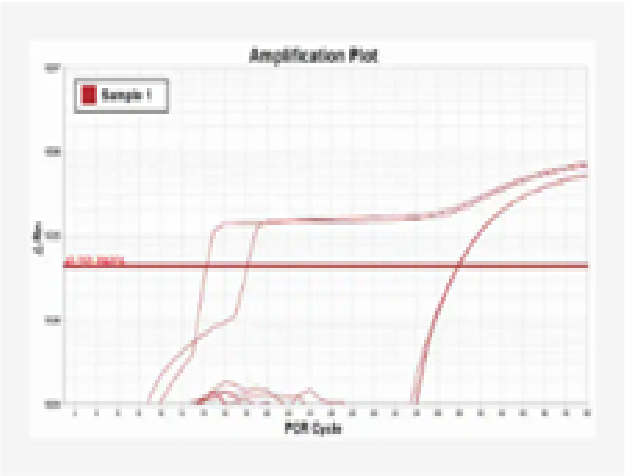
برخی کیت های تشخیصی کوید و انفلوآنزا

کیت تشخیصی	ژن های هدف	کنترل داخلی(Rnase P)
پیشتاز طب	Flu A: ROX Flu B: Hex/ Vic SARS-COV-2 : FAM	CY5
امیر پیوند	Flu A/B: FAM SARS-COV-2 : JOE(VIC,Hex)	ROX
هانا	FLU A: FAM FLU B: JOE(VIC,Hex) SARS-COV-2 : texas Red/ROX	CY5
روژه	FLU A: FAM FLU B: Yakima Yellow SARS-COV-2 : texas Red/ROX	CY5

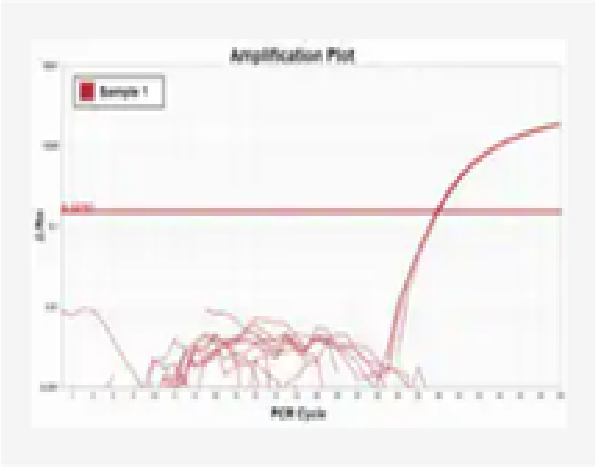
ROX Dye- Normalization

- Bubbles in wells
- Evaporation
- Condensation or droplets
- Instrument issues, such as electrical surges

Bubbles in wells without ROX dye normalization



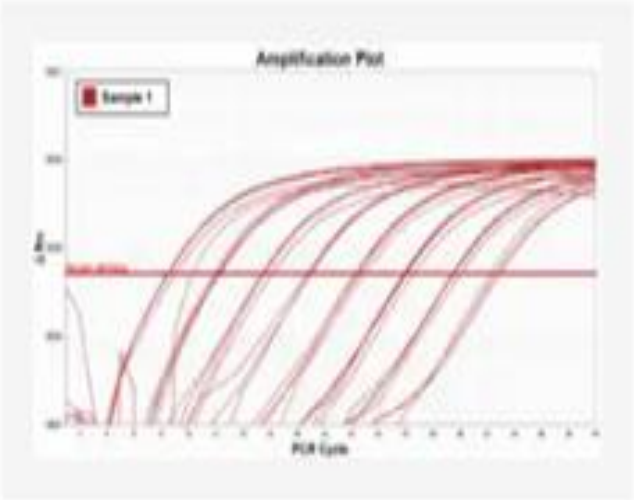
Bubbles in wells with ROX dye normalization



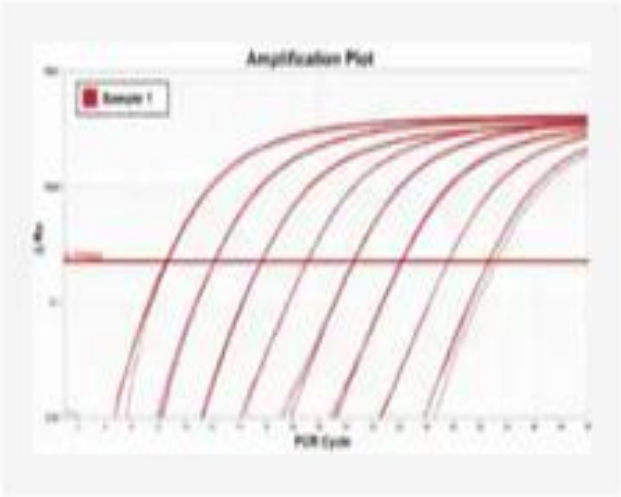
ROX Dye- Normalization

ROX dye increases precision of technical replicates

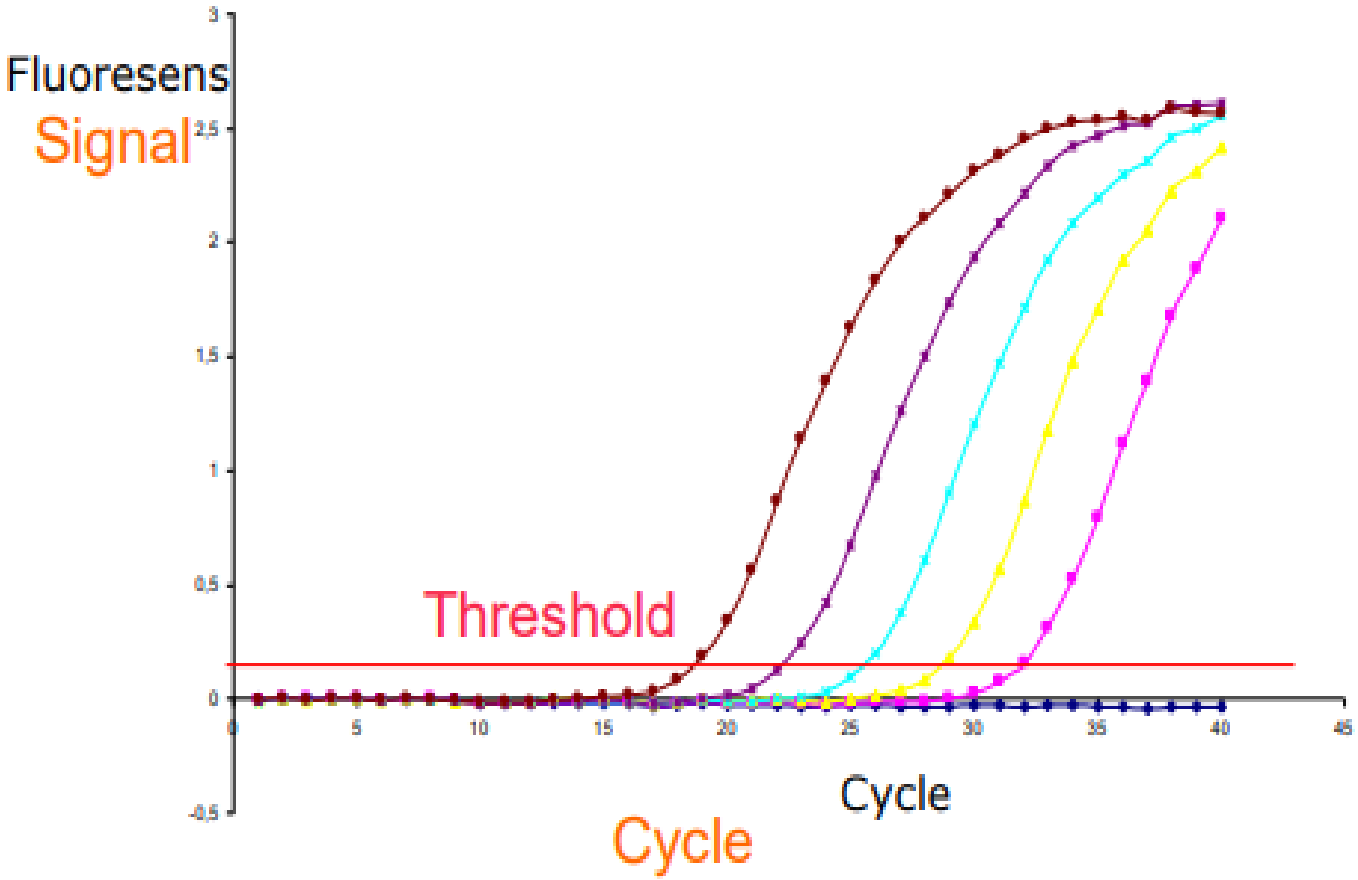
Without ROX dye normalization (STD = 0.028)



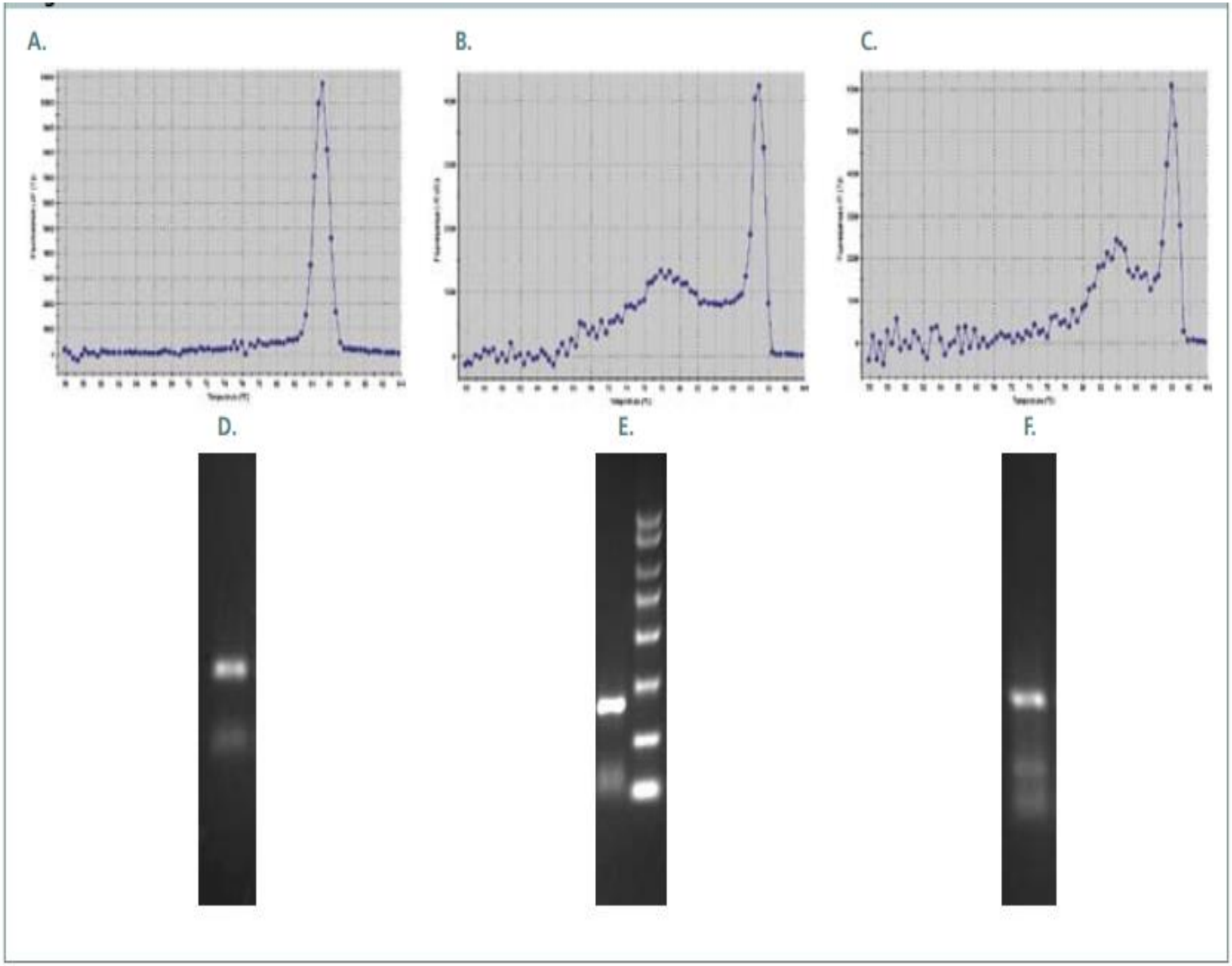
With ROX dye normalization (STD = 0.01)



Threshold setting



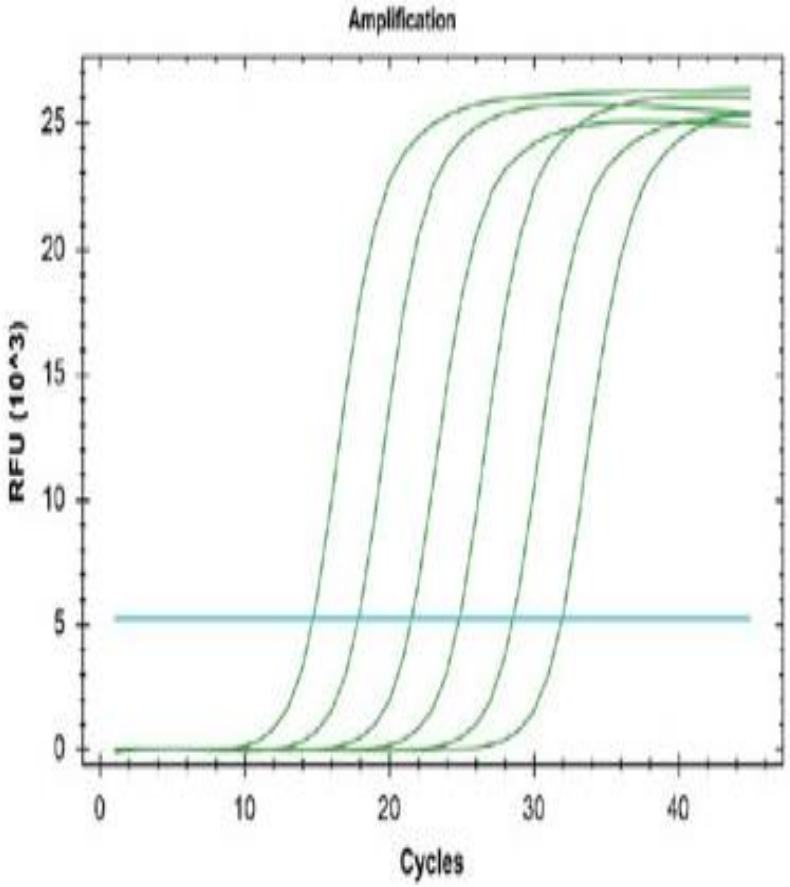
Melt curve Analysis

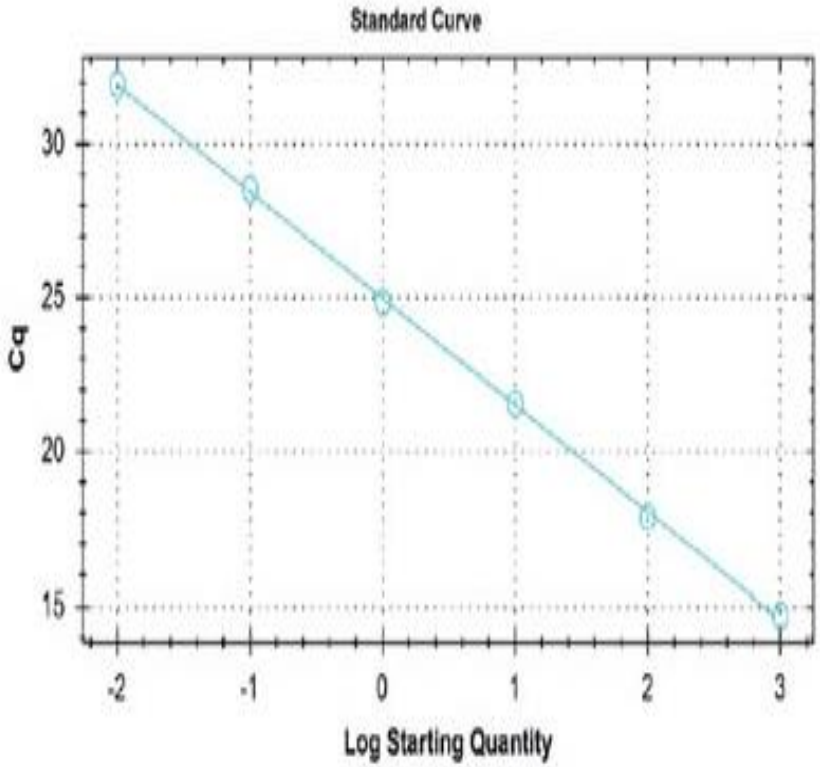


Standard curve

یک سری رقت (Serial Dilution) از نمونه استاندارد تهیه کرده و برای تمامی رقت ها واکنش PCR انجام می شود.از روی نمودار تکثیر ، Ct نمونه ها مشخص می شود.سپس منحنی استاندارد آنها بر اساس Ct در محور yها و log تعداد کپی در محور x ها رسم می گردد.این یک منحنی خطی با شیب منفی است و دارای یک معادله می باشد.حال با دانستن Ct نمونه مجهول (که برای آن همراه با نمونه های استاندارد PCR انجام شده است) و قراردادن آن در معادله منحنی استاندارد، تعداد کپی نمونه موردنظر مشخص می گردد.

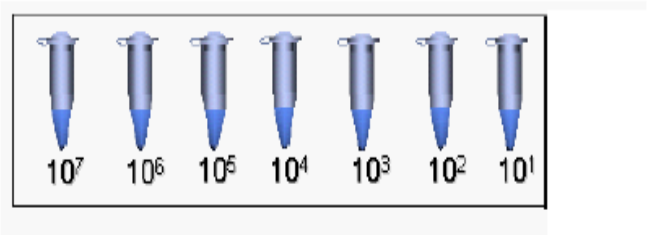
Standard curve



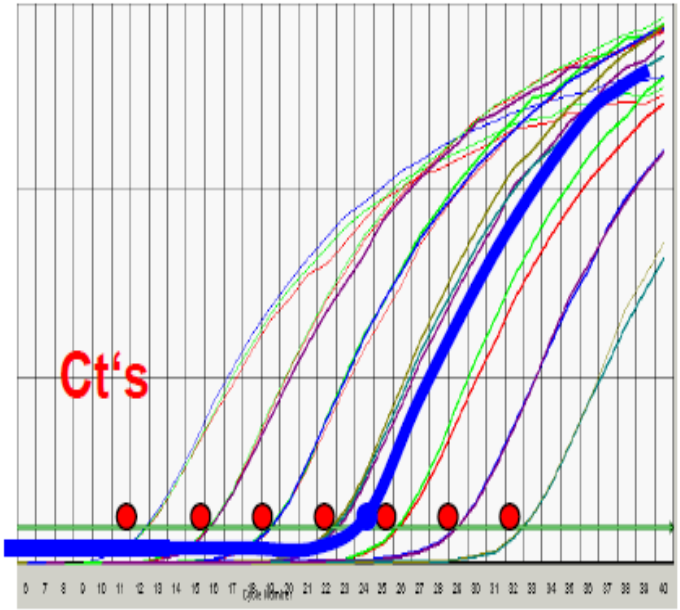


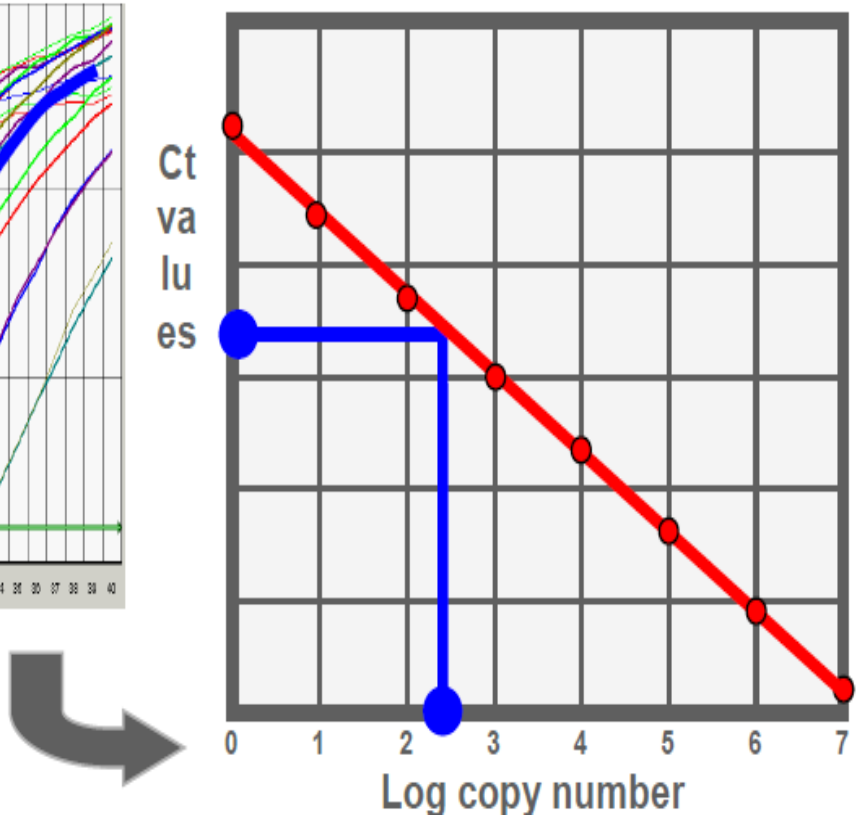
From Fluorescence to Results

Step 2 „Comparison“ of Ct Values

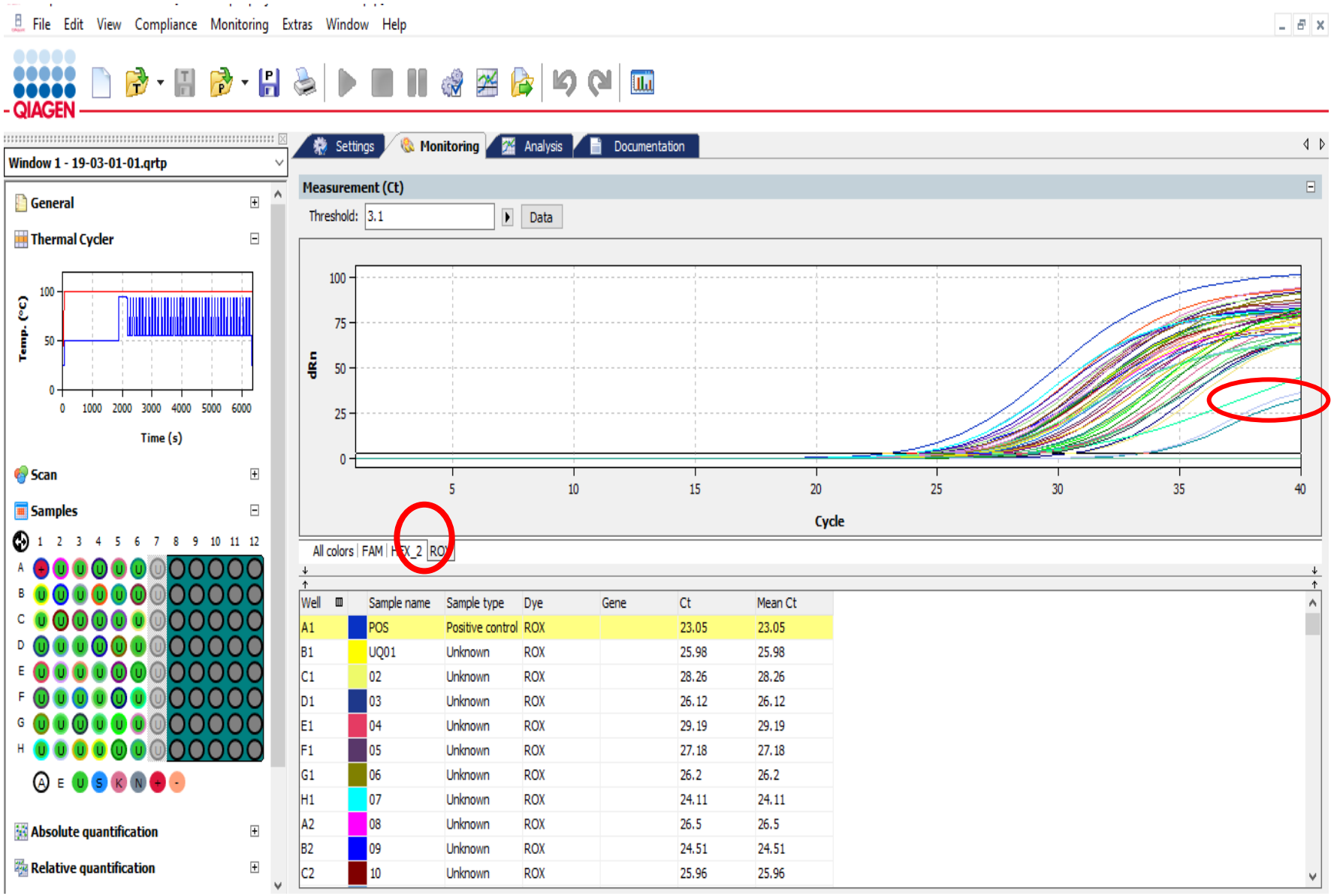


The well contains
400 target copies

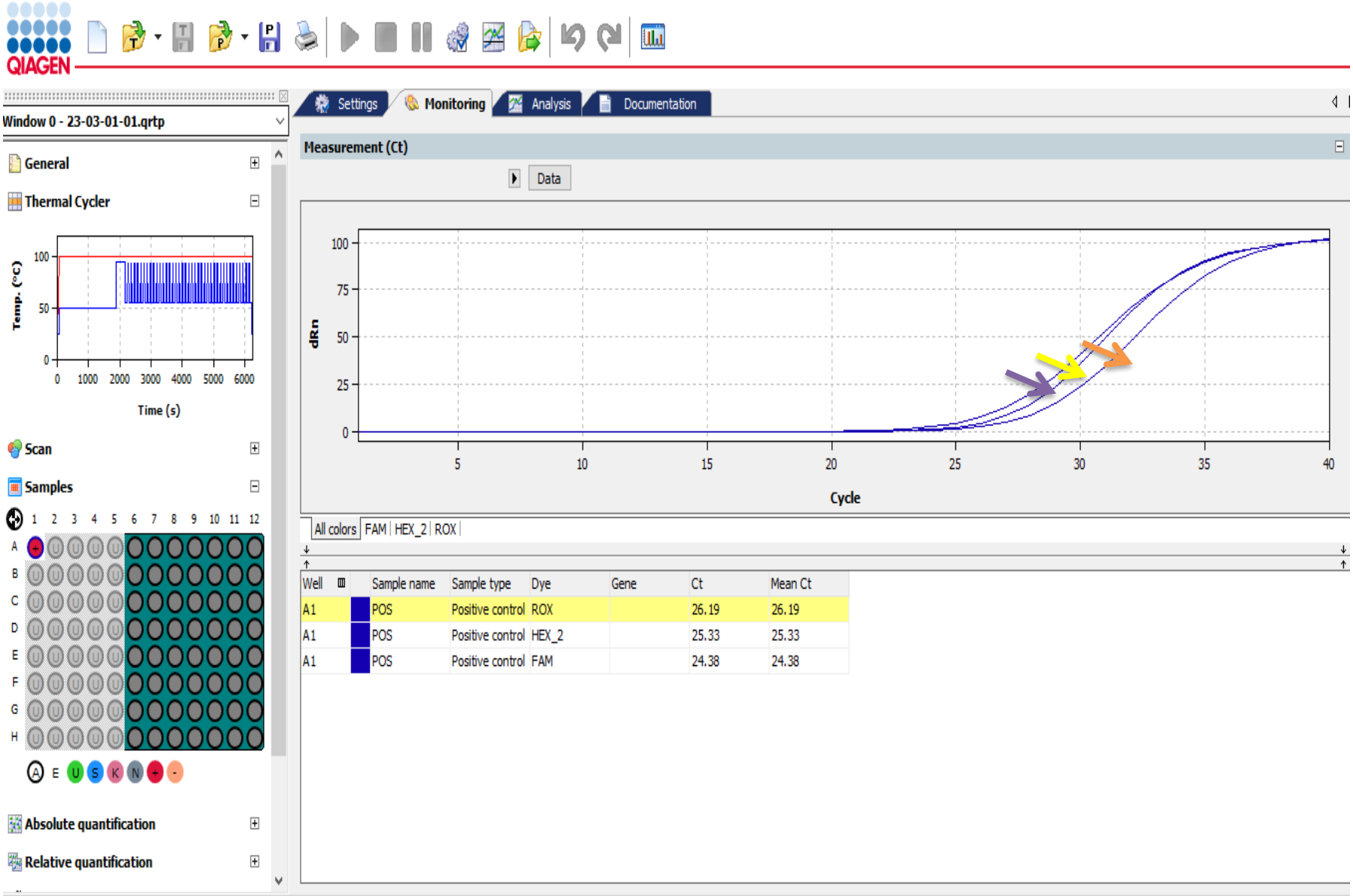




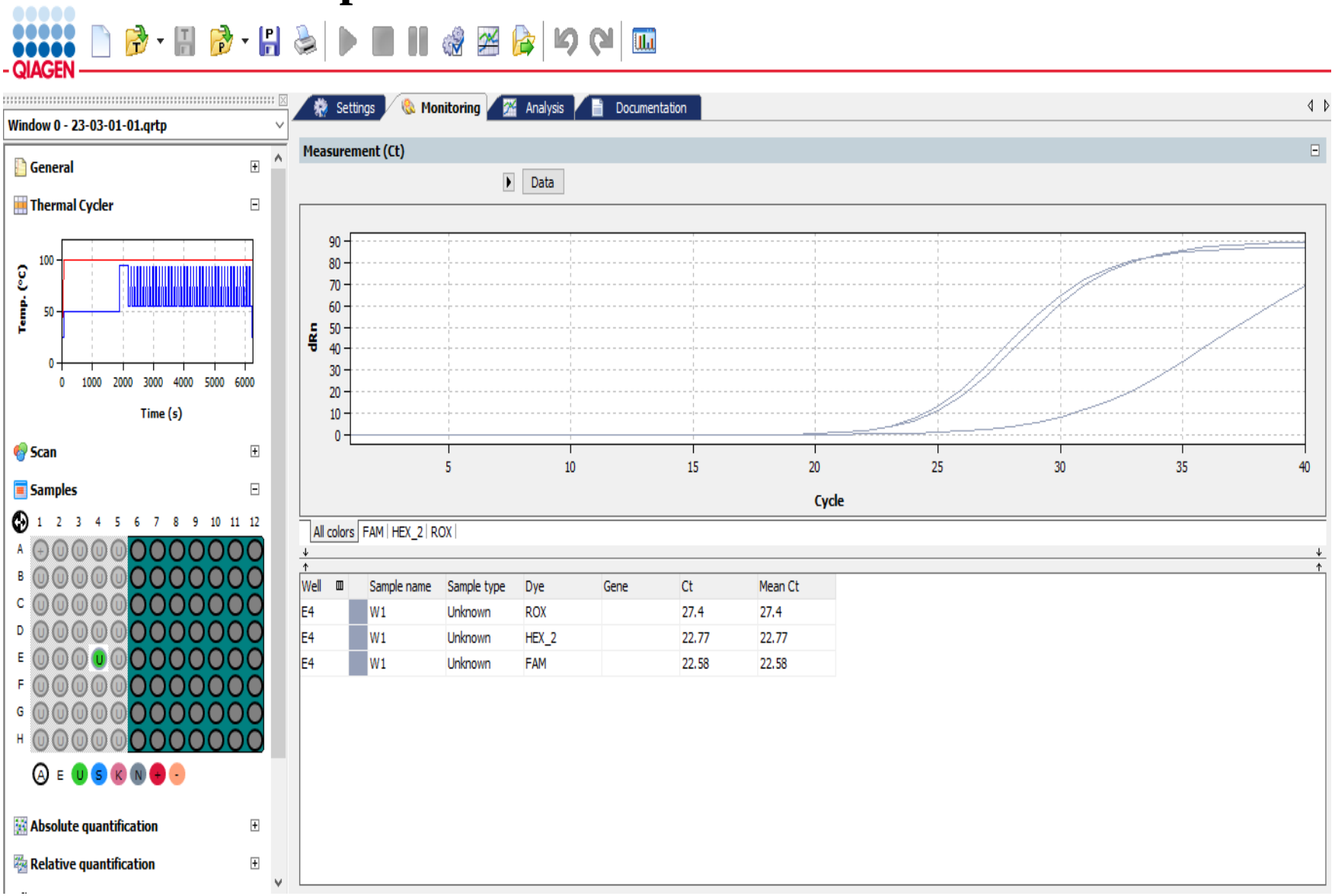
Real Time PCR Control- internal Control



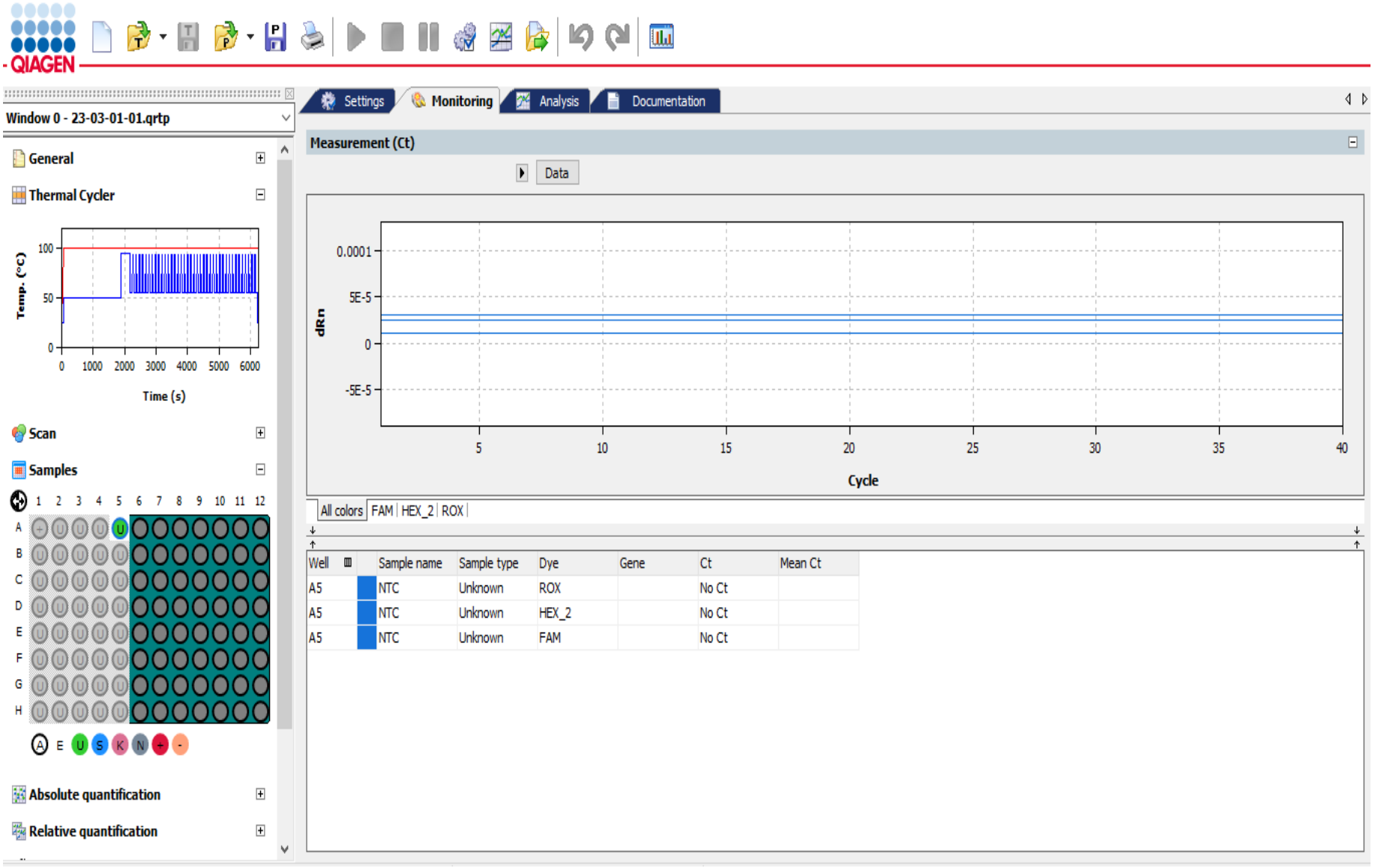
Real Time PCR Control- Positive Control



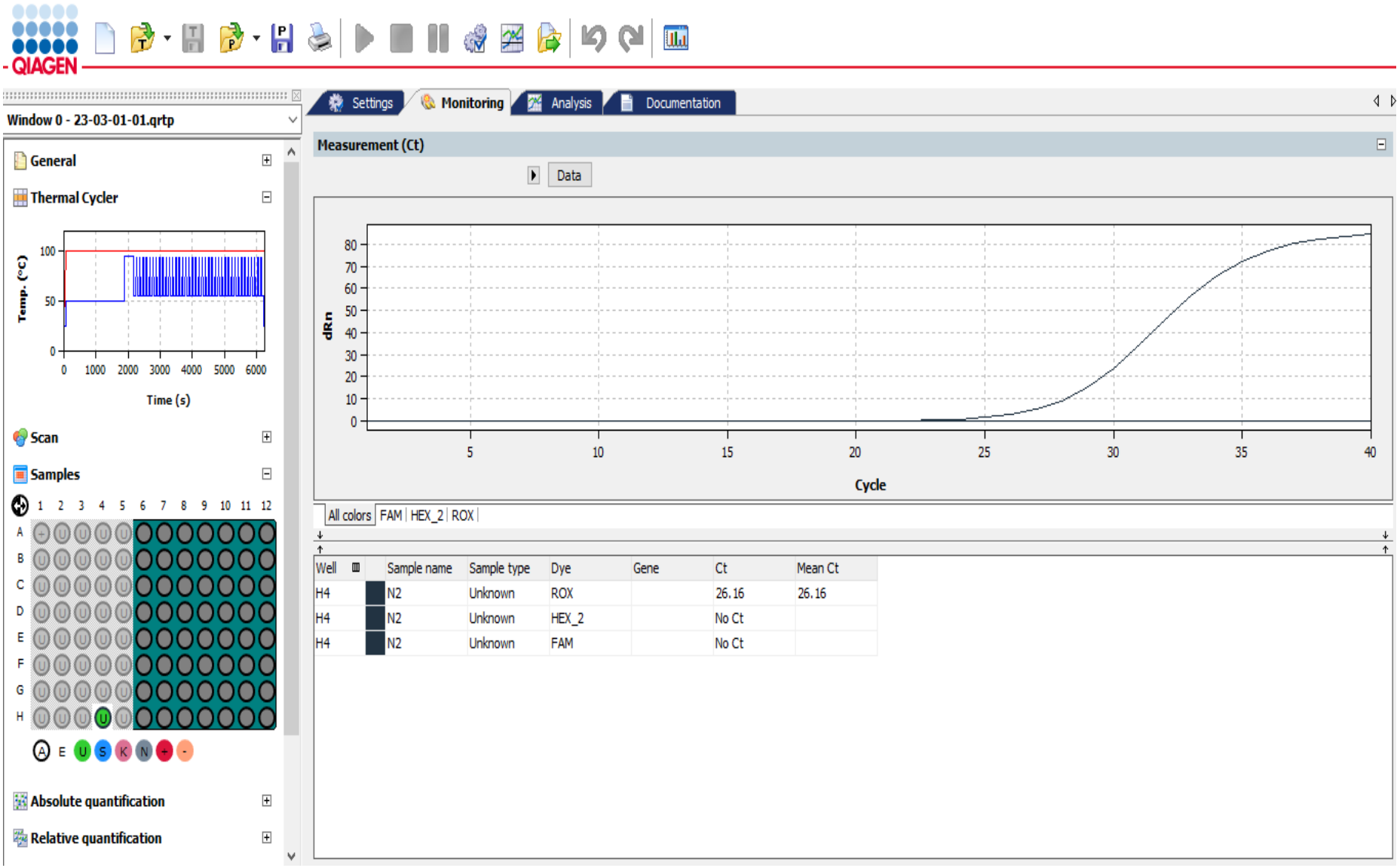
Real Time PCR Control-weak sample



Real Time PCR Control- Negative Control



Real Time PCR Control- Negative Control

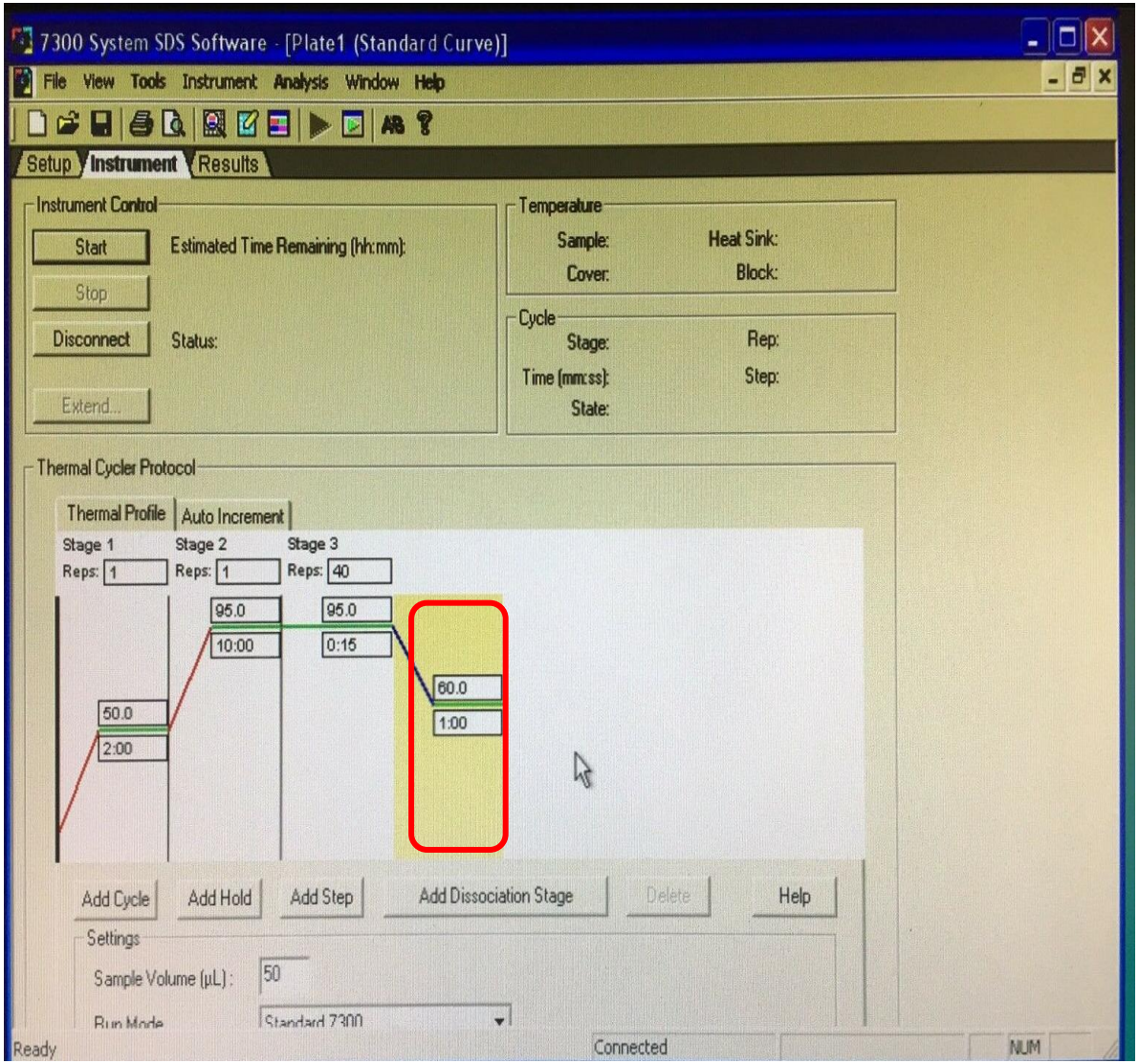


Protocol

برنامه روتین QPCR				
ردیف	مرحله	دما	زمان	سیکل
	Reverse Transcription	50°C	۲۰ دقیقه	۱
	cDNA Initial Denaturation	95°C	۳ دقیقه	۱
	Denaturation	94°C	۱۰ ثانیه	۴۵
	Annealing, Extension and Fluorescence measurement	55°C	۴۰ ثانیه	
	Cooling	25°C	۱۰ ثانیه	۱

ولیتر

programming



Result

تحلیل نتایج:

پس از پایان واکنش، نتایج به صورت اتوماتیک ذخیره شده و منحنی تکثیر تشخیص RNA هدف و کنترل داخلی به صورت جداگانه آنالیز می‌شوند.

۱-کنترل کیفی:

a. کنترل منفی COVID-19 PCR : تمام کانال‌های FAM،HEX و ROX(کنترل داخلی) نباید CT از خود نشان داده یا CT بالاتر از ۴۰ باشد.

b. کنترل مثبت COVID-19 PCR : CT تمام کانال‌های FAM،HEX و ROX(کنترل داخلی) باید کمتر و یا مساوی از ۳۵ باشد.

c. ملزومات بالا باید در هر آزمایش به طور همزمان برقرار باشد، در غیر این صورت آزمایش بی‌نتیجه بوده و ملزم به تکرار است.

Result

حد آستانه‌ی مثبت:

با توجه به مطالعه‌ی مقدار مرجع، CT مرجع برای ژن مورد هدف و ژن کنترل داخلی این کیت ۴۰ است.

آنالیز نتایج:

۱- ابتدا باید منحنی تکثیر کنترل داخلی ROX آنالیز شود. اگر Ct کمتر از ۴۰ باشد، نشاندهنده‌ی این است که آزمایش قابل اعتماد بوده و کاربر می‌تواند به ادامه‌ی روند آنالیز نتایج بپردازد:

a. اگر یک منحنی S شکل تیپکال در هر دو کانال FAM و HEX یا یکی از آنها رسم شده باشد و Ct نیز کمتر از ۴۰ باشد نشان دهنده‌ی این امر است که ویروس SARS-CoV-2 در نمونه حضور دارد و نتیجه‌ی آزمایش مثبت است.

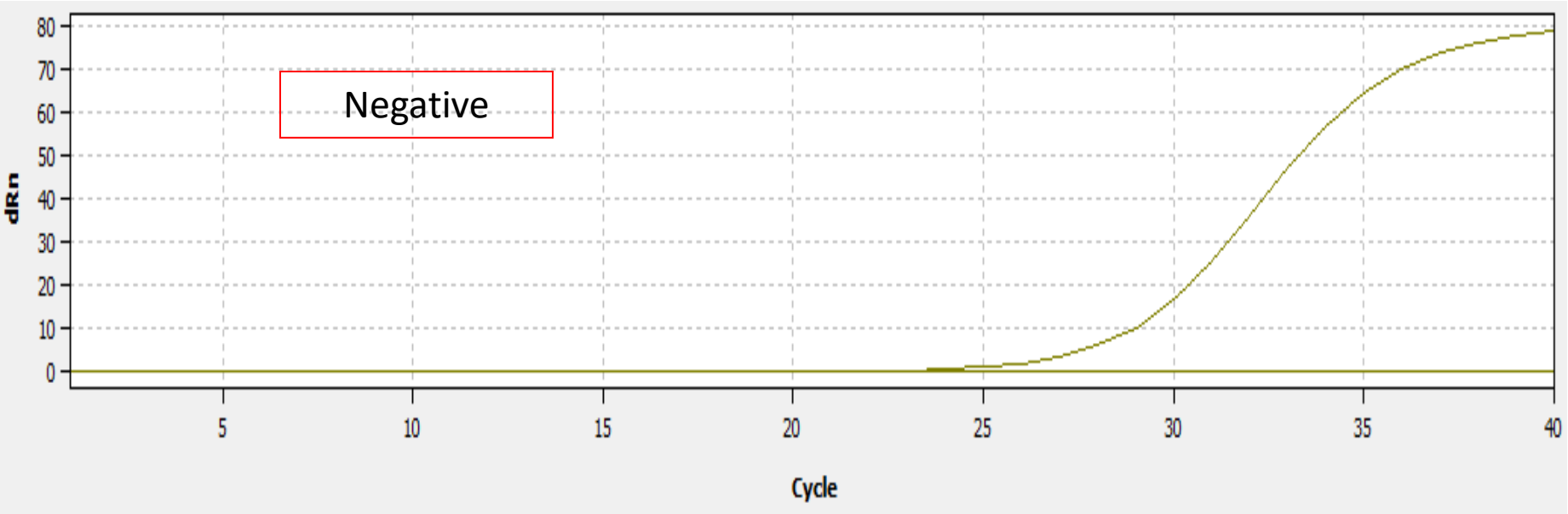
b. اگر یک منحنی S شکل تیپکال توسط کانال‌های FAM و HEX رسم نشده باشد یا Ct کمتر از ۴۰ نباشد نشان دهنده‌ی این امر است که ویروس SARS-CoV-2 در نمونه حضور نداشته و نتیجه‌ی آزمایش منفی است.

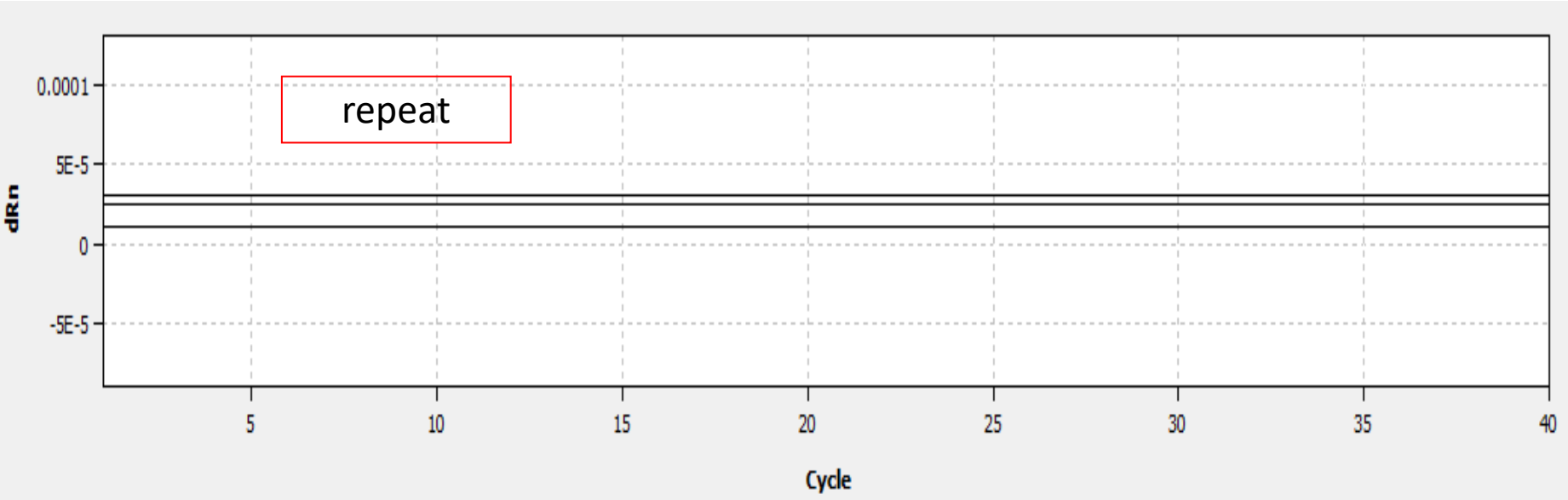
Result

۲- اگر کنترل داخلی کانال ROX نتواند Ct را مشخص کند و یا Ct بیشتر از ۴۰ باشد، نشان‌دهنده‌ی این امر است که غلظت نمونه‌ی مورد آزمایش خیلی پایین است و یا یک واکنش محدود کننده در انجام آزمایش مداخله کرده است. در این صورت کاربر باید آزمایش را تکرار کند.

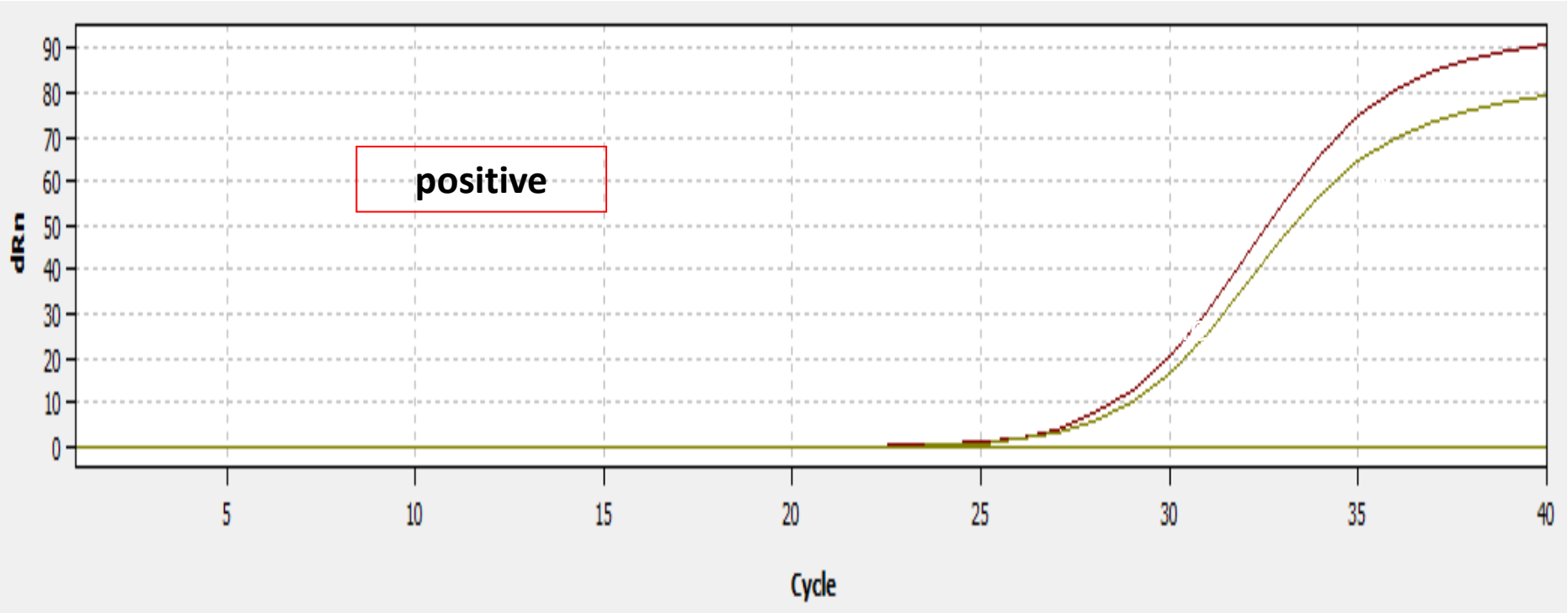
۳- برای نمونه‌های منفی، کنترل داخلی باید مثبت باشد، اگر کنترل داخلی منفی است نتایج قابل اتکا نمی‌باشد. دلیل این مسئله باید کشف و رفع شود. کاربر باید سمپلینگ و انجام آزمایش را تکرار کند(اگر نتایج همچنان قابل اتکا نبود با تولید کننده‌ی دستگاه تماس بگیرید)

Result- IC

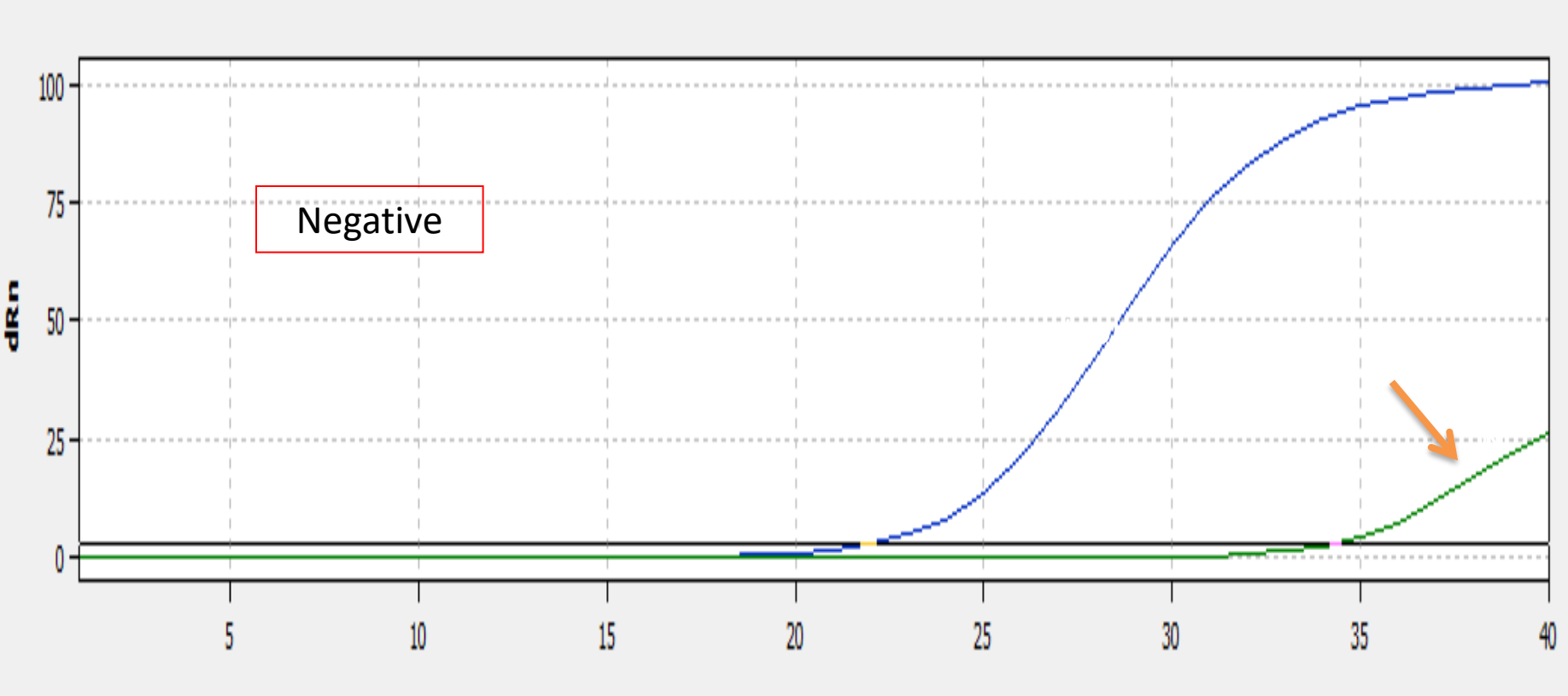

Negative
dRn
80
70
60
50
40
30
20
10
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Cycle


repeat
dRn
0.0001
5E-5
0
-5E-5
5
10
15
20
25
30
35
40
Cycle

Result

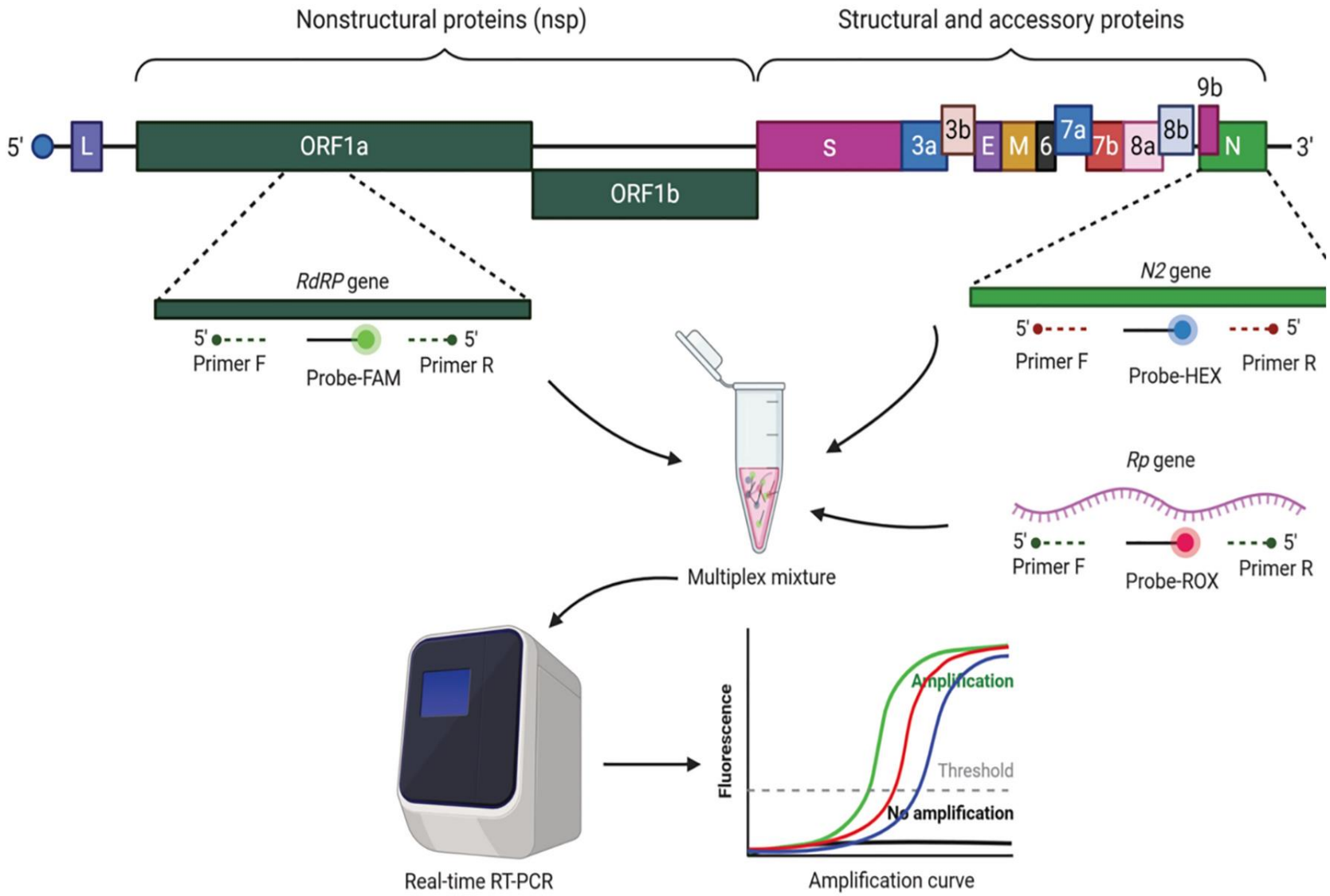

positive
dRn
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Cycle

Result



تفسیر آزمایشات ترکیبی Ab/RT-PCR در بیماران مشکوک به کووید-۱۹

۱-آزمایش PCR مثبت،IgM منفی،IgG منفی
🔹 بیمار احتمالا در فاز پنجره(Window period)است.باید قرنطینه را رعایت کند(ناقل).
۲-آزمایش PCR مثبت،IgM مثبت،IgG منفی
🔹 بیمار در مرحله ابتدایی عفونت است و باید قرنطینه را رعایت کند(ناقل).
۳-آزمایش PCR مثبت،IgM مثبت،IgG مثبت
🔹 فرد در فاز فعال بیماریست و باید قرنطینه را رعایت کند(ناقل).
۴-آزمایش PCR مثبت،IgM منفی،IgG مثبت
🔹 فرد در فاز نهایی بیماریست . باید قرنطینه را رعایت کند (ناقل)
۵-آزمایش PCR منفی،IgM مثبت،IgG منفی
🔹 فرد در مرحله اولیه بیماریست و نتیجه PCR ممکن است منفی کاذب باشد.
۶-آزمایش PCR منفی،IgM منفی،IgG مثبت
🔹 فردقبلا به بیماری کووید-۱۹ مبتلا بوده و اکنون بهبود یافته است.
۷-آزمایش PCR منفی،IgM مثبت،IgG مثبت
🔹 بیمار ممکن است در فاز بهبودی باشد و ممکن است نتیجه PCR منفی کاذب باشد.


Nonstructural proteins (nsp)
Structural and accessory proteins
5'
L
ORF1a
ORF1b
S
3a
3b
E
M
6
7a
7b
8a
8b
9b
N
3'
RdRP gene
5'
Primer F
Probe-FAM
5'
Primer R
N2 gene
5'
Primer F
Probe-HEX
5'
Primer R
Rp gene
5'
Primer F
Probe-ROX
5'
Primer R
Multiplex mixture
Real-time RT-PCR
Fluorescence
Amplification
Threshold
No amplification
Amplification curve