



نکاتی در مورد تشخیص مولکولی ویروس SARS-CoV-2 با استفاده از تکنیک Real-time PCR

سید جلال کیانی: گروه ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و آزمایشگاه تشخیص مولکولی کرونای معاونت بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

سعید قربانی: گروه ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

فرهاد سیف: سازمان جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

مجید خوش میرصفا: گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده ایمونولوژی و بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (* نویسنده مسئول) Khoshmirsafa.m@iums.ac.ir

فرح بخارایی سلیم: گروه ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و آزمایشگاه تشخیص مولکولی کرونای معاونت بهداشت دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (* نویسنده مسئول) bokharaeifarrah@gmail.com

چکیده

کلیدواژه‌ها

سارس کروناویروس-۲،
بیماری COVID-19،
روش RT-PCR

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۱۳

تاریخ چاپ: ۹۹/۰۶/۲۳

همه گیری سارس کروناویروس-۲ در حال حاضر موضوع اصلی مورد بحث در جوامع علمی سراسر جهان است. با توجه به سرعت بالای انتقال این عفونت ویروسی و درگیری تمامی کشورهای جهان، لزوم اتخاذ تصمیمات اساسی به منظور کنترل انتشار این بیماری کشنده ویروسی ضروری به نظر می‌رسد. مهم‌ترین اقدام عملی در این خصوص قطع زنجیره انتقال عفونت بین افراد مبتلا و حساس جامعه می‌باشد که این امر نیازمند انجام سریع و صحیح تست‌های غربالگری عمومی و تایید آن‌ها بوسیله آزمایشات مولکولی جهت تشخیص قطعی و اختصاصی ویروس است. در مطالعه مروری حاضر به جنبه های مختلف تاثیرگذار در انجام تست مولکولی تشخیصی سارس کروناویروس-۲ با استفاده از تکنیک Real-time PCR اشاره شده و راهکارهایی عملی به منظور انجام صحیح این تکنیک و برطرف نمودن خطاهای تکنیکی موثر در نتیجه آزمایش ارائه می‌گردد. علاوه بر این نگاهی اجمالی به فرایندهای قبل از آزمایش (نمونه گیری استاندارد، ارسال نمونه و استخراج ژنوم ویروس) که در نتیجه نهایی آزمایش نقش تعیین کننده ای دارند، خواهیم داشت. کیت‌های تجاری موجود عمدتاً از روش پروب TaqMan برای شناسایی ژن‌های مختلف ویروس (اکثرآ E، N و RdRP) استفاده می‌کنند. همچنین، نمونه گیری نامناسب از طریق بررسی تکثیر یک ژن داخلی (معمولاً RNase P) بررسی می‌شود. اشکال اصلی در انجام تست Real-time PCR برای شناسایی کروناویروس سارس ۲ و البته سایر عوامل عفونی به مرحله قبل از آزمایش باز می‌گردد که نمونه گیری ناصحیح ممکن است منجر به منفی کاذب گردد. همچنین، دوره بیماری در زمان نمونه گیری، ناحیه نمونه گیری، حمل و نقل نمونه، کیفیت کیت‌های استخراج و تشخیص، همگی در نتیجه نهایی آزمون تاثیرگذار هستند.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Kiani SJ, Ghorbani S, Seif F, Khoshmirsafa M, Bokharaei-Salim F. Tips for molecular detection of SARS-CoV-2 using Real-time PCR method. Razi J Med Sci. 2020;27(6):113-125.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.



Review Article

Tips for molecular detection of SARS-CoV-2 using Real-time PCR method

Seyed Jalal Kiani, Department of Virology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, & Coronavirus Molecular Diagnosis Laboratory, Vice chancellor of Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Saied Ghorbani, Department of Virology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Farhad Seif, Department of Immunology & Allergy, Academic Center for Education, Culture, and Research, Tehran, Iran

① **Majid Khoshmirisafa**, Immunology Research Center, Institute of Immunology and Infectious Diseases, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, & Department of Immunology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author) khoshmirisafa.m@iums.ac.ir

① **Farah Bokharaei-Salim**, Department of Virology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, & Coronavirus Molecular Diagnosis Laboratory, Vice chancellor of Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author) bokaraei.f@iums.ac.ir

Abstract

The recent SARS-CoV-2 pandemic is the hottest topic of the scientific world all around the globe. Regarding the fast-spreading nature of the infectious agent and the involvement of all countries, it seems necessary to take fundamental practical actions to restrain the spread of this deadly viral disease. The first and likely most important action could be breaking the chain of infection between susceptible hosts which needs the performance of intensive fast and accurate screening tests for specific detection of the virus and infected individuals. This review focuses on different influential aspects of performing a molecular diagnostic test using standard Real-Time PCR assay to detect SARS-CoV-2. Practical hints for performing an accurate test and overcoming potential technical problems that might affect the final result are discussed as well. Moreover, pre-analytical aspects of the test, including standard sampling, sample transfer, and genome extraction are taken into consideration. Briefly, both nasopharyngeal and oropharyngeal samples were taken in the virus transport medium (VTM), highly recommended to be kept in the cold chain. After primary checks regarding sampling criteria, all samples are aliquoted in screw-capped tubes. This step is considered with the highest potential for contamination and the risk of infection for laboratory technicians. So, it should be performed in biosafety level 2 laminar flow cabinets. Aliquoted samples are then sent to the genome extraction unit. Genomic RNA extraction is performed by different methods, including phenol-chloroform precipitation, silica-based membrane isolation, and magnetic beads. Although precipitation-based methods, mostly performed using TRIzol are associated with higher yields of RNA, the presence of impurities such as proteins, salts, polyphenols, and polysaccharides in the final product is lead to reduced success in the following molecular experiments. Column-based methods, although more expensive, are more user-friendly and result in a more pure product. Extracted RNA is subjected to one-step real-time PCR assay. To perform real-time PCR, it is highly recommended to prepare a reaction mix for all the samples plus one (n+1) which results in the optimum use of kit contents, homogenous solution for all samples, and reduced chance of contamination. Moreover, several control reactions are needed to be included in the assay including negative control, positive control, and no-template control (NTC). Currently, available diagnostic kits of SARS-CoV-2 use mostly the TaqMan probe

Keywords

SARS-CoV-2,
COVID-19,
RT-PCR method

Received: 02/05/2020

Published: 13/09/2020

strategy to detect different viral genes (mostly, E, N, RdRP). Moreover, failure in sampling is investigated through analysis of the amplification of an endogenous internal control gene (mostly RNase P). Based on the manufacturers' instructions, the thermal profile is set in the real-time PCR instrument. This profile commonly includes a hold step for reverse transcription of RNA in ~50°C for 10-30 minutes and another hold step for cDNA pre-denaturation in 95°C for 1-15 minutes. Amplification cycles (not less than 40 cycles) are then applied via the denaturation step and annealing/extension step. It is very important to pay attention to the acquisition of fluorescence in different kits, because they may use different channels to read the data in pre-defined instruments. At the end of the test, the threshold cycle (Ct) is defined by the user in the exponential phase of the test, and all the curves which hit the threshold before cycle 40 can be considered positive if the shape of the curve is sigmoidal. Analysis and report of the results are dependent on the accuracy of the test which is deduced from the results of negative control, positive control, and NTC. The main drawback of the real-time PCR assay to test SARS-CoV-2 infection is in the pre-analytical step in which inappropriate sampling may lead to false-negative results. Moreover, the course of the disease in the time of sampling, sampling area, the shipment of the sample, quality of the extraction kit as well as quality of the detection kit is all contributed in the final result of the virus detection. resistance characteristics are determined and appropriate antibiotics are prescribed.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Kiani SJ, Ghorbani S, Seif F, Khoshmirsafa M, Bokharaei-Salim F. Tips for molecular detection of SARS-CoV-2 using Real-time PCR method. Razi J Med Sci. 2020;27(6):113-125.

***This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.**

مقدمه

در دسامبر سال ۲۰۱۹، کرونا ویروس جدیدی در شهر ووهان کشور چین منجر به ایجاد بیماری با علائم حاد تنفسی گردید. منشأ اولیه این ویروس ظاهراً به بازارچه ساحلی برمی گردد که غذاهای دریایی و سایر حیوانات به صورت خام و غیربهداشتی به فروش می رسیدند. آنالیزهای فیلوژنتیکی نشان داده اند که ویروس severe acute respiratory Coronavirus-2 (SARS-Cov-2) متعلق به جنس بتاکروناویروس ها بوده و نسبت به سایر ویروس های این جنس، قدرت سرایت بالاتری دارد (۱، ۲). همچنین، نتایج نشان داده است که ویروس SARS-Cov-2 با ویروس سارس ۷۹ درصد و با ویروس کرونای خفاش ۹۶ درصد همولوژی در توالی ژنوم دارد. این ویروس توانایی انتقال از طریق آئروسول، قطرات تنفسی و سطوح آلوده را دارد.

با توجه به اعلام سازمان بهداشت جهانی (WHO)، تا اواخر اردیبهشت ماه ۱۳۹۹، عفونت با ویروس SARS-Cov-2، تقریباً در تمامی کشورهای دنیا شناسائی شده است و از حالت اندمی و اپیدمی به حالت پاندمی تبدیل گردیده است (۳) و برطبق گزارش این سازمان، بالغ بر ۵ میلیون نفر در سراسر دنیا به این ویروس آلوده اند و مرگ و میر ناشی از این عفونت ویروسی در حدود ۴۰۰ هزار نفر می باشد. بیشترین میزان مبتلایان و فوتی ها از ایالات متحده گزارش شده است. با این حال، شیوع ویروس در کشورهای چین، روسیه، انگلستان، ایران، ایتالیا، اسپانیا، برزیل و کره جنوبی قابل توجه بوده است. طبق گزارش وزارت بهداشت ایران، تاکنون بالغ بر ۲۵۰ هزار نفر در ایران بیمار مبتلا به COVID-19 شناسایی شده و بیش از ۱۳۰۰۰ نفر فوت شده اند. تا قبل از شناسایی ویروس سارس در سال ۲۰۰۳، کروناویروس ها به عنوان ویروس های بیماریزای خطرناک در انسان محسوب نمی شدند و در اکثر مواقع با درگیری خفیف و علائم دستگاه تنفسی و بدون علامت بودند. ویروس سارس در سال ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳ حدود ۸۰۸۹ نفر را مبتلا و باعث مرگ حدود ۷۷۴ نفر گردید. بعد از این ویروس، در سال ۲۰۱۲، ویروس مرس (MERS) در عربستان سعودی شایع شد که منجر به ابتلای ۲۴۵۸ نفر و مرگ ۸۴۸ نفر گردید (۴). هم اکنون نیز، سومین ویروس کشنده خانواده

کروناویروسها، SARS-Cov-2 شناسایی شده است و بیماری ایجاد شده نیز Coronavirus disease 2019 (Covid-19) نامگذاری شده است. ویروس SARS-Cov-2 نسبت به دو ویروس SARS و MERS قدرت سرایت و شیوع بالاتری داشته است، با این حال، میزان کشندگی این ویروس نسبت به دو ویروس قبلی کمتر بنظر می رسد (۴). حدود ۷۰ درصد بیماران مبتلا به Covid-19 فاقد علامت بوده و در بقیه موارد تب، سرفه خشک، و تنگی نفس از شایع ترین علائم بالینی می باشد.

متاسفانه تا کنون، واکسن و داروی موثری برای این عفونت ویروسی ساخته نشده است، بنابراین تشخیص سریع و دقیق این عامل ویروسی می تواند در بررسی های اپیدمیولوژیک و شناسایی افراد ناقل بسیار ارزشمند باشد (۵-۷). با توجه به دستورالعمل های سازمان بهداشت جهانی، تشخیص قطعی افراد مبتلا به این عفونت ویروسی، روش های مولکولی از جمله استفاده از تکنیک Real-time PCR (RT-PCR) است (۶). هدف از این مطالعه مروری، بررسی جنبه های مختلف تاثیرگذار در انجام تست تشخیصی ویروس SARS-Cov-2 با استفاده از تکنیک RT-PCR و همچنین ارائه راهکارهایی به منظور انجام صحیح این تکنیک و برطرف نمودن خطاهای تکنیکی موثر در نتیجه آزمایش است. علاوه بر این نگاهی اجمالی به فرایندهای قبل از آزمایش (Pre-analytical)؛ شامل روش نمونه گیری استاندارد، شرایط ارسال صحیح نمونه و استخراج ژنوم ویروس با بازدهی بالا (efficiency) که در نتیجه نهایی آزمایش نقش تعیین کننده ای دارند، خواهیم داشت.

تشخیص

ویروس SARS-Cov-2 اولین بار توسط موسسه تحقیقاتی چین، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی شناسایی گردید. حضور اسپایک های اطراف پارتیکل ویروسی که نمای هاله خورشیدی را ایجاد کرده بود، نشان داد که این ویروس عضوی از خانواده کروناویروس ها می باشد (۸). بعد از مشخص شدن توالی ژنومی ویروس، توسط نرم افزارهای فیلوژنتیکی، برای نواحی حفاظت شده (Conserve) ویروس پرایمرهای برای

جدول ۱- پرایمرهای معرفی شده توسط WHO برای ژن های RdRP، N و E متداول در کیت‌های تجاری (۱۱)

ژن	پرایمر	توالی
RdRP ¹	RdRp_SARSr-F RdRp_SARSr-P2	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC
E ²	RdRp_SARSr-R E_Sarbeco_F E_Sarbeco_P1	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG
N ³	E_Sarbeco_R N_Sarbeco_F N_Sarbeco_P N_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA CACATTGGCACCCGCAATC ACTTCTCAAGGAACAACATTGCCA GAGGAACGAGAAGAGGCTTG

1. RdRP: RNA-dependent RNA Polymerase

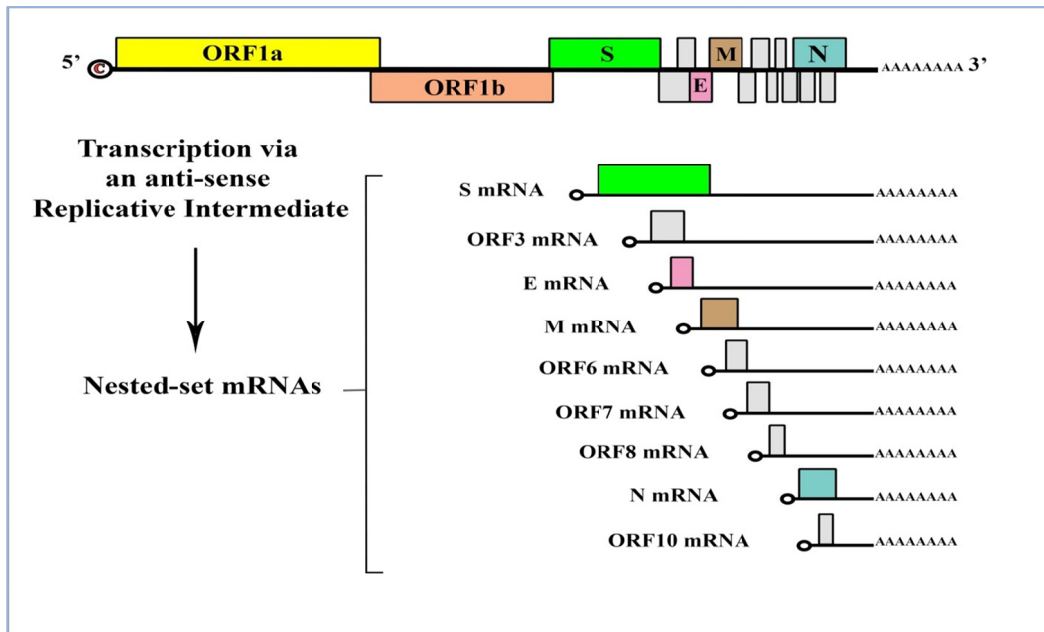
2. E: Envelope

3. N: Nucleocapsid

سنس مثبت ویروس، منجر به تولید مجموعه پروتئین‌های آنزیمی ویروس از جمله آنزیم RNA-Dependent RNA (Polymerase: RdRP) می‌گردد (۱۲). این آنزیم اختصاصی RNA ویروس‌ها با کپی برداری از ژنوم، یک واسطه تکثیری (Replicative Intermediate) سنس منفی تولید می‌کند که به منظور همانندسازی و رونویسی مورد استفاده قرار می‌گیرد. طی فرایند رونویسی از واسطه‌های تکثیری، RdRP ویروس علاوه بر تولید کپی‌های کامل ژنومی، مسئول تولید mRNA پروتئین‌های ساختمانی ویروس است که به صورت گرادینانی از mRNA‌های تو در تو (nested-set) (mRNAs) از انتهای منطبق بر 3' ژنوم ساخته می‌شوند (۱۳) (شکل ۱). این مکانیسم بدان معناست که از ترتیب ژن‌های 5'-S-E-M-N-3' بیشترین میزان رونویسی از ژن N و کمترین میزان رونویسی از ژن S انجام می‌گیرد که با نیاز ویروس در چرخه تکثیر سلولی آن همخوانی دارد (۱۲، ۱۳). این مکانیسم و آگاهی در مورد نواحی حفاظت شده ژنوم ویروس منجر به انتخاب نواحی N، E و orf1b برای طراحی پرایمرهای تشخیصی این ویروس شده است (۱۱). قسمتی از ژن orf1b حاوی توالی کدکننده آنزیم RNA پلی‌مراز (RdRP) ویروس است. ژن N کدکننده پروتئین نوکلئوکپسید (Nucleocapsid) ویروس بوده که ژنوم را در بر می‌گیرد و از آن حفاظت می‌کند. توالی‌های حفاظت شده متعددی در ژن N گزارش شده است که دارای نرخ رخداد جهش پایینی هستند.

ردیابی ژنوم این ویروس طراحی گردید. همچنین، با توجه به روند پاتوژنز این بیماری و درگیر شدن ریه‌ها، حضور ضایعات پاتولوژیک مانند درگیری یکطرفه، درگیری دوطرفه، نمای جلائی شیشه‌ای در عکس‌های رادیولوژی و سی تی اسکن قابل مشاهده می‌باشند (۹). ولی به دلیل اینکه، روش‌های رادیولوژیکی، توانایی افتراق انواع پنومونی‌ها را از هم ندارند، بنابراین حضور یا عدم حضور عفونت با کووید-۱۹ را نمی‌توانند بطور قطعی تأیید کنند. از اینرو، نیاز به روشی قابل اعتماد و تکرار می‌باشد که بتوان با آن این عامل ویروسی را در نمونه‌های بالینی ردیابی نمود و ابتلا به این عفونت را بطور قطع اعلام کرد. بر طبق دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (WHO) و مرکز کنترل بیماری‌ها (CDC)، برای تشخیص و تأیید نهایی عفونت با کروناویروس، باید تست‌های مولکولی مانند Real-Time PCR (RT-PCR) انجام شود (۱۰). لازم به ذکر است که لازمه‌ی انجام RT-PCR موفق، طراحی مجموعه پرایمر-پروب‌های اختصاصی می‌باشد که بتواند با حساسیت بالایی حضور ژن مورد نظر را شناسایی کند. از این رو، شرکت‌های متعددی در سراسر دنیا، پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های مختلف این ویروس طراحی نموده‌اند. عمده‌ی پرایمرهای طراحی شده، برای سه ناحیه از ژنوم ویروس SARS-CoV-2 می‌باشد، که شامل ژن‌های orf1b، N و E است (۱۱) (جدول ۱).

در چرخه تکثیر ویروس در سلول میزبان، پس از اتصال و نفوذ به سیتوپلاسم، ترجمه اولیه از ژنوم RNA



شکل ۱- نقشه ژنومی کروناویروس سارس-۲ و نحوه رونویسی از آن. ژنوم سنس مثبت ویروس توسط آنزیم RNA پلیمراز ویروسی کپی برداری می شود تا یک واسطه تکثیری سنس منفی تولید شود. رونویسی مجدد از این واسطه تکثیری منجر به تولید کپی هایی با طول کامل و همچنین، مجموعه ای از mRNA های تو در تو (nested) می گردد که برای تولید پروتئین های ساختمانی و غیر ساختمانی ویروس مورد استفاده قرار می گیرند (۱۱).

کروناویروس ارسال می گردد. به منظور افزایش احتمال ردیابی ژنوم ویروس در نمونه، توصیه می شود که از دو ناحیه (اوروفارنکس و نازوفارنکس) نمونه گیری به عمل آید و هر دو سوپ در داخل یک محیط VTM قرار داده شود. طبق پروتکل CDC و WHO، باید از سوپ های پلی استر، داکرون (Dacron) یا رایون (Rayon) با شفت پلاستیکی (قابل انعطاف) برای نمونه برداری استفاده گردد و سوپ های پنبه یا آلژینات کلسیم یا آنهایی که شفت چوبی دارند نباید مورد استفاده قرار گیرند چون حاوی ترکیباتی هستند که ممکن است ویروس ها را غیرفعال کرده و یا به عنوان مهارکننده در فرایند انجام تست های ملکولی عمل نمایند (۱۵، ۱۶).

محیط حمل نمونه ویروسی یا Viral Transport Medium

سوپ استفاده شده در تهیه نمونه ویروس تنفسی باید در لوله فالکون ۱۵ میلی لیتری حاوی حدود ۱ تا ۳ میلی لیتر از محیط VTM به آزمایشگاه انتقال داده شود. طبق پروتکل CDC، محیط VTM محلولی بافری است که حاوی ترکیبات زیر می باشد: محیط بافری HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)، حاوی کلسیم و منیزیم (فاقد فنول رد)، سرم جنین

ژن E نیز سازنده یک پروتئین کوچک سطحی پوشینه ویروس (Envelope) است (۱۴).

فرایند تشخیص مولکولی SARS-CoV-2 نمونه گیری از بیماران

طبق دستورالعمل WHO، بهترین نمونه برای شناسایی SARS-CoV-2، استفاده از نمونه Broncho Alveolar Lavage fluid (BAL) می باشد. با توجه به نمونه گیری دشوار BAL بعلت در دسترس نبودن برونکوسکوپ، تهاجمی بودن و احتمال آلوده شدن فرد نمونه گیر، توصیه شده است از نمونه های دیگری مانند سوپ حلقی دهانی (اوروفارنکس)، سوپ حلقی بینی (نازوفارنکس) و نمونه خلط استفاده شود. سوپ داکرون استریل باید با دقت بر روی نواحی ذکر شده مالیده و چند بار چرخانده شود تا نمونه گیری به درستی انجام شود. در صورتیکه نمونه گیری در روزهای اول شروع علائم بیماری انجام شود، احتمال شناسایی ویروس را بالا می برد. پس از نمونه برداری، باید سوپ حاوی نمونه، داخل یک فالکون ۱۵ میلی لیتری حاوی محیط Viral Transport Medium (VTM) قرار گرفته و با حفظ زنجیره سرد به آزمایشگاه تشخیص مولکولی

به بیمار با برگه درخواستی مطابقت داده می شود و سپس در فالكون حاوی نمونه در شرایط کاملا کنترل شده باز می شود و با پی پت پاستور پلاستیکی چند بار پیپتاژ می شود تا نمونه کاملا مخلوط شود. از سوی دیگر روی دو میکروتیوب در پیچ دار نام و مشخصات بیمار نوشته می شود و نمونه بیمار با پی پت پاستور پلاستیکی برداشته می شود و درون میکروتیوب در پیچ دار ریخته می شود و برای انجام استخراج ژنوم ویروسی ارسال می شود.

قابل ذکر است که نمونه گیری نامناسب، عدم رعایت زنجیره سرد و نامناسب بودن ظروف حمل نقل، منجر به نتیجه منفی کاذب می شود، چنانچه نتایج یک مطالعه در چین نشان داده است که حساسیت تست RT-qPCR برای ردیابی ژنوم ویروس در نمونه های بالینی بیماران مبتلا به عفونت با ویروس کووید-۱۹، در حدود ۷۱ درصد می باشد و در حدود ۲۰-۳۰ درصد نیز منفی کاذب مشاهده شده است (۱۹). ایجاد منفی کاذب در تشخیص مولکولی ژنوم این ویروس ممکن است به دلایل زیر باشد: نحوه نمونه برداری، محل نمونه برداری (مجاری فوقانی یا تحتانی تنفسی)، زمان نمونه برداری (زمان های مختلف سیر بیماری)، و کارایی کیت های استخراج ژنوم ویروس و همچنین آنالیز اطلاعات بدست آمده از انجام آزمایش (۲۰).

استخراج نمونه

به طور کلی برای استخراج ژنوم ویروس (RNA) از نمونه ها می توان از روش هایی نظیر استخراج با فنل-کلروفرم، استخراج با ستون های سیلیکا و استخراج با استفاده از بیدهای مغناطیسی (magnetic beads) استفاده کرد. همچنین، می توان فرایندهای استخراج ذکر شده را با استفاده از دستگاه های اتوماتیک (extraction automation) نیز انجام داد (۲۱).

در روش های استخراج با فنل-کلروفرم عمدتاً از محلول تجاری تریزول (TRIzol) استفاده می شود که جزو مواد پرخطر و سرطانزا محسوب می شود. با این که کمیت RNA (concentration) استخراج شده در این روش، معمولاً بیش از سایر روش ها است، با این حال وجود آلودگی های پروتئینی، نمکی، پلی فنولی و پلی ساکاریدی ممکن است موجب نامناسب بودن کیفیت RNA استخراج شده برای مراحل ملکولی بعدی

گاو (FBS یا Fetal Bovine serum)، آنتی بیوتیک هایی مانند جنتامایسین سولفات، و ترکیبات ضد قارچی مانند آمفوتریسین B. این مواد در شرایط استریل، در زیر هود های بیولوژیک با هم ترکیب شده و از فیلتر عبور داده شده و در ظروف در پیچ دار درون یخچال نگهداری می شوند. چنین ترکیباتی امکان حفظ زیستایی ویروس پس از نمونه گیری و تا زمان انتقال به آزمایشگاه را فراهم می کنند (۱۷).

حمل و نقل نمونه

سوپا گرفته شده از بیماران در داخل لوله فالكون حاوی محیط VTM قرار داده می شود. لازم است از بسته شدن کامل درب لوله فالكون اطمینان حاصل شود تا از احتمال نشت نمونه و نشر آلودگی در حین حمل و نقل جلوگیری شود. اسم بیمار همراه با کد نمونه و سایر مشخصات بر روی لوله فالكون به صورت خوانا درج می گردد. لوله فالكون حاوی نمونه باید در ظروف مخصوص حمل نمونه بیولوژیک که دارای دو لایه حفاظتی است، حمل می شود (نمونه در مجموع در سه لایه حفاظتی قرار گرفته است). به همراه ظروف حمل نمونه، باید برگه حاوی مشخصات و کد بیماران نیز ارسال گردد. فرد حمل کننده نمونه های بیولوژیک باید نسبت به بیماری، نوع نمونه، و شرایط حمل و نقل نمونه و خطرات مرتبط با آن آگاهی لازم را داشته باشد. تمامی مراحل حمل نمونه ها با حفظ زنجیره سرد انتقال، باید در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد انجام پذیرد (۱۶-۱۸).

معیارهای رد یا پذیرش نمونه

از شرایط پذیرش نمونه می توان به حمل و نقل نمونه در ظرف دو لایه مخصوص حمل نمونه بیولوژیک، اطمینان از حمل نمونه با حفظ زنجیره سرد، بررسی فیزیکی فالكون های حاوی نمونه (عدم نشتی)، بررسی حجم VTM ارسالی (حداقل ۱ میلی لیتر) و وجود یا عدم وجود سوپا مناسب اشاره نمود. نمونه هایی که درون میکروتیوب ارسال شده باشند و یا فالكون فاقد مقدار مناسب از محیط VTM باشد، فاقد شرایط لازم برای پذیرش هستند.

بعد از پذیرش، سطح خارجی ظروف حاوی نمونه ها، با الکل ۷۰ درجه ضد عفونی می شود. در زیر هود کلاس دو در ظرف حاوی نمونه باز می شود و نام و کد مربوط

شرایط محیطی استریل در طول فرایند استخراج و همچنین استفاده از نوک سمپلرهای استریل فیلتردار، عاری از نوکلئازها (RNase, DNase Free) موجب به دست آوردن محصولی عاری از آلودگی می شود که کیفیت مناسب تری برای آزمایشات بعدی دارد.

از مهمترین نکات در استخراج اسیدهای نوکلئیک از نمونه های پرخطر بیولوژیک، اولین مرحله استخراج یعنی زمان انتقال نمونه به میکروتیوب حاوی بافر لیزکننده است که می تواند بیشترین خطر را برای پرسنل آزمایشگاه به همراه داشته باشد. لذا این مرحله می بایست در هودهای لامینار فلو با سطح ۲ ایمنی زیستی انجام شود. در مرحله اول ریختن نمونه باید حتما دو کارشناس با هم همکاری کنند به این ترتیب که یک کارشناس نام و کد نمونه را با شیت آماده شده جهت استخراج مطابقت دهد و در میکروتیوب حاوی نمونه را در شرایط کاملا کنترل شده باز کنند و کارشناس دیگر نمونه را از میکروتیوب برداشته و در میکروتیوب حاوی محلول بافر لیزکننده بریزد.

آماده سازی مواد اولیه واکنش Real time PCR

از آنجایی که در حال حاضر اکثر کیت های تجاری تشخیص ملکولی SARS-CoV-2 به صورت Real-time PCR یک مرحله ای می باشند، بدین معنی که واکنش سنتز cDNA و مراحل واکنش PCR در یک میکروتیوب انجام می پذیرد، توصیه می شود برای آماده سازی مواد اولیه واکنش شامل پرایمر-پروب ها و مسترمیکس و همچنین تقسیم آنها در میکروتیوب های نمونه، مخلوط واکنشی (reaction mix) تهیه شود (۲۴). از مزیت های تهیه مخلوط واکنش می توان به استفاده بهینه از مقادیر مواد اولیه کیت، ایجاد یک بافر همسان طبق دستورالعمل و جلوگیری از آلودگی اشاره نمود.

ذکر این نکته بسیار مهم است که پس از اضافه نمودن مخلوط واکنش به میکروتیوب ها در work station تمیز، بلافاصله نمونه کنترل منفی (negative control) به میکروتیوب اختصاصی خود اضافه و درب آن بسته می شود. نمونه های بیماران در work station دیگری به میکروتیوب ها اضافه می شود. خاطر نشان می شود که قبل از این مرحله، نمونه ها به خوبی همگن شده (spin-down) و در rack های تمیز به این work station منتقل می شوند. همچنین، پس از اضافه

شامل سنتز DNA مکمل (complementary DNA: cDNA) و واکنش Real time PCR. علاوه بر این، استخراج با روش فنل-کلروفرم حساس و وابسته به تکنیک فردی (subjective procedure) است. سهولت استفاده از روش ستونی به همراه خلوص (purity) بالای محصول استخراج شده سبب استقبال گسترده تر از این روش در آزمایشگاه ها شده است، هرچند ممکن است از نظر هزینه مقرون به صرفه نباشند (۲۱).

عموما در روش های استخراج ستونی بعد از لیز نمونه های بیولوژیک در حضور پروتئیناز K، به نمونه ها اتانول خالص اضافه می شود تا در هنگام عبور نمونه از غشای سیلیکایی، شرایط اتصال DNA یا RNA به غشا را تسهیل نماید. آلودگی های پروتئینی یا ناخالصی هایی مانند نمک ها، متابولیت ها و اجزای سلولی با دو بافر شستشو (wash buffer) طی مراحل شستشو حذف می شوند. در نهایت، اسید نوکلئیک متصل به غشا با استفاده از بافر الوشن (Elution) از غشا جدا شده و جمع آوری می گردد (۲۲). اکثر کیت ها به منظور تسهیل عبور محلول از غشای سیلیکایی مراحل متعدد سانتریفوژ با دور بالا را در نظر گرفته اند، هرچند این امر با استفاده از دستگاه های ایجاد خلاء (Vacuum) نیز قابل انجام است.

تفاوت های تکنیکی ممکن است در روش اجرای کیت های استخراج مختلف مشاهده شود. به عنوان مثال، در برخی از روش های اجرا پس از اضافه کردن بافر لیزکننده (lysis buffer) دوره های انکوباسیون در دمای ۵۶ درجه در نظر گرفته شده تا لیز نمونه به صورت کامل انجام شود. لازم به ذکر است که یکی از کلیدی ترین نکاتی که در کیت های مختلف راندمان نهایی جداسازی اسید نوکلئیک را تحت تاثیر قرار می دهد، کیفیت غشای سیلیکایی استفاده شده در ستون جداسازی است. همچنین، استفاده از Carrier RNA می تواند راندمان اتصال اسید نوکلئیک به غشای سیلیکایی را افزایش دهد (۲۳). بافرهای الوشن متفاوتی در روش استخراج ستونی استفاده می شود که ممکن است سبب اختلافاتی در روش اجرای این مرحله شود. به طور مثال می توان به حرارت دادن بافر و یا استفاده از مقادیر مختلف بافر در این مرحله اشاره کرد. استفاده از اتانول با درصد خلوص بالا (با گرید مولکولی)، فراهم نمودن

فلورسنت توسط دستگاه Real-time PCR، انتخاب صحیح کانال های خوانش مورد نظر کیت است. بطور مثال اغلب کیت های تجاری در دسترس دارای دو تا سه پروب لیبل شده با رنگ های مختلف فلورسنت هستند و کاربر می بایست در فعال نمودن و انتخاب کانال های اختصاصی هر پروب برای هر کیت توجه و دقت لازم را به خرج دهد.

کنترل و تضمین کیفیت

برای اطمینان از صحت عملکرد فرایند استخراج اسید نوکلئیک، سنتز cDNA و واکنش تکثیر از کنترل های مختلف طی یک مرحله کاری (run) استفاده می شود که شامل کنترل منفی، کنترل مثبت، کنترل RT و کنترل داخلی (IC) می تواند باشد (۲۸).

کنترل منفی: در دستورالعمل های همراه کیت های تجاری، استفاده از کنترل منفی در هر مرحله کاری توصیه شده است. این کنترل حاوی نمونه ای است که همواره نتیجه آزمایش آن برای ژن هدف در نظر گرفته شده برای ویروس SARS-CoV-2 منفی می باشد. علاوه بر این، برخی از نمونه های کنترل منفی می توانند حامل کنترل داخلی هم باشند. در برخی از موارد، به جای این نمونه های کنترل منفی، از کنترل منفی بدون الگو (No Template Control) استفاده می شود. این نمونه کنترل منفی شامل همه اجزای واکنش PCR بجز نمونه (template) است که به جای آن از آب عاری از نوکلئاز استفاده می گردد.

کنترل مثبت: همانند نمونه کنترل منفی، استفاده از کنترل مثبت در هر مرحله کاری در کیت های تجاری توصیه شده است. نمونه کنترل مثبت همواره دارای نتیجه آزمایش مثبت برای ژن یا ژن های هدف واکنش PCR است. باید توجه داشت که ذوب و انجمادهای مکرر می تواند سبب ضعیف شدن نتیجه مثبت این کنترل و یا حتی منفی شدن آن شود. همانند نمونه کنترل منفی، نمونه های کنترل مثبت نیز می توانند حاوی ژن کنترل داخلی باشند.

کنترل داخلی (Internal control): این نمونه کنترل برای بررسی صحت و کیفیت نمونه گیری و مرحله استخراج اسید نوکلئیک کاربرد دارد. در برخی از کیت های تجاری از ژن های خانه دار (Housekeeping genes) سلول های انسانی نظیر RNase P استفاده می

نمودن نمونه های بیماران درب میکروتیوب ها به خوبی بسته شده و در آخرنمونه کنترل مثبت به میکروتیوب اختصاصی خود اضافه می شود.

انجام Real time PCR

در حال حاضر اکثر کیت های تشخیصی از TaqMan probe برای شناسایی هدف اختصاصی خود استفاده می کنند. با توجه به قابلیت اکثر دستگاه ها در جمع آوری اطلاعات (data collection) در طول موج های متفاوت فلورسنت، این کیت ها می توانند به صورت همزمان چندین هدف اختصاصی را در نمونه جستجو کنند (۲۵). به طور مثال، برای تشخیص SARS-CoV-2 در نمونه مشکوک می توان از پرایمر-پروب های اختصاصی هر سه ژن E، N و RdRP و همچنین کنترل داخلی (internal control) استفاده نمود.

طبق دستورالعمل کیت مورد استفاده، برنامه کاری مراحل مختلف آزمایش Real time PCR، از قبل در دستگاه تنظیم می شود (۲۶). این مراحل دمایی و زمانی (Thermal profile) در کیت های تجاری مختلف متفاوت می باشد ولی به طور کلی شامل دو مرحله پیش از شروع واکنش PCR (hold) و خود واکنش PCR می باشد. مراحل قبل از واکنش PCR مرتبط با سنتز cDNA و مرحله غیرفعال نمودن آنزیم های مرتبط با سنتز cDNA و همچنین فعال نمودن آنزیم پلیمرز واکنش PCR (Hot Start Taq Polymerase) است. به طور معمول، دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد در بازه زمانی ۱۰ تا ۳۰ دقیقه برای مرحله سنتز cDNA در نظر گرفته می شود که این زمان و دما با توجه به عملکرد و کارایی آنزیم رونوشت برداری معکوس (RT: Reverse Transcriptase) کیت مصرفی متفاوت است (۲۴).

چرخه های (cycles) واکنش PCR با مرحله واسرشتگی (denaturation) شروع و با مرحله اتصال (annealing) / تکثیر (extension) ادامه می کند (Two-Step PCR). لازم به ذکر است در برخی از واکنش ها توصیه می شود که مرحله اتصال و تکثیر به صورت جداگانه در نرم افزار برنامه ریزی شود (Three-Step PCR) (۲۷). تعداد چرخه های واکنش PCR به طور معمول کمتر از ۴۰ چرخه در نظر گرفته نمی شود. از نکات بسیار کلیدی در مرحله جمع آوری داده های

جدول ۲- بررسی خطاها و اقدامات توصیه شده برای برطرف نمودن آن ها

مشکلات احتمالی در تفسیر نتایج	دلیل/دلایل احتمالی	پیشنهادات برای رفع مشکل
در انتهای واکنش نمودار پیشرفت واکنش تشکیل نشود (محصولی تکثیر نشود)	* یکی از اجزای واکنش تخریب، حذف و یا در مقدار مناسب استفاده نشده است. * پروفایل دمایی سنتز cDNA، فعال سازی واکنش و یا واکنش PCR نامناسب تنظیم شده است.	* نمونه کنترل مثبت بررسی شود. بررسی محصول واکنش بر روی ژل * کانال های انتخاب شده با دستورالعمل سازنده دوباره بررسی شوند.
تعداد سیکل ها کمتر از ۴۰ (یا ۴۵) سیکل انتخاب نشود.	* مقدار و یا غلظت الگو بهینه نیست. * الگو با کیفیت مناسب استخراج نشده است. * در نمونه استخراج شده ماده ممانعت کننده واکنش PCR وجود دارد.	* نمونه کنترل مثبت بررسی شود. بررسی محصول واکنش بر روی ژل * تعداد سیکل ها کمتر از ۴۰ (یا ۴۵) سیکل انتخاب نشود. * غلظت، آلودگی پروتئینی و سایر تداخل کننده ها در محصول استخراج شده با نانودراپ ارزیابی شود. میتوان کیفیت اسید نوکلئیک استخراج شده را نیز بر روی ژل بررسی شود. * روش اجرا و دستورالعمل یکبار دیگر بررسی شود. * انتهای واکنش از بسته بودن درپوش میکروتیوب ها اطمینان حاصل شود.
کارایی (بازده) واکنش پایین است (نمودار پیشرفت واکنش بشکل استاندارد تشکیل نشده است)	* درپوش میکروتیوب ها/استریپ ها بخوبی بسته نشده است. * پروفایل دما و زمان واسرشتگی اولیه (Hold) مناسب نیست (سنتز cDNA) * پروفایل دما و زمان واسرشتگی اولیه (Hold) مناسب نیست (شروع واکنش برای آنزیم های Hot start). * زمان و دمای اتصال واکنش PCR نامناسب است.	* مراحل انجام شده با دستورالعمل سازنده دوباره بررسی شوند.
مثبت شدن نمونه کنترل منفی	* در نمونه مقداری ممانعت کننده واکنش وجود دارد. * کیفیت و کمیت نمونه استخراج شده مناسب نیست. * آلودگی حین سمپلینگ نمونه * آلوده شدن محلول ها و اجزای واکنش	* دما و زمان اتصال (Annealing) را بهینه کنید. معمولا افزایش این دما سبب تشکیل محصول اختصاصی تر و کاهش آن همراه با کاهش اختصاصیت واکنش است. * نمونه را در رقت های سریالی بررسی نمایید. مراحل شستشو بویژه مراحل آخر استخراج را بررسی نمایید. * سایر نمونه های یک سری کاری را در تفسیر در نظر بگیرید.
منحنی تکثیر کنترل داخلی (IC) مشاهده نمی شود.	* کنترل داخلی به نمونه ها اضافه نشده است/به مقدار مناسب اضافه نشده/ در اثر نگهداری نامناسب و یا ذوب و انجماد مکرر کیفیت خود را از دست داده است(مربوط به کیت هایی است که کنترل داخلی در زمان شروع استخراج به نمونه ها می بایست اضافه شود). * انتخاب نادرست کانال فلورسنت برای پروب کنترل داخلی * تخریب جزئی و یا کلی نمونه کنترل مثبت بدلیل استفاده مکرر (ذوب و انجماد بیش از اندازه) * نگهداری در دمای نامناسب	* استفاده از نمونه کنترل مثبت جدید، تقسیم نمودن در ویال های متعدد متناسب با ران های کاری (Aliquot) * بررسی دمای نگهداری متناسب با دستورالعمل سازنده * کانال های انتخاب شده با دستورالعمل سازنده دوباره بررسی شوند.
تکرارپذیری نتایج مطلوب نیست	* خطای تکنیکی سمپلینگ * کالیبر نبودن تجهیزات شامل سمپلرها	* استفاده از افراد متبحر در سمپلینگ * بررسی صحت و دقت سمپلرها

لازم به ذکر است که می توان برای بررسی صحت فرایند استخراج و آلوده نشدن نمونه ها، از نمونه کنترل منفی استخراج نیز استفاده نمود. این نمونه معمولا

شود (۲۹) و در برخی دیگر از کیت ها از نمونه کنترل داخلی طراحی شده برای اضافه شدن به نمونه قبل از شروع مرحله استخراج استفاده می شود.

نمونه گیری بویژه تعداد روزهای سپری شده پس از مواجه با ویروس و یا شروع علائم بالینی در افزایش حساسیت نتیجه و حصول یک گزارش قابل اعتماد می شود. همچنین امید است با شناخت بیشتر از ماهیت بیماریزایی این ویروس، در آینده بیومارکرهای تشخیصی و یا موثر بر بیماریزایی ویروس معرفی شود (۳۰).

نتیجه گیری

با توجه به دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت، مبنی بر اینکه تشخیص مولکولی کروناویروس SARS-CoV-2 روشی استاندارد برای شناسایی افراد مبتلا به این عفونت ویروسی می باشد، مواردی از قبیل، عدم نمونه گیری صحیح، زمان نمونه برداری (سیر بیماری)، محل نمونه برداری، حمل و نقل نمونه، و کارایی کیت های استخراج و تشخیص می توانند نتایج این تست را تحت تاثیر قرار بدهند. از این رو، باید با مرتفع ساختن موارد ایجاد کننده خطا، کیفیت تست را بالا برده و میزان منفی کاذب را تا حد امکان کاهش داد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله حاضر بر خود لازم می دانند که کمال تشکر و قدردانی را نسبت به تک تک اعضای آزمایشگاه تشخیص مولکولی کرونای دانشگاه علوم پزشکی ایران (که در آزمایشگاه قطب کشوری اچ آی وی معاونت بهداشت دانشگاه علوم پزشکی ایران در اسفند ماه سال ۱۳۹۹ راه اندازی شده است) که در انجام آزمایشات تشخیصی ویروس SARS-CoV-2 در طول پاندمی اخیر، فداکاری ها و تلاش هایی بی بدیل داشته اند، ابراز نمایند.

References

1. Sun P, Qie S, Liu Z, Ren J, Xi JJ. Clinical characteristics of 50466 patients with 2019-nCoV infection. medRxiv. 2020.
2. Dehghanbanadaki H, Seif F, Vahidi Y, Razi F, Hashemi E, Khoshmirisafa M, et al. Bibliometric analysis of global scientific research on Coronavirus (COVID-19). Med J Islam Repub Iran. 2020;34(1):354-62.
3. Read JM, Bridgen JR, Cummings DA, Ho A, Jewell CP. Novel coronavirus 2019-nCoV: early

حاوی نمونه های منفی و مثبت تایید شده است که همراه با هر ران استخراج مورد استفاده قرار می گیرد.

گزارش نتایج

درانتهای فرایند Real time PCR، با رسم خط آستانه (Threshold)، و عبور نمودار پیشرفت (تکثیر) واکنش از این خط، Ct یا سیکیلی که واکنش در آن مثبت شده است نتایج نمونه ها قابل تفسیر می شود. در واقع Ct یا Threshold Cycle اولین سیکیلی است که در آن نمونه ها وارد فاز لگاریتمی تکثیر شده و توسط دستگاه نور فلورسنت نمونه ها قابل شناسایی است. در برخی دستگاه ها بصورت اتوماتیک این خط رسم و Ct تعیین می شود و در برخی دستگاه های دیگر بصورت دستی این مقدار تعیین می شود (۲۸).

بصورت کلی اگر منحنی تکثیر واکنش خط آستانه را قطع بکند آن نمونه مثبت در نظر گرفته می شود. اگر این Ct در سیکل های زیر ۳۵ تا ۳۷ باشد، نمونه به عنوان نمونه مثبت گزارش شده و اگر Ct بین سیکل های ۳۷ تا ۴۰ بالا باشد نتیجه مشکوک و تفسیر آن دشوار است و توصیه به تکرار آزمایش Real time PCR، تکرار استخراج و انجام مجدد آزمایش مولکولی می باشد و در صورت نرسیدن به جواب قابل قبول تقاضای انجام نمونه گیری مجدد می شود. ذکر این نکته که این اعداد با توجه به تجربه تکنیکی دستگاه مورد استفاده و حساسیت کیت برای شناسایی تعداد کپی های ژنوم ویروس در نمونه (LOD) متفاوت است. همچنین در گزارش نتایج نمونه ها از تفسیر کنترل های مثبت و منفی استفاده شده در همان ران کاری می بایست استفاده شود. بطوری که در نظر گرفتن تکرارپذیری نتایج کنترل مثبت و منفی در ران های کاری متعدد در شرایط یکسان و عدم آلودگی در حین استخراج با استفاده از کنترل مرحله استخراج در صحت و قابل قبول بودن از اهمیت بسزایی برخوردار است (۲۸).

از نقاط ضعف بررسی مولکولی SARS-CoV-2 مرحله پیش از آزمایش (Preanalytical) یا همان نمونه گیری است بطوری که یک نمونه گیری غیر استاندارد گاهی با عدم ردیابی ژنوم ویروس و یا مقدار کم آن در حلق می تواند منجر به شکست کل فرایند تشخیص و صدور یک نتیجه منفی کاذب شود (۱۷). از همین رو زمان

- estimation of epidemiological parameters and epidemic predictions. MedRxiv. 2020.
4. Guarner J. Three emerging coronaviruses in two decades: the story of SARS, MERS, and now COVID-19. Oxford University Press US; 2020.
 5. Pormohammad A, Ghorbani S, Khatami A, Farzi R, Baradaran B, Turner DL, et al. Comparison of Confirmed COVID-19 with SARS and MERS Cases- Clinical Characteristics, Laboratory Findings, Radiographic Signs and Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. Rev Med Virol. 2020.
 6. Organization WH. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 19 March 2020. WHO; 2020.
 7. Seif F, Aazami H, Khoshmirsafa M, Kamali M, Mohsenzadegan M, Pornour M, et al. JAK inhibition as a new treatment strategy for patients with COVID-19. Int. Arch. Allergy Immunol. 2020;181(6):467-75.
 8. Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. Sci China Life Sci. 2020;63(3):457-60.
 9. Pan F, Ye T, Sun P, Gui S, Liang B, Li L, et al. Time course of lung changes on chest CT during recovery from 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia. Radiology. 2020:200370.
 10. Organization WH. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020. WHO; 2020.
 11. 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. Eurosurveillance. 2020;25(3):2000045.
 12. Brian D, Baric R. Coronavirus genome structure and replication. Current Topics in Microbiology and Immunology. book: Springer; 2005. p. 1-30.
 13. Brian D, Chang R-Y, Hofmann M, Sethna P. Role of subgenomic minus-strand RNA in coronavirus replication. Positive-strand RNA viruses: Archives of Virology Supplem. Springer; 1994. p. 173-80.
 14. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. Science. 2003;300(5624):1394-9.
 15. Organization WH. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019–2020: applicable from 1 January 2019. WHO; 2019.
 16. 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Specimen Collection Kit Instructions: Centers for Disease Control and Prevention; 2020 [Available from: <https://health.ri.gov/publications/instructions/COVID-19-Specimen-Collection-Kit.pdf>.
 17. Specimen Collection Guidelines: Centers for Disease Control and Prevention; [cited 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/speccollectionguidelines.pdf>.
 18. Organization WH. Surface sampling of coronavirus disease (COVID-19): a practical “how to” protocol for health care and public health professionals. WHO; 2020.
 19. Fang Y, Zhang H, Xie J, Lin M, Ying L, Pang P, et al. Sensitivity of chest CT for COVID-19: comparison to RT-PCR. Radiology. 2020:200432.
 20. Ai T, Yang Z, Hou H, Zhan C, Chen C, Lv W, et al. Correlation of chest CT and RT-PCR testing in coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: a report of 1014 cases. Radiology. 2020:200642.
 21. Ali N, Rampazzo RdCP, Costa ADT, Krieger MA. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. BioMed Res Int. 2017;2017.
 22. Thatcher SA. DNA/RNA preparation for molecular detection. Clin. Chem. 2015;61(1):89-99.
 23. Andreasen D, Fog JU, Biggs W, Salomon J, Dahlsveen IK, Baker A, et al. Improved microRNA quantification in total RNA from clinical samples. Methods. 2010;50(4):S6-S9.
 24. Ong YL, Irvine A. Quantitative real-time PCR: a critique of method and practical considerations. Hematology. 2002;7(1):59-67.
 25. Tajik Z, Bokharaei-Salim F, Ghorbani S, Keyvani H, Esghaei M, Monavari SH, et al. Detection of HBV genome in the plasma and peripheral blood mononuclear cells of Iranian HBsAg negative patients with HIV infection: occult HBV infection. Arch Virol. 2018;163(6):1559-66.
 26. Barfi S, Narges C, Pouretamad HR, Poortahmasebi V, Norouzi M, Farahmand M, et al. Measurement of serum hepatitis B surface antibody levels in Iranian autistic children and evaluation of immunological memory after booster dose injection in comparison with controls. J Med Virol. 2019;91(7):1272-8.
 27. Yavarian J, Malekshahi SS, Yavarian R, Yazdani S, Janani L, Jandaghi NZS, et al. Type specific Real time PCR for detection of human herpes virus 6 in schizophrenia and bipolar patients: a case control study. BMC Psychiatry. 2015;15(1):296.
 28. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: M inimium I nformation for Publication of Q uantitative Real-Time PCR E xperiments. Oxford University Press; 2009.
 29. Monteiro AGF, Trindade GF, Yamamura AM, Moreira OC, Paula VSd, Duarte ACM, et al. New approaches for the standardization and validation of a real-time qPCR assay using TaqMan probes for quantification of yellow fever virus on clinical samples with high quality parameters. Hum Vaccin Immunother. 2015.

30. Khoshmirsafa M, Seif F, Mohsenzadegan M, Najafi M, Mokhtarian K, Shekarabi M. Circulating microRNAs, valuable biomarkers in biological fluids. Razi J Med Sci. 2017;24(160):22-36.