مقاله پژوهشی

چالش های تشخیص آزمایشگاهی کووید ۱۹: یک مطالعه مبتنی بر RT-PCR

نویسندگان:

سعیده عرفانیان[۱]، دانش جوشقانی[۲]، محسن فرهنگ[۳]، اباذر روستازاده[۴]*

۱- گروه مهندسی بافت ، دانشکده علوم پایه و فناوری های نوین پزشکی، موسسه رویان، تهران، ایران

۲- گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

۳- مرکز مطالعات و تشخیص مولکولی ، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

۴- گروه بیوشیمی ، گروه علوم و فناوری های نوین پزشکی ، مرکز تحقیقات بیماری های غیرواگیر ، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.19, No.1, Spring 2021

چکیده:

مقدمه: در دسامبر ۲۰۱۹ یک کروناویروس جدید به نام SARS-CoV-2 در ووهان چین کشف شد که روش‌های مولکولی حساسی برای تشخیص آن ابداع شده است. هدف از مطالعه حاضر، تشخیص صحیح مبتلایان و همچنین بررسی چالش‌های موجود در تشخیص این ویروس با روش Real-Time PCR (RT-PCR) به طور عملی است.

روش کار: ۲۷۱ نفر شامل ۱۰۵ زن و ۱۶۶ مرد به روش سرشماری از ۱۵ فروردین ماه تا تیر ماه سال ۱۳۹۹ در این مطالعه نام نویسی شدند. نمونه‌های سوآب نازوفارینژیال و اوروفارینژیال از افراد مشکوک جمع آوری و استخراج RNA برای تشخیص ویروس با روش RT-PCR انجام گرفت.

یافته‌ها: ۵۲ نفر از زنان و ۸۲ نفر از مردان از لحاظ کووید ۱۹ مثبت بودند. نتایج نشان داد که در این بازه زمانی در کیت‌های دریافتی، محتوای کیت‌های RT-PCR با کنترل مثبت آلودگی داشتند. در هشت درصد موارد نمونه‌های قطعی کنترل منفی پس از مرحله استخراج و در فرایند RT-PCR با مستر میکس واکنش و پیک‌هایی در دستگاه نشان داده‌اند. از سویی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در هفت درصد از کیت‌ها، محتوای مستر میکس بدون افزودن نمونه خود به خود در دستگاه پیک‌هایی مشابه کنترل مثبت ایجاد می کنند.

نتیجه گیری: کنترل منفی‌های متعددی برای تشخیص ویروس کووید ۱۹ در مرحله استخراج و RT-PCR لازم است تا از بروز پاسخ مثبت کاذب جلوگیری شود.

واژگان کلیدی: کروناویروس، واکنش زنجیره ای پلیمراز، مطالعه مولکولی، کنترل کیفی

Pars J Med Sci 2021;19(1):63-68

مقدمه:

در ۱۲ دسامبر ۲۰۱۹ نوع جدیدی از کروناویروس در ووهان استان هوبی چین گزارش شد [۱]. در ۱۱ فوریه ۲۰۲۰ نام جدیدی توسط سازمان بهداشت جهانی برای این ویروس انتخاب و آن را کووید ۱۹ (COVID -19) نامیدند [۲]. این ویروس جدید توسط کمیته بین المللی تاکسونومی ویروس ها به عنوان سندروم تنفسی حاد شدید ۲ (SARS-CoV-2) نام گذاری شد [۳].

با ادامه شیوع ویروس کرونا افراد با سن بالای ۵۰ سال عوارض متعددی را از خود نشان دادند. اگرچه در ابتدا تصور می‌شد که این ویروس فقط افراد کهنسال را مبتلا کند، اما گزارشاتی از ابتلای افراد جوان و حتی کودکان منتشر شد. همچنین مشاهده شد بیماران با عوارض شدید ریسک بالاتری از مرگ داشته و نیاز به مراقبت شدیدتری دارند [۴]. علائم SARS-CoV-2 از خفیف تا نقص شدید تنفسی است. در حالت کلی، علائم این بیماری شایع شامل تب، سرفه، نفس‌های کوتاه، لوکوپنی و پنومونی در هر دو ریه است [۵].

کروناویروس‌ها که بزرگترین خانواده ویروس‌های RNA دار هستند در سال ۱۹۶۰ کشف شدند. اندازه ژنوم آن‌ها ۲۷-۳۲ کیلوباز است. SARS-CoV-2 که عضوی از این خانواده است یک

* نویسنده مسئول، نشانی: استادیار، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، خیابان مطهری، جهرم، ایران.

تلفن تماس: ۰۹۱۷۱۳۲۷۷۵۸ پست الکترونیک:Roustazadeh@jums.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۳۱ اصلاح: ۱۴۰۰/۰۴/۰۵ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۸

ویروس پوشش دار و دارای ژنومی از جنس RNA تک رشته‌ای است که یک دم پلی A در انتهای ۳' دارد [۶]. کروناویروس‌ها دارای خصوصیات مشترکی هستند که آن‌ها را می توان به SARS-CoV-2 نیز نسبت داد. این ویروس دارای چهار پروتئین ساختمانی مهم به نام های پروتئین پوششی (E) پروتئین غشایی (M) پروتئین اسپایک (S) و پروتئین نوکلئوکپسید (N) است که فعالیت آن را کنترل می‌کنند [۷]. ژنوم SARS-CoV-2 حاوی ۱۱ ژن و ۱۱ قالب باز خواندن (ORF) است. ORF1ab پلی‌پروتئینی را بیان می‌کند که شامل ۱۶ پروتئین غیرساختمانی (NSP) شبیه به پروتئین‌های کروناویروس SARS است که به آن پروتئین مهارکننده بیان ژن میزبان می‌گویند [۸]. توالی کامل ژنوم این ویروس اولین بار در دسامبر ۲۰۱۹ در دسترس قرار گرفت و بارها به روز رسانی شده است. داده‌های مرجع این توالی (NC_045512.2) در بانک ژنی موجود است [۹]. ژنوم ویروس دارای توالی‌های حیاتی است که پس از ترجمه کمپلکس رپلیکاز–ترانس کریپتاز (RTC) را ایجاد می‌کند. این پروتئین‌ها پروتئین‌های کلیدی شامل RNA پلیمراز وابسته به RNA (RdRp)، RNA هلیکاز و پروتئین غیرساختمانی هستند. به علاوه RdRp تعدادی RNA ویروسی ساب ژنومی ایجاد می‌کنند که پس از ترجمه باعث ایجاد پروتئین‌های ساختمانی S، E، M و N می‌شوند. این پروتئین‌ها سپس با RNA ویروس تجمیع شده و آزاد می‌شوند [۱۰].

به منظور جلوگیری از شیوع بیشتر ویروس تشخیص موارد مثبت علامت دار و بدون علامت دارای اهمیت حیاتی است [۱۱]. وجود روش های اختصاصی و با حساسیت بالا برای تشخیص صحیح و سریع این ویروس در راستای کنترل شیوع آن مهم است. برخی از مطالعات عنوان کرده اند که کشت این ویروس به خاطر وقت گیری بودن، زمان بر بودن و از همه مهمتر نیاز داشتن به تسهیلات ایمنی سطح ۳ که در اکثر آزمایشگاه وجود ندارد، روش مناسبی برای تشخیص نیست [۱۲].

در حال حاضر روش های تکثیری مبتنی بر نوکلئیک اسید همچون RT-PCR، روش های سرولوژیکی تعیین توالی ویروسی و کشت ویروس برای تشخیص آن وجود دارند که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارند. RT-PCR به دلیل سادگی، ارزانی و کارآیی بالا روشی مطلوب برای تشخیص SARS-CoV-2 است [۱۳، ۱۴].

اگرچه پژوهشگران پروب‌ها و پرایمرهای اختصاصی برای تشخیص دقیق و حساس این ویروس طراحی کرده اند، اما هنوز این موارد برای تشخیص دقیق ویروس کافی نیست، به ویژه این که کیت‌های موجود در بازار لزوماً تشخیص صحیح این ویروس را تضمین نمی کنند. در تشخیص این ویروس کارکنان آزمایشگاه با شرایط فیزیولوزیک استرس‌زا مواجه هستند، بنابراین در کنار پروتکل‌های رایج موجود در آزمایشگاه، وجود کنترل‌های متعددی لازم است تا اطمینان حاصل شود که تشخیص موارد مثبت به طریق صحیحی انجام شده است. از این رو، هدف از مطالعه حاضر تشخیص مبتلایان به این ویروس و همچنین بررسی چالش‌هایی بود که به طور عملی در تشخیص به روش RT-PCR وجود دارد.

روش کار:

افراد مورد مطالعه

۲۷۱ فرد مشکوک مبتلا به کووید ۱۹ که از تاریخ ۱۵ فروردین تا ۱۵ تیرماه ۱۳۹۹ به بیمارستان پیمانیه جهرم مراجعه کرده بودند به صورت سرشماری نام‌نویسی و مطالعه وارد شدند. این افراد دارای علائم تب، سرفه خشک، گلودرد، خستگی، درد سینه، نفس‌های کوتاه و علائم گوارشی عمدتاً به صورت اسهال، استفراغ، یبوست، و درد معده بوده و یا با موارد مثبت قطعی کووید ۱۹ تماس داشته‌اند. سوآب نازوفارینژیال و اوروفارینژیال از این افراد تهیه و به محیط VTM انتقال داده شد. این نمونه‌ها سپس در جعبه‌های کاملاً ایمن به همراه یخ به آزمایشگاه مرکز مطالعات و تشخیص مولکولی دانشگاه علوم پزشکی جهرم فرستاده و استخراج RNA بلافاصله شروع شد. کنترل‌های منفی و مثبت قطعی کووید ۱۹ از انستیتوپاستور ایران، دانشگاه‌های علوم پزشکی شیراز و فسا تهیه شدند. پروتکل این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جهرم با کد IR.JUMS.REC.1399.126 مورد تایید قرار گرفت.

استخراج RNA

استخراج ژنوم ویروسی توسط دو کیت ستونی وازایم (Vazyme biotech co Ltd, 7E481B0)و روژه (Roje technologies co, 50592023 Yazd, Iran) انجام شد. در ابتدا محتویات کیت ها از جعبه خارج و اجازه داده شد به دمای محیط برسند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محلول لیز کننده با ۱۰۰–۲۰۰ میکرولیتر از نمونه به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده و وورتکس شدند. این مخلوط سپس به ستون جذبی منتقل شد. بعد از آن، مرحله شستشو و الوشن انجام و RNA استخراج شده بلافاصله برای RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. در صورت وجود زمان بین مرحله استخراج تا آماده سازی و توزیع، محلول ها در استریپ RT-PCR در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

Real-Time -PCR

در مرحله اول برای غربال گری افراد از کیت شرکت سنشور (Sansure biotech Inc, 20200225 Changsha, China) استفاده

شد. سپس برای تایید نتایج از کیت های شرکت کوژن و لایف ریور (Kogene biotech, R6900TD200441 Brussels, Belgium and Life river Bio -Tech, Shanghai, China) استفاده شد که ژن RdRp را نیز هدف قرار می دهند. شرایط RT-PCR برای کیت های فوق در جداول ۱و۲ آورده شده است.

کنترل کیفی

کنترل‌های مثبت و منفی که از سه آزمایشگاه تشخیص کرونا دانشگاه علوم پزشکی فسا، مرکز والفجر دانشگاه علوم پزشکی شیراز و انستیتو پاستور ایران تهیه شده بودند تحت فرآیند استخراج قرار گرفتند تا هم کارآیی کیت های استخراج بررسی شود و هم اطمینان حاصل شود که آلودگی وجود ندارد. در فرآیند RT-PCR علاوه بر کنترل منفی فاقد الگو (NTC)، در یک یا دو خانه از استریپ‌ها، مستر میکس بدون افزودن ماده دیگری اضافه شد تا از سلامت آن اطمینان حاصل شود. علاوه بر این، هر روز یک نمونه منفی قطعی همراه با بقیه نمونه‌ها در فرآیند استخراج وارد شد تا رفتار مسترمیکس RT-PCR در رابطه با ترکیبات باقیمانده در فرآیند استخراج بررسی شود. علاوه بر این، هر روز فرآیند RT-PCR حداقل با دو کیت انجام تا نتایج کنترل شود. همچنین هر روز قبل از شروع RT-PCR کنترل مثبت از کیت خارج و در یک ایستگاه کاری مجزا قرار داده شد تا شانس آلودگی به حداقل رسانده شود. سپس تمامی اجزای دیگر کیت با وایتکس ۵ درصد (NaClo 5%) شستشو داده شد.جهت تعیین واکنش مثبت کاذب RT-PCR از نمونه های منفی حقیقی استفاده کردیم.از سویی کنترل مثبت آخرین نمونه ای بود که به استریپ اضافه نمودیم.

تحلیل‌های آماری

تحلیل داده‌ها با نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام شد. داده‌های کمی به صورت Mean ± SD گزارش شدند. نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف – اسمیرنوف بررسی شد. از آزمون t و کای مربع برای ارزیابی تفاوت داده‌های بین گروهی استفاده شد. ارزش P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنادارآماری در نظر گرفته شد.

جدول ۱: مقادیر واکنش گرهای RT-PCR برای کیت های کوژن، سنشور و لایف ریور

نوع کیت	مقدار مستر میکس (میکرولیتر)	مقدار نمونه (میکرولیتر)
کوژن	۱۵	۵
سنشور	۱۵	۱۰
لایف ریور	۲۰	۵

جدول۲: سیکل‌های دمایی RT-PCR برای کیت های کوژن ، سنشور و لایف ریور

نوع کیت	سنتز cDNA توسط ترانس کریپتاز معکوس	غیر فعال سازی آنزیم ترانس کریپتاز معکوس در ۹۵ °C	تکثیر cDNA	واسرشت در ۹۵ °C
کوژن	۳۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی گراد ۱ سیکل	۱ دقیقه	۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی گراد ۴۵ سیکل	۱۵ ثانیه
سنشور	۳۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی گراد ۱ سیکل	۱۰ دقیقه	یک دقیقه در ۶۰ درجه سانتی گراد ۴۰ سیکل	۱۵ ثانیه
لایف ریور	۱۰ دقیقه در ۴۵ درجه سانتی گراد ۱ سیکل	۳ دقیقه	۳۰ ثانیه در ۵۸ درجه سانتی گراد ۴۵ سیکل	۱۵ ثانیه

یافته‌ها:

در این پژوهش ۲۷۱ نفر شامل ۱۰۵ نفر زن و ۱۶۶ نفر مرد که در دامنه سنی ۳ تا ۸۹ سال بودند مورد مطالعه قرار گرفتند. میانگین سنی زنان ۱۸±۳۶ و میانگین سنی مردان ۱۷±۴۱ سال بود. ۵۲ نفر (۳۹ درصد) از زنان و ۸۲ نفر (۶۱ درصد) از مردان از لحاظ کووید ۱۹ مثبت بودند.

نتایج نشان داد که به کار بردن یک نمونه کنترل منفی به ازای هر ده نمونه در فرآیند استخراج، تعداد موارد مشکوک نیازمند به تکرار را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد ($p<0/05$). همچنین مشخص شد که در بازه زمانی ۱۵ فروردین تا ۱۵ اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۹ در ۵ درصد کیت‌های دریافتی، محتوای کیت‌های RT-PCR با کنترل مثبت آلوده شده اند. در ۸ درصد

موارد نمونه‌های قطعی کنترل منفی پس از مرحله استخراج و در فرایند RT-PCR با مستر میکس‌واکنش و پیک‌هایی در دستگاه نشان می‌دهند. از سویی نتایج نشان داد که در برخی از کیت‌ها، محتوای مستر میکس بدون افزودن نمونه به آن خود به خود در ۷ درصد موارد در دستگاه پیک‌هایی مشابه نمونه مثبت ایجاد می‌کنند.

بحث:

کووید ۱۹ نوع جدیدی از خانواده بتاکروناویروس‌ها است. بیشتر افراد ممکن است حداقل یک بار در طول زندگی با یکی از بتاکرونا ویروس‌ها آلوده شوند[۱۵]. عفونت با کووید ۱۹ ممکن است عوارض شدیدی همچون سندروم دیسترس حاد تنفسی (ARDS)، آسیب قلبی و حتی مرگ به دنبال داشته باشد [۱۶]. همان طور که قبلاً در اپیدمی‌های حاصل از SARS-Cov-1 و سندروم تنفسی خاورمیانه (MERS) نیز به اثبات رسیده است، برای آن که بتوان موارد مثبت کووید ۱۹ را با دقت خوبی تشخیص داد، وجود آزمایش‌های آزمایشگاهی با حساسیت و دقت بالا ضروری است [۱۷]. RT-PCR در آزمایشگاه‌های تشخیصی به عنوان روش اصلی برای تشخیص موارد مثبت معرفی شده است.

اولین پروتکل مبتنی بر RT-PCR در تشخیص کووید ۱۹در ۲۳ ژانویه ۲۰۲۰ منتشر شد [۱۸]. این پروتکل، ژن‌های RdRp، E و N را تشخیص می‌داد. تا به امروز بیشتر مطالعات در فرآیند توسعه روش RT-PCR، به طراحی پرایمر و پروب مناسب پرداخته‌اند و از کیت‌های با کیفیت عالی استفاده کرده‌اند. شیوع ویروس کووید ۱۹ شرایط استرس‌زایی به دنبال داشته و سبب تخلیه بازار از کیت‌های با کیفیت عالی شده است، بنابراین ضروری است که از روش‌های کنترل کیفی فراتر از روش‌های رایج آزمایشگاه استفاده کرد تا بتوان شانس مثبت کاذب را کاهش داده و از پاسخ نهایی صحیح مطمئن شد.

فرآیند تشخیص ویروس کووید ۱۹ از مرحله نمونه‌گیری تا فرایند RT- PCR استرس زا است. پژوهشگران و کارکنان آزمایشگاه‌ها ناچارند به منظور جلوگیری از آلودگی خود پروتکل‌های بهداشتی نسبتاً شدیدی را رعایت کنند. در این راستا کارکنان آزمایشگاه باید زمان را به گونه‌ای مدیریت کنند که آزمایش‌ها در حداقل زمان ممکن به اتمام برسند. برای دستیابی به این هدف استفاده از کنترل‌های منفی متعدد توصیه می‌شود. این امر کمک می‌کند تا نتایج مورد اعتماد بوده و از سویی تعداد نمونه‌هایی که نیاز به تکرار دارند به میزان قابل توجهی کاهش یابد. تمام این موارد منجر به کاهش میزان ماندن کارکنان در اتاق استخراج می‌شود. چان و همکارانش [۱۲] با طراحی پرایمرهای جدید روش RT-PCR با حساسیت بالا برای تشخیص کووید ۱۹ طراحی کردند.

در شرایط اپیدمی این ویروس مواد با کیفیت خوب برای استفاده در روش چان وجود نداشته و نبود تعادل بین عرضه و تقاضای ابزار و مواد آزمایشگاهی کاملاً مشهود بود. فشار اپیدمی از یک طرف و عدم وجود کیت‌های با کیفیت خوب، آزمایشگاه‌ها را مجبور کرده است که به دنبال راه جایگزین برای پاسخ گویی به نیاز جامعه هستند. در مطالعه حاضر از همان کیت های موجود در بازار استفاده شد، اما با اعمال کنترل‌های متعدد در تمام مراحل کاری سعی شد شانس نتایج کاذب به حداقل رسانده شود. از این رو، در گام اول بیماران با ژن‌هایی همچون E، ORF1 و N غربال و سپس با ژن RdRp تایید شدند. در مواقعی مشاهده شد که مستر میکس RT-PCR بدون اضافه کردن نمونه پیک هایی مشابه کنترل مثبت می‌دهد که ربطی به آلودگی ندارد و احتمال داده شد که این پیک‌ها مربوط به هیدرولیز پروب‌ها باشد. بنابراین، برای کنترل این مورد علاوه بر NTC ، یک تا دو خانه از استریپ به مستر میکس بدون افزودن ماده دیگری اختصاص داده شد تا از عملکرد صحیح مستر میکس اطمینان حاصل شود.

همچنین مشاهده شد که محتوای کیت‌های RT-PCR با کنترل مثبت آلوده شده‌اند که این مورد مربوط به ارسال و انتقال نامناسب محموله ها است. برای کنترل این مورد به محض باز کردن کیت کنترل مثبت را در ایستگاه کاری مجزایی قرار داده و بقیه محتویات کیت با وایتکس آلودگی‌زدایی شدند. همچنین کنترل مثبت آخرین نمونه‌ای بود که به استریپ اضافه شد.

علاوه بر این، نمونه‌های منفی قطعی با مستر میکس ایجاد پیک کرده که احتمال داده شد این مورد نیز مربوط به واکنش مستر میکس با بقایای حاصل از مرحله استخراج و یا محتویات کیت استخراج باشد. برای کنترل این مورد هر روز یک نمونه منفی تکرار شد و چنان چه پیکی مشاهده شد میزان آستانه و Baseline در مرحله تحلیل نتایج به طور دستی تنظیم شد.

نتیجه‌گیری:

به طور عملیاتی علاوه بر کنترل کیفی‌های مرسوم که در رابطه با کیت‌های بیولوژی مولکولی وجود دارد، کنترل کیفی‌های بسیار بیشتری برای تشخیص صحیح موارد مثبت کووید ۱۹ لازم است. بنابراین، افزودن مستر میکس به یک یا دو خانه از استریپ‌های RT-PCR و تکرار یک نمونه منفی قطعی در هر روز کاری می‌تواند از نتایج مثبت کاذب جلوگیری کند.

تشکر و قدرانی:

این مطالعه توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جهرم مورد حمایت قرار گرفته است.

References:

1. Cheng ZJ, Shan J. 2019 Novel coronavirus: where we are and what we know. Infection. 2020;48(2):155-63.
2. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Nature Microbiology. 2020;5(4):536-44.
3. Del Rio C, Malani PN. 2019 Novel Coronavirus—Important Information for Clinicians. JAMA. 2020;323(11):1039-40.
4. Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: A review. Clinical Immunology. 2020;215:108427.
5. Greenberg SB. Update on Human Rhinovirus and Coronavirus Infections. Semin Respir Crit Care Med. 2016;37(4):555-71.
6. Kahn JS, McIntosh K. History and Recent Advances in Coronavirus Discovery. The Pediatric Infectious Disease Journal. 2005;24(11):S223-S7.
7. Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: current knowledge. Virology Journal. 2019;16(1):69.
8. Yoshimoto FK. The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. The Protein Journal. 2020:1.
9. ncbi. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_045512.
10. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. Methods Mol Biol. 2015;1282:1-23.
11. of the International CSG. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Nature Microbiology. 2020;5(4):536.
12. Chan JF, Yip CC, To KK, Tang TH, Wong SC, Leung KH, et al. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. J Clin Microbiol. 2020;58(5). 13. WHO. WHO: Laboratory testing of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases: interim guidance, 17 January 2020.
14. W B, S S, A M, Robert H. A Comprehensive Review of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. Cureus. 2020;12(5):e7943.
15. Killerby ME, Biggs HM, Haynes A, Dahl RM, Mustaquim D, Gerber SI, et al. Human coronavirus circulation in the United States 2014-2017. J Clin Virol. 2018;101:52-6.
16. Tan W, Aboulhosn J. The cardiovascular burden of coronavirus disease 2019 (COVID-19) with a focus on congenital heart disease. Int J Cardiol. 2020 Jun 15;309:70-7.
17. Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. J Clin Microbiol. 2020;58(6).
18. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(3).

Original Article

Laboratory diagnosis challenges of Covid-19: a Real-time RT-PCR assay-based survey

Saiedeh Erfanian[1], Danesh javeshghani[2], Mohsen Farhang[3], Abazar Roustazadeh[4*]

Received:2021.05.21 Revised:2021.06.26 Accepted: 2021.06.29

1. Department of Tissue Engineering, Faculty of Basic Sciences and Advanced Medical Technologies, Royan Institute, ACECR, Tehran, Iran
2. Department of Physiology, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
3. Molecular Study and Diagnostic Center, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
4. Department of Biochemistry, Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, Research Center for Non-communicable Diseases, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.19, No.1, Spring 2021

Pars J Med Sci 2021;19(1):63-68

Abstract:

Introduction:
A novel coronavirus has recently been discovered in Wuhan, China in December 2019 named SARS-COV-2. Sensitive molecular assays are now available for detection of SARS-COV-2. The aims of this study were to detect positive subjects of SARS-COV-2 and to survey some challenges that are encountered practically in detection of the virus by Real-time RT-PCR (rRT-PCR) technique.

Materials and Methods:
271 subjects including 105 women and 166 men were registered by census method from 15 April to 15 Jun of 2020. Nasopharyngeal and oropharyngeal swab samples of suspicious cases were collected for RNA extraction to identify SARS-COV-2 by rRT-PCR amplification.

Results:
52 women and 82 men were positive for Covid-19. However, technically the results showed that in the time period of 15 April to 15 May of 2020 the contents of received rRT - PCR kits were infected with positive control. 8 % of certain negative control samples showed a peak resembling to that of the positive samples in the rRT - PCR process. In addition, the results showed that in some of the rRT - PCR kits the master mix would produce peaks like positive control without adding the sample to it automatically in 7 % of the tests.

Conclusion:
Having different types of negative control for diagnosis of SARS-COV-2 is necessary in extraction and rRT- PCR steps to reduce the chance of having false positive results.

Keywords: Coronavirus, Polymerase Chain Reaction, Molecular Study, Quality Control

* Corresponding author Email: Roustazadeh@jums.ac.ir