



طراحی و تولید کیت استخراج RNA ویروسی با تاکید بر ویروس کرونا

اکبر الصاق: استادیار شیمی فیزیک، گروه شیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (✉ نویسنده مسئول) a_elsagh@iau-tnb.ac.ir
هادی قوامی پور لاهیجی: کارشناسی مهندسی شیمی، دانشکده شیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، و مدیر عامل شرکت تهران کاوش کلون
محمد پرمهر: دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، و مدیر تحقیق و توسعه شرکت تهران کاوش کلون
محمد رضا قادری اصل شیبستری: دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی آلی، گروه شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

کیت استخراج ژنوم،
ویروس RNA دار،
کووید-۱۹،
SinaPure Viral

زمینه و هدف: جداسازی و استخراج ژنوم ویروسی از نمونه‌های حلق و بینی انسان و بیماران مبتلا به کووید-۱۹ جهت تشخیص بیماری که از مهم‌ترین بخش‌های مطالعات بالینی و تشخیصی می‌باشد.

روش کار: این مطالعه با شیوع بیماری کووید-۱۹ در شرکت تهران کاوش کلون آغاز گردید. در ابتدا استخراج RNA ویروسی از نمونه‌های خون بیماران مبتلا به بیماری HCV، HIV، آغاز گردید. پس از اطمینان یافتن از استخراج نمونه ویروسی با لود بالای RNA Viral با کمک سنجش مقایسه‌ای با کیت نمونه خارجی، از بیمارانی که علائم بیماری کووید را داشتند نمونه برداری آغاز شد.

یافته‌ها: این موضوع در خصوص ویروس‌های RNA دار به واسطه عدم پایداری RNA از حساسیت بیشتری برخوردار است. در این مطالعه کیت طراحی شده (SinaPure Viral)، شرکت تهران کاوش کلون به منظور استخراج ژنوم ویروس‌های RNA دار از لحاظ استانداردهای فارماکوپه اروپا شامل حساسیت، اختصاصیت، صحه گذاری و پایداری با کیت های مرجع شرکت کایژن (QIAGEN) و شرکت جین آل (GeneAll) بر روی نمونه‌های مثبت HCV، HIV و کووید-۱۹ مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج بررسی حساسیت، به غیر از کیت شرکت کایژن اختلاف معنی داری بین کیت‌های شرکت‌های جین آل و تهران کاوش کلون، مشاهده نشد. همچنین در بررسی اختصاصیت کیت به جز ویروس‌های RNA دار، در مورد هیچ یک از ویروس‌های DNA دار و همچنین باکتری گرم منفی و مثبت، نمونه‌های گیاهی و جانوری، پاسخ مثبت مشاهده نشد. نتایج صحه‌گذاری در کانت‌های مختلف نمونه‌های HIV و HCV اختلاف معنی داری را نشان نداد، اما کیت کایژن در کانت‌های پایین نمونه‌های کووید-۱۹ اختلاف معنی داری را با سایر کیت‌ها نشان داد. بررسی پایداری در دوره‌های ۶ و ۱۲ ماهه اختلاف معنی داری را در هیچ یک از کیت‌ها نشان نداد، اما بعد از گذشت ۱۸ ماه کیت SinaPure Viral در کانت‌های پایین ویروسی برای همه نمونه‌ها اختلاف معنی داری را با کیت‌های رفرنس نشان داد.

نتیجه‌گیری: بر این اساس می‌توان کیت SinaPure Viral را قابل مقایسه با کیت‌های رفرنس معتبر در بازار معرفی نمود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Elsagh A, Ghavamipour lahij H, Pormehr M, Ghaderi Aslshabestari M. Design and Production of Viral RNA Extraction Kit with Emphasis on Coronavirus. Razi J Med Sci. 2023;30(2):75-83.

*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.



Original Article

Design and Production of Viral RNA Extraction Kit with Emphasis on Coronavirus

- Akbar Elsagh:** Assistant Professor of Physical Chemistry, Department of Chemistry, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (* Corresponding author) a_elsagh@iau-tnb.ac.ir
- Hadi Ghavamipour lahiq:** B.Sc in Chemical Engineering, Department of Chemistry, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, & Chief executive officer of Tehran Kavosh Clon Company
- Mohammad Pormehr:** Ph.D in Plant physiology, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran, & Manager of Research and Development Department of Tehran Kavosh Clon Company
- Mohammadreza Ghaderi Aslshabestari:** Master Student of Organic Chemistry, Department of Chemistry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aims: Chirgwin et al. (1979) were the first authors who proposed the ribonucleic acid (RNA) isolation technique. Without denaturation of the structure of nucleic acid, this method breaks the cell membrane using guanidinium thiocyanate and 2-mercaptoethanol (β -met). The extraction is carried out using ethanol or ultracentrifuge, and cesium chloride gradient. This method is time-consuming, inefficient, and involves toxic and incompatible compounds for the user. Thus, the quality and efficiency of the process of extraction were developed over time and through conducting more studies. Chomczynski and Sacchi (1987) improved the method suggested by Chirgwin et al. and proposed a single-step extraction process called the AGPC method, and it used acid guanidinium, phenol, and chloroform. The advantage of this method is its higher purity and efficiency, plus this process of isolation does not include RNA fragmentation. This method has been developed and using silica columns together with magnetic beads resulted in a revolution in the process of isolating nucleic acids. Extraction of viral nucleic acid includes high-purity DNA and RNA, determining sensitivity, and genome viral load within a short process is quite crucial for the majority of downstream molecular and medical studies such as sequencing, real-time PCR, PCR for research or diagnostic purposes. Efficient protocols for the extraction of nucleic acids are the prerequisite of these methods. As already mentioned the most available protocols are time-consuming and have limitations regarding some samples or disparate types of nucleic acids. An optimal protocol must provide a high sensitivity concerning the extraction of the viral genome from a broad spectrum of samples together with a shorter scientific time and lower price. The majority of methods up to the present time have been using precipitation steps to obtain pure nucleic acids from the extracts. New protocols use the binding capacity of the nucleic acid extract to the silica column. Vogelstein and Gillespie were the first scholars to describe the absorption of nucleic acid to the surface of silica in the presence of great concentrations of chaotropic salts. They used pieces of DNA recovered from agarose gel using silica powder. This technology is developed over time and now selective binding of DNA or RNA through silica gel surfaces is modified and binding and wash buffers have been optimized to provide the maximum separation and isolation capacity in nucleic acids. After the initial lysis of the sample, the respective nucleic acid bound to the membrane is regulated. Polysaccharides and proteins in the extract fail to function properly and lose their ability to bind to the membrane due to the destruction of the molecular structure. Finally, nucleic acid bounded to the column is desalinated by alcohol and washed, and then, separated from the column by elution buffer. One of the limitations of the process of extraction is separating various types of nucleic acids from different viral resources. For instance, Coronavirus contains an RNA genome and on the other hand, the samples are collected from the patient's nose and throat, which requires an efficient and extremely sensitive procedure for extracting the genome of this virus. Given that, Tehran Cavosh Clon (former Sinaclon), a knowledge-based complex, proposed an optimal method for spearing viral RNA with high efficiency and free from toxic materials in accordance with conducted studies. The present research reported the results of the clinical studies on the basis of European Pharmacopoeia standards.

Methods: Viral RNA was extracted from HCV, HIV, and COVID-19 samples. Sensitivity, specificity, verification, and stability tests were carried out according to the European pharmacopeia standard. Furthermore, Tehran Cavosh Clon's viral extraction kit (SinaPure Viral) was compared with extraction kits of QIA Gen and GeneAll companies, as valid and the most common brands in the market. Finally, the results of PCR and Real-Time tests by these kits were compared. Serums infected with HCV, HIV, and COVID-19 swab nasopharyngeal were provided from Keyvan Laboratory. The reference viral genome

Keywords

Genome extraction kit,
RNA viruses,
COVID-19,
SinaPure Viral

Received: 04/03/2023

Published: 06/05/2023

extraction kits (QIA Gen:CAT:52904; GeneAll: CAT:128-150), and HCV, HIV, and COVID-19 diagnostic kits (GenproofHIV1/ISEX/050:HCVD/ISEX/050; CMV/ISEX/050; Sansure Biotech: S3104E) Were purchased from the respective agencies. Chemicals used in the kit structure were purchased from Sigma Company.

Kit comprises lysis buffer, precipitation buffer, wash buffer I, wash buffer II, and elution buffer, carrier RNA, and binding columns. First, 400 µl lysis buffer together with 5-6 µl of carrier RNA were added to microtubes containing the samples and they were vortexed for 20 seconds. Then, 300 µl of the precipitation buffer was added to the above solution and vortexed for 5 seconds. The final solution was transferred to the column and centrifuged at 12,100 x g, 13,000 rpm, for 1 minute. It must be noted that the transferred solution must be discarded. In the next step, 400 µl of wash buffer I was poured on the column, and centrifuged, at the aforesaid revolutions for 1 minute. The transferred solution was discarded. 400 µl of wash buffer II was transferred to the above column, and centrifuged, at the aforesaid revolutions for 1 minute. The transferred solution was discarded. Finally, without adding any solution, the collector column was centrifuged for 2 minutes. Then, it was transferred to 1.5 ml sterile microtubes and 50 µl elution buffer was added to it. It was placed at 55 degrees centigrade for 3 to 5 minutes. Upon the final centrifuge, the viral RNA was separated from the column with elution buffer. The extracted nucleic acid was collected. This product is used for diagnostic tests.

The data were statistically analyzed using SPSS, 18. The diagrams were illustrated using Excel 2010. The One-way ANOVA test was carried out. The means were compared using Duncan's test with a significance level of $P < 0.05$.

Results: Table 1 shows the results of comparing the sensitivity test of SinaPure viral extraction kit with the QIA Gen and GeneAll regarding samples with HIV, HCV, and COVID-19. According to these results, the obtained Ct for LOD of HIV samples indicated no significant difference between GeneAll and SinaPure viral kits. While there was a significant difference between the QIA Gen and the aforesaid kits. The results of the sensitivity test of samples with HCV and COVID-19 manifested a similar pattern. The only significant difference between the QIA Gen and SinaPure viral with respect to the amount of LOD. Table 1 shows the results of the specificity of the SinaPure viral kit on different viral, bacterial, plant, and animal samples. Per the results, except for viruses with RNA such as HCV, HIV, and COVID-19, no positive response was observed in none of the viruses with DNA such as HSV, EPV, HPV, CMV, HBV, plus gram-negative bacteria, (Ecoli), gram-positive bacteria (Staphylococcus aureus), plant samples (wheat), and animal sample (CHO Cell). This confirms SinaPure Viral's ability in extracting the genome of viruses with RNA.

SinaPure Viral confirmation kit was compared to QIA Gen and GeneAll kits in high, medium, and low counts of HCV and HIV serums, plus Swab Nasopharyngeal for COVID-19. The results of disparate counts of HIV-positive samples using all three kits demonstrated no significant difference (Table 2). On the other hand, the same pattern was observed in HCV samples (Table 3). Table 4 shows the results for the COVID-19 samples. Even though kits manifested no significant difference in the high and medium counts, in lower counts of the virus, QIA Gen had a significant difference with SinaPure Viral and GeneAll. It can be due to the difference in the sensitivity of sampling since in the lower loads of virus there is a possibility of making mistakes by the sample collector. On the other hand, the lack of significant difference between the HIV and HCV samples in disparate counts confirms this.

Tables 5, 6, and 7 show the results of investigating the stability of the SinaPure Viral kit in the time intervals of 6, 12, and 18 months. Per these results, SinaPure Viral kit manifested no significant difference with QIA Gen and GeneAll in the time intervals of 6 and 12 months. Even after after 18 months, the SinaPure Viral kit manifested a significant difference with reference kits in low viral counts in all samples. These high count viruses did not demonstrate this reduction of efficiency. The possible cause of reduction of kit efficiency could be the location of storing carrier RNA after the first time they were used. Taking into account the considerable role of carrier RNA in the viral genome precipitation, after preparing the carriers RNA solution, its storage condition is extremely effective on the stability of RNA.

Conclusion: In accordance with the results, the pharmacopoeia standard of the kit designed by Tehran Cavosh Clon corresponded to reference kits, i.e. QIA Gen and GeneAll. Given that, this kit is comparable to reference kits and it can be considered as a valid replacement for foreign kits in the market.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Elsagh A, Ghavamipour lahij H, Pormehr M, Ghaderi Aslshabestari M. Design and Production of Viral RNA Extraction Kit with Emphasis on Coronavirus. Razi J Med Sci. 2023;30(2):75-83.

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

مقدمه

بیماری کرونا ویروس ۲۰۱۹ (COVID-19)، که ناشی از سندرم حاد تنفسی ویروس کرونا-۲ (SARS-CoV2) است، تهدیدی جدی برای سلامت انسان در سراسر جهان ظاهر شده است (۱ و ۲). همه‌گیری جهانی این بیماری کاستی‌های الگوی آزمایش فعلی برای تشخیص بیماری‌های ویروسی را برجسته می‌کند (۳). افراد مسن و کسانی که دارای مشکلات پزشکی هستند مستعد ابتلا به عفونت شدید یا کشنده کووید-۱۹ هستند (۴ و ۵). لذا، در دسترس بودن کیت‌های استخراج RNA به دلیل کمبود تقاضای جهانی کیت‌های تجاری استخراج RNA به یک محدودیت جدی برای تشخیص کووید-۱۹ تبدیل شد (۶). این امر به ویژه در کشورهایی که فاقد زیرساخت و ظرفیت قابل قبول برای تولید کیت استخراج RNA با کیفیت خوب در سطح محلی هستند دشوار است (۷).

نخستین تکنیک جداسازی ریبونوکلیک اسید (Ribonucleic acid (RNA)) توسط چیرگوین و همکاران در سال ۱۹۷۹ ارائه شد. در این روش بدون دناتوراسیون ساختار نوکلئیک اسید و با استفاده از گوانیدین تیوسیانات و بتا مرکاپتواتانول، غشای سلولی شکسته شده و استخراج به کمک اتانول یا از طریق اولترا سانتریفیوژ و شیب کلرید سزیم صورت گرفت. این روش زمان بر، نا کارآمد و دارای ترکیبات سمی و ناسازگار برای کاربر بود. از این رو با گذشت زمان و مطالعات بیشتر، کیفیت و کارایی فرایند استخراج ارتقا بخشیده شد (۸). در سال ۱۹۸۷ چام چینسکی و ساکی با بهبود روش چیرگوین و همکاران، فرایند استخراج را یک مرحله ایی کردند در این روش که به اختصار AGPC (Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform) نامیده می‌شود از گوانیدین تیوسیانات گرم، فنول و کلروفرم استفاده شد. مزیت این روش در بازده و خلوص بیشتر آن بود که با عدم شکست RNA در فرایند جداسازی همراه بود. امروزه این روش‌ها توسعه یافته و استفاده از ستون‌های سلیکا یا بیدهای مغناطیسی، انقلابی را در عرصه جداسازی نوکلئیک اسیدها به وجود آورده اند (۹ و ۱۰).

استخراج اسید نوکلئیک ویروسی شامل DNA (Deoxyribonucleic acid) یا RNA با درصد خلوص

بالا، تعیین حساسیت و میزان کمی ژنوم ویروسی در زمان پردازش کوتاه برای بسیاری از مطالعات مولکولی و پزشکی پایین دستی از جمله واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، واکنش زنجیره ای پلیمرز در زمان واقعی (Real-Time PCR)، تعیین توالی (Sequencing) با اهداف تحقیقاتی یا تشخیصی بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۱۴-۱۱). پیش نیاز این روش‌ها، پروتکل‌های کارآمد برای استخراج اسیدهای نوکلئیک است. چنان که قبلاً نیز اشاره شد بسیاری از پروتکل‌های موجود، زمان بر و یا دارای محدودیت‌هایی برای برخی از نمونه‌ها یا انواع مختلف اسیدهای نوکلئیک می‌باشند. پروتکل بهینه باید حساسیت بالایی را برای استخراج ژنوم ویروسی از طیف وسیعی از نمونه‌ها همراه با کاهش زمان عملی، قیمت پایین ارائه دهد. بسیاری از روش‌های موجود تاکنون از مرحله رسوب برای به دست آوردن اسیدهای نوکلئیک خالص از عصاره‌ها استفاده می‌کنند. پروتکل‌های جدید از توانایی اتصال اسید نوکلئیک عصاره استخراج شده به ستون سلیکایی استفاده می‌کنند (۱۵ و ۱۶). جذب اسیدهای نوکلئیک به سطح سیلیس در حضور غلظت زیاد نمک‌های کاترئوپیک ابتدا توسط وگلشتاین و ژیل سپی تو صیف شد که قطعات DNA را از ژل آگارز با استفاده از پودر سیلیس بازیابی کردند. این فناوری اکنون بیشتر توسعه یافته و اتصال انتخابی DNA یا RNA از طریق استفاده از سطوح سیلیکاژل اصلاح شده و بافرهای اتصال و شستشو بهینه شده اند تا حداکثر توان افتراق و جداسازی بین اسیدهای نوکلئیک را فراهم کنند. پس از لیز اولیه نمونه، اتصال اسید نوکلئیک مورد نظر به غشا تنظیم می‌شود و در این راستا پلی ساکاریدها و پروتئین‌ها موجود در عصاره به دلیل برهم خوردن ساختار مولکولی، عملکرد خود را از دست داده و به غشا متصل نمی‌شوند. در انتها نیز اسید نوکلئیک متصل شده به ستون با الکل نمک زدایی و شسته می‌شود و با کمک بافرها ساز از ستون جدا می‌گردد (۱۷).

چنان که اشاره شد یکی از محدودیت‌های پروسه استخراج، جداسازی انواع نوکلئیک اسیدها از منابع مختلف ویروسی می‌باشد. به عنوان مثال ویروس کرونا دارای ژنومی از نوع RNA است و از سوی دیگر نمونه‌ها تهیه شده از حلق و بینی بیمار می‌باشد که الزاماً روشی

میکرولیتر بافر تخریب کننده به همراه ۵-۶ میکرولیتر RNA حامل به میکروتیوب حاوی نمونه اضافه گردید و سپس به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی با دستگاه ورتکس مخلوط گردید. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از بافر رسوب دهنده را به محلول فوق افزوده شد و ۵ ثانیه با دستگاه ورتکس مجدداً مخلوط گردید. سوسپانسیون به دست آمده به روی ستون لود گردید و به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (۱۲۰۰۰ جی) سانتریفیوژ گردید. در طی فرآیند فوق اسیدهای نوکلئیک RNA بروی ستون اتصال پیدا می کنند و آنچه که از ستون در حین لود نمونه وارد ستون شده و از آن خارج شده است، دور ریخته شود. در مرحله بعد ۴۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی شماره-۱ بر روی ستون اضافه گردید و به مدت ۱ دقیقه و با همان دور ذکر شده سانتریفیوژ گردید. مجدد محلول خروجی از ستون دور ریخته شود. مجدداً ۴۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی شماره-۲ به ستون فوق اضافه گردید و به مدت ۱ دقیقه با همان دور سانتریفیوژ شد و محلول خروجی از ستون دور ریخته شد. در نهایت، ستون حاوی اسید نوکلئیک به مدت ۲ دقیقه بدون افزودن هیچ محلولی، با شرایط یکسان سانتریفیوژ گردید تا هر آنچه که در ستون باقی مانده است از ستون خارج شود و سپس داخل میکروتیوب ۱،۵ میلی لیتری استریل انتقال یافته و ۵۰ میکرولیتر از بافر رها ساز کننده به آن اضافه گردید. تیوب حاوی اسید نوکلئیک به مدت ۵-۳ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد در داخل دستگاه هات پلیت قرار گرفت و با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ، RNA ویروسی به همراه بافر رها ساز کننده از ستون جدا شده و اسید نوکلئیک استخراج شده جمع آوری گردید. از این محصول میانی برای آزمایش های تشخیصی استفاده شد.

آزمون های بالینی: برای ارزیابی حساسیت و تعیین میزان LOD (Of Detection Limit) کیت SinaPure Viral، از سری رقت سرم های آلوده به HIV و HCV و نیز نمونه های سوآپ ویروس کرونا با کانت مشخص استفاده شد (۱۸).

به منظور ارزیابی اختصاصیت کیت، علاوه بر منابع ویروسی RNA دار فرایند استخراج و خالص سازی بر

کارآمد و بسیار حساس را برای استخراج ژنوم این ویروس طلب می کنند. از این رو مجموعه دانش بنیان تهران کاوش کلون (سیناکلون سابق) بر پایه مطالعات انجام شده روش بهینه ای را برای جداسازی RNA ویروسی با بازده بالا و عاری از مواد سمی ارائه نموده است که نتایج مطالعات بالینی آن بر اساس استانداردهای فارماکوپه اروپا (European pharmacopoeia) در این مطالعه گزارش شده است.

روش کار

RNA ویروسی از نمونه های بیماران مثبت کوید-۱۹ (COVID-19)، بیماران مثبت HIV (Human Immunodeficiency Virus) و HCV (Hepatitis C Virus) استخراج شد و آزمون های حساسیت، اختصاصیت، صحه گذاری و پایداری بر اساس استاندارد های فارماکوپه اروپا صورت گرفت. همچنین مقایسه کیت استخراج ویروسی (SinaPure Viral) با کیت های استخراج ویروسی شرکت های QIAGEN و GeneAll به عنوان برندهای معتبر و پرمصرف موجود در بازار انجام شد و در انتها نتایج Real-time PCR این آزمون ها با هم مقایسه گردید. سرم های آلوده ویروسی شامل HIV، HCV و نمونه های سوآپ حلق و بینی کووید-۱۹ از آزمایشگاه معتبر دکتر کیوان تهیه شد. کیت های رفرنس استخراج ژنوم ویروسی (QIAGEN:CAT:52904; GeneAll: CAT:128-150) و کیت های تشخیصی HIV، HCV و کووید-۱۹ (Genproof HIV1/ISEX/050; HCVD/ISEX/050; CMV/ISEX/050; Sansure Biotech: S3104E) نیز از نمایندگی های مربوطه خریداری شد. مواد شیمیایی استفاده شده در ساختار کیت از کمپانی سیگما تهیه گردید.

محتویات کیت SinaPure Viral: اجزای کیت شامل بافر تخریب کننده، بافر رسوب دهنده، بافر شستشوی ۱، بافر شستشوی ۲، بافر رها ساز، RNA حامل و ستون های اتصال می باشد.

روش استخراج RNA برای دستیابی به خلوص بالا با استفاده از ستون گروماتوگرافی: ابتدا ۴۰۰

استخراج QIA Gen و GeneAll برای نمونه‌های HIV، HCV و کووید-۱۹ در جدول ۱ ارائه شده است. بر اساس این نتایج میزان Ct به دست آمده برای LOD نمونه‌های HIV، اختلاف معنی داری را بین کیت‌های شرکت‌های GeneAll و تهران کاوش کلون نشان نمی‌دهد. این در حالی است که کیت شرکت QIAGEN اختلاف معنی داری را با کیت‌های مذکور نشان داد. نتایج بررسی حساسیت به دست آمده از نمونه‌های HCV و کووید-۱۹ نیز الگوی مشابه با هم را نشان داده و تنها اختلاف معنی دار در میزان LOD بین کیت‌های QIA Gen و SinaPure Viral مشاهده شد.

بررسی اختصاصیت: نتایج بررسی اختصاصیت کیت SinaPure Viral بر روی نمونه‌های مختلف ویروسی، باکتریایی، گیاهی و جانوری در شکل ۱ ارائه شده است. همان طور که نتایج نشان می‌دهد به جز ویروس‌های RNA شامل HCV، HIV و COVID 19، در مورد هیچ یک از ویروس‌های DNA مانند HBV، CMV، HPV، EPV، HSV و همچنین باکتری گرم منفی (*Escherichia coli*)، باکتری گرم مثبت (*Staphylococcus aureus*)، نمونه‌های گیاهی (گندم) و جانوری (CHO)، پاسخ مثبت مشاهده نشد که این موضوع تاییدی بر اختصاصیت کیت SinaPure Viral در استخراج ژنوم ویروس‌های RNA دار است.

بررسی صحت گذاری: صحت گذاری کیت SinaPure Viral در مقایسه با کیت‌های QIAGEN و GeneAll در کانت‌های بالا، میانه و پایین سرم‌های HIV، HCV و همچنین نمونه‌های سوآپ حلق و بینی کووید-۱۹ انجام شد. در نتایج به دست آمده از کانت‌های مختلف نمونه‌های مثبت HIV اختلاف معنی داری بین هر سه کیت مورد آزمایش در کانت‌های مختلف مشاهده نشد (جدول ۲). از سوی دیگر همین الگو نیز در مورد

روی ژنوم سرم آلوده به ویروس‌های DNA دار مانند HBV (Hepatitis B virus)، CMV، HPV (Cytomegalovirus)، EPV (Epstein-Barr virus)، HSV (Herpes simplex virus)، باکتری‌های گرم مثبت (*Staphylococcus aureus*)، باکتری‌های گرم منفی (*Escherichia coli*)، نمونه‌های گیاهی (گندم) و حیوانی (Chinese hamster ovary Cell: CHO Cell) نیز انجام شد (۱۹).

به منظور انجام آزمون صحت گذاری، کیت استخراج شرکت تهران کاوش کلون با کیت‌های QIAGEN و GeneAll مورد مقایسه قرار گرفت. سپس آزمون تشخیصی نمونه‌های استخراج شده با کمک کیت‌های Geneproof HCV PCR، Geneproof HIV PCR Kit و Sansure PCR Kit مطابق با دستورالعمل ذکر شده در این کیت‌ها انجام شد (۲۰).

در نهایت بررسی پایداری با تعدادی کیت از یک سری ساخت معین، به صورت رندوم و در شرایط دمایی ۲-۸ درجه سانتی‌گراد، طی n ماه به نوبت و در فواصل زمان مختلف مورد آزمون قرار گرفتند و جهت اطمینان از صحت نتایج، از کنترل‌های بالا و پایین سرم، همراه با کیت مرجع استفاده شد (۲۱).

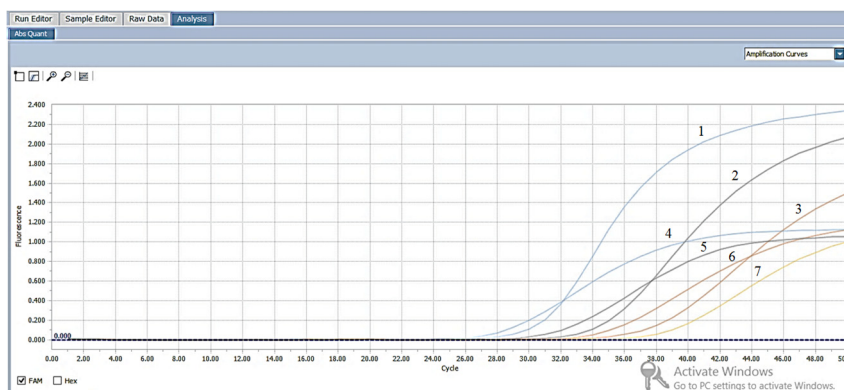
تجزیه آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم افزار SPSS 18 و رسم نمودارها با Excel 2010 انجام شد. داده‌ها تحت تجزیه واریانس یک طرفه قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال $P < 0/05$ انجام شد.

یافته‌ها

بررسی حساسیت: نتایج بررسی حساسیت کیت استخراج SinaPure Viral در مقایسه با کیت‌های

جدول ۱- مقایسه میانگین LOD در نمونه‌های آلوده HCV، HIV و COVID-19

COVID-19 (LOD)	HCV (LOD)	HIV (LOD)	نام کیت
$36/03^a \pm 0/23$	$32/17^a \pm 0/11$	$32/27^a \pm 0/07$	QIA Gen
$36/64^{ab} \pm 0/21$	$33/26^{ab} \pm 0/12$	$39/9^b \pm 0/16$	GeneAll
$37/21^b \pm 0/17$	$34/13^b \pm 0/14$	$39/66^b \pm 0/33$	SinaPure Viral



- 1 PC of Covid
- 2 Positive Covid
- 3 Positive Covid
- 4 PC of HIV
- 5 Positive HIV
- 6 Positive HIV
- 7 Positive HIV

Color	Position	Sample Name	Gene Name	Cq
B2	QS4 of HIV	None	None	27.44
B2	QS4 of HIV	None	None	-
B3	QS3 of HIV	None	None	30.93
B3	QS3 of HIV	None	None	-
B4	QS2 of HIV	None	None	33.98
B4	QS2 of HIV	None	None	-
B5	QS1 of HIV	None	None	37.77
B5	QS1 of HIV	None	None	-
B8	NTC	None	None	-
B8	NTC	None	None	-
C7	HSV1	None	None	-
C7	HSV1	None	None	-
C8	HSV2	None	None	-
C8	HSV2	None	None	-
C9	HSV3	None	None	-
C9	HSV3	None	None	-
C10	NTC	None	None	-
C10	NTC	None	None	-
D7	EPV1	None	None	-
D7	EPV1	None	None	-
D8	EPV2	None	None	-
D8	EPV2	None	None	-
D9	EPV3	None	None	-
D9	EPV3	None	None	-
D10	NTC	None	None	-
D10	NTC	None	None	-
E2	Sample 1	None	None	28.88
E2	Sample 1	None	None	-
E3	Sample 2	None	None	32.75
E3	Sample 2	None	None	-
E4	Sample 3	None	None	35.90
E4	Sample 3	None	None	-
E7	Positive Gram B...	None	None	-
E7	Positive Gram B...	None	None	-
E8	Positive Gram B...	None	None	-
E8	Positive Gram B...	None	None	-
E9	Positive Gram B...	None	None	-
E9	Positive Gram B...	None	None	-
E10	NTC	None	None	-
E10	NTC	None	None	-
F2	HBV1	None	None	-
F2	HBV1	None	None	-
F3	HBV2	None	None	-
F3	HBV2	None	None	-
F4	HBV3	None	None	-
F4	HBV3	None	None	-
F5	NTC	None	None	-
F5	NTC	None	None	-
F7	Negative Gram ...	None	None	-
F7	Negative Gram ...	None	None	-
F8	Negative Gram ...	None	None	-
F8	Negative Gram ...	None	None	-
F9	Negative Gram ...	None	None	-
F9	Negative Gram ...	None	None	-
F10	NTC	None	None	-
F10	NTC	None	None	-
G2	CMV1	None	None	-
G2	CMV1	None	None	-
G3	CMV2	None	None	-
G3	CMV2	None	None	-
G4	CMV3	None	None	-
G4	CMV3	None	None	-
G5	NTC	None	None	-
G5	NTC	None	None	-
G7	Plant sample 1	None	None	-
G7	Plant sample 1	None	None	-
G8	Plant sample 2	None	None	-
G8	Plant sample 2	None	None	-
G9	Plant sample 3	None	None	-
G9	Plant sample 3	None	None	-
G10	NTC	None	None	-
G10	NTC	None	None	-
H2	HPV1	None	None	-
H2	HPV1	None	None	-
H3	HPV2	None	None	-
H3	HPV2	None	None	-
H4	HPV3	None	None	-
H4	HPV3	None	None	-
H5	NTC	None	None	-
H5	NTC	None	None	-
H7	CHO 1	None	None	-
H7	CHO 1	None	None	-
H8	CHO 2	None	None	-
H8	CHO 2	None	None	-
H9	CHO 3	None	None	-
H9	CHO 3	None	None	-
H10	NTC	None	None	-

شکل ۱- نتایج بررسی اختصاصیت کیت SinaPure Viral بر روی نمونه‌های مختلف ویروسی، باکتریایی، گیاهی و جانوری

ماهه در جداول ۵، ۶ و ۷ نمایش داده شدند و بر اساس این نتایج در دوره‌های ۶ و ۱۲ ماهه اختلاف معنی‌داری بین کیت SinaPure Viral با کیت‌های QIAGEN و GeneAll مشاهده نشد، اما بعد از گذشت ۱۸ ماه، کیت SinaPure Viral در کانت‌های پایین ویروسی برای همه نمونه‌های مثبت اختلاف معنی‌داری را با کیت‌های رفرنس نشان داد؛ در حالی که این کاهش بازده در کانت بالای ویروس در هیچ کدام از نمونه‌ها مشاهده نشد. موضوعی که در اینجا برای کاهش بازده کیت محتمل است شرایط نگهداری RNA ناقل پس از اولین استفاده می‌باشد. با توجه به نقش به‌سزایی که RNA ناقل در رسوب ژنوم ویروسی دارد پس از تهیه محلول RNA ناقل شرایط نگهداری آن در پایداری RNA بسیار موثر می‌باشد.

نمونه‌های HCV دیده شد (جدول ۳). اما در نتایج به دست آمده برای نمونه‌های کووید-۱۹ که در جدول ۴ ارائه گردیده است با وجود آنکه در کانت‌های بالا و میانه اختلاف معنی‌داری بین کیت‌های مذکور وجود نداشت، اما در کانت‌های پایین از ویروس، کیت QIAGEN اختلاف معنی‌داری را با کیت‌های SinaPure Viral و GeneAll نشان داد که این موضوع می‌تواند به تفاوت در حساسیت نحوه نمونه‌گیری مربوط باشد؛ چرا که در لودهای پایین ویروس احتمال خطا به واسطه فرد نمونه‌گیر وجود دارد. از سوی دیگر، عدم اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌های HIV و HCV در کانت‌های مختلف می‌تواند تاییدی بر این موضوع باشد.

بررسی پایداری: نتایج بررسی پایداری کیت استخراج SinaPure Viral در دوره‌های ۶، ۱۲ و ۱۸

جدول ۲- مقایسه میانگین Ct های بدست آمده از کانت های مختلف نمونه های آلوده HIV

HIV High	HIV Mid	HIV Low	نام کیت
۱۹/۹۶ ^a ± ۰/۱۷	۲۵/۹۴ ^a ± ۰/۲۴	۳۲/۵۲ ^a ± ۰/۳۳	QIA Gen
۲۰/۰۸ ^a ± ۰/۱۱	۲۶/۰۱ ^a ± ۰/۲۸	۳۲/۲۹ ^a ± ۰/۱۹	GeneAll
۲۰/۱۳ ^a ± ۰/۲۱	۲۶/۱۵ ^a ± ۰/۱۷	۳۲/۴۷ ^a ± ۰/۲۱	SinaPure Viral

میانگین ± خطای استاندارد. میانگین های دارای حروف غیر مشابه در هر ستون اختلاف معنی داری را در سطح ۵٪ نشان می دهند.

جدول ۳- مقایسه میانگین Ct های به دست آمده از کانت های مختلف نمونه های آلوده HCV

HCV High	HCV Mid	HCV Low	نام کیت
۲۰/۰۱ ^a ± ۰/۲۷	۲۳/۱۷ ^a ± ۰/۱۶	۲۹/۱۱ ^a ± ۰/۲۷	QIA Gen
۲۰/۲۵ ^a ± ۰/۱۹	۲۳/۴۹ ^a ± ۰/۲۱	۲۹/۲۶ ^a ± ۰/۱۹	GeneAll
۲۰/۴۵ ^a ± ۰/۲۵	۲۳/۶۱ ^a ± ۰/۲۴	۲۹/۱۵ ^a ± ۰/۲۵	SinaPure Viral

میانگین ± خطای استاندارد. میانگین های دارای حروف غیر مشابه در هر ستون اختلاف معنی داری را در سطح ۵٪ نشان می دهند.

جدول ۴- مقایسه میانگین Ct های بدست آمده از کانت های مختلف نمونه های آلوده کووید-۱۹

COVID-19 High	COVID-19 Mid	COVID-19 Low	نام کیت
۱۹/۳۵ ^a ± ۰/۱۸	۲۳/۲۵ ^a ± ۰/۱۱	۳۲/۲۸ ^a ± ۰/۰۹	QIA Gen
۱۹/۶۲ ^a ± ۰/۲۱	۲۳/۴۲ ^a ± ۰/۳۳	۳۴/۱۲ ^b ± ۰/۱۲	GeneAll
۱۹/۸۰ ^a ± ۰/۱۵	۲۲/۹۵ ^a ± ۰/۲۷	۳۴/۴۸ ^b ± ۰/۱۷	SinaPure Viral

میانگین ± خطای استاندارد. میانگین های دارای حروف غیر مشابه در هر ستون اختلاف معنی داری را در سطح ۵٪ نشان می دهند.

جدول ۵- نتایج پایداری کیت SinaPure Viral پس از ۶ ماه در مقایسه با کیت های QIA Gen و GeneAll

COVID-19 High	COVID-19 Low	HCV High	HCV Low	HIV High	HIV Low	نام کیت
۱۶/۱۵ ^a ± ۰/۰۹	۳۱/۴۵ ^a ± ۰/۲۷	۱۹/۲۱ ^a ± ۰/۱۸	۲۵/۴۱ ^a ± ۰/۲۳	۲۰/۲۵ ^a ± ۰/۲۹	۳۲/۸۸ ^a ± ۰/۳۳	QIA Gen
۱۶/۸۵ ^a ± ۰/۱۲	۳۱/۳۵ ^a ± ۰/۲۵	۱۹/۱۳ ^a ± ۰/۲۱	۲۵/۱۰ ^a ± ۰/۱۶	۲۰/۱۳ ^a ± ۰/۲۱	۳۲/۲۲ ^a ± ۰/۲۲	GeneAll
۱۶/۰۵ ^a ± ۰/۰۷	۳۱/۸۵ ^a ± ۰/۲۴	۱۹/۲۶ ^a ± ۰/۱۵	۲۵/۶۱ ^a ± ۰/۲۴	۲۰/۱۰ ^a ± ۰/۲۷	۳۲/۱۵ ^a ± ۰/۲۶	SinaPure Viral

میانگین ± خطای استاندارد. میانگین های دارای حروف غیر مشابه در هر ستون اختلاف معنی داری را در سطح ۵٪ نشان می دهند.

جدول ۶- نتایج پایداری کیت SinaPure Viral پس از ۱۲ ماه در مقایسه با کیت های QIA Gen و GeneAll

COVID-19 High	COVID-19 Low	HCV High	HCV Low	HIV High	HIV Low	نام کیت
۱۸/۵۲ ^a ± ۰/۰۹	۳۳/۰۵ ^a ± ۰/۳۱	۱۹/۸۵ ^a ± ۰/۱۰	۲۶/۵۵ ^a ± ۰/۲۱	۲۰/۹۵ ^a ± ۰/۱۴	۳۱/۱۵ ^a ± ۰/۲۳	QIA Gen
۱۸/۱۵ ^a ± ۰/۱۲	۳۴/۱۷ ^{ab} ± ۰/۲۸	۱۹/۷۳ ^a ± ۰/۱۱	۲۶/۱۸ ^a ± ۰/۱۸	۲۱/۰۳ ^a ± ۰/۱۹	۳۱/۱۳ ^a ± ۰/۲۵	GeneAll
۱۸/۸۱ ^a ± ۰/۰۷	۳۴/۷۵ ^{ab} ± ۰/۲۶	۲۰/۰۱ ^a ± ۰/۱۶	۲۶/۶۸ ^a ± ۰/۲۲	۲۱/۱۸ ^a ± ۰/۱۶	۳۲/۱۵ ^{ab} ± ۰/۲	SinaPure Viral

میانگین ± خطای استاندارد. میانگین های دارای حروف غیر مشابه در هر ستون اختلاف معنی داری را در سطح ۵٪ نشان می دهند.

جدول ۷- نتایج پایداری کیت SinaPure Viral پس از ۱۸ ماه در مقایسه با کیت های QIA Gen و GeneAll

COVID-19 High	COVID-19 Low	HCV High	HCV Low	HIV High	HIV Low	نام کیت
۱۹/۹۱ ^a ± ۰/۱۱	۳۵/۰۵ ^a ± ۰/۲۴	۲۰/۱۴ ^a ± ۰/۰۹	۲۹/۱۴ ^a ± ۰/۱۱	۱۹/۹۷ ^a ± ۰/۲۴	۳۴/۹۵ ^a ± ۰/۲۱	QIA Gen
۲۰/۲۳ ^a ± ۰/۱۵	۳۶/۲۴ ^{ab} ± ۰/۲۱	۱۹/۶۸ ^a ± ۰/۰۸	۲۸/۸۸ ^a ± ۰/۱۵	۲۰/۲۲ ^a ± ۰/۱۷	۳۵/۰۶ ^a ± ۰/۲۳	GeneAll
۲۰/۶۵ ^a ± ۰/۱۰	۳۷/۸۱ ^b ± ۰/۲۰	۲۰/۰۱ ^a ± ۰/۱	۳۲/۳۳ ^b ± ۰/۲۱	۲۰/۷۸ ^a ± ۰/۱۳	۳۷/۴۵ ^b ± ۰/۲۶	SinaPure Viral

میانگین ± خطای استاندارد. میانگین های دارای حروف غیر مشابه در هر ستون اختلاف معنی داری را در سطح ۵٪ نشان می دهند.

استانداردهای فارماکوپه بین کیت طراحی شده شرکت

بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه و انطباق تهران کاوش کلون با کیت های مرجع QIA Gen و

12. Berger A, Braner J, Doerr HW, Weber B. Quantification of viral load: clinical relevance for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Intervirology*. 1998;41:24-34.

13. Huang J-T, Liu Y-J, Wang J, Xu Z-G, Yang Y, Shen F, Liu X-H, Zhou X, Liu S-M. Next generation digital PCR measurement of hepatitis B virus copy number in formalin-fixed paraffin-embedded hepatocellular carcinoma tissue. *Clin Chem*. 2015;61(1):290-296.

14. Scheibner H, Frey HR, Eicken K, Meyer H, Greiser-Wilke I. Detection of the genome of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) using the polymerase chain reaction after reverse transcription (RT-PCR): comparison of methods for the isolation of ribonucleic acid (RNA) from clinical samples. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 2000;107(11):431-7.

15. Karp A, Isaac PG, Ingram DS. Isolation of Nucleic Acids Using Silica-Gel Based Membranes: Methods Based on the Use of QIAamp Spin Columns. *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Springer, Dordrecht. 1998.

16. Gonzalez-Perez I, Armas Cayarga A, García de la Rosa I, Josefina González González I. Homemade viral RNA isolation protocol using silica columns: a comparison of four protocols. *Anal Biochem*. 2007;360(1):148-150.

17. Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1979;76(2):615-619.

18. NCCLS. Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. NCCLS document EP17-A. Vol. 24 No. 34.

19. NCCLS. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline. NCCLS document EP12-A2. Second Edition. Vol. 28 No. 3

20. NCCLS. Estimation of Total Analytical Error for Clinical Laboratory Methods; Approved Guideline. NCCLS document EP21-A [ISBN 1-56238-502-X]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

21. Guideline, ICH Harmonised Tripartite. "Stability testing of new drug substances and products." Q1A (R2), current step 4 (2003) 1-24.

GeneAll، می‌توان این کیت را قابل رقابت با کیت‌های مرجع عنوان کرد و آن را جایگزینی مطمئن برای کیت‌های خارجی موجود در بازار دانست.

References

1. Dao Thi VL, Herbst K, Boerner K, Meurer M, Kremer LP, Kirrmaier D, et al. A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci Transl Med*. 2020;12(556).

2. Wong LYR, Zheng J, Wilhelmsen k, Li K, Ortiz ME, Schnicker NJ, et al. Eicosanoid signalling blockade protects middle-aged mice from severe COVID-19. *Nature*. 2022;605:146–151.

3. Alafeef M, Moitra P, Dighe K, Pan D. RNA-extraction-free nano-amplified colorimetric test for point-of-care clinical diagnosis of COVID-19. *Nat Protoc*. 2021;16:3141–3162.

4. Phua J, Weng L, Ling L, Egi M, Lim CM, Divatia JV, et al. Intensive care management of coronavirus disease 2019 (COVID-19): challenges and recommendations. *Lancet Respir Med*. 2020;8(5):506–517.

5. Channappanavar R, Perlman S. Age-related susceptibility to coronavirus infections: role of impaired and dysregulated host immunity. *J Clin Invest*. 2020;130(12):6204–6213.

6. Wozniak A, Cerda A, Ibarra-Henriquez C, Sebastian V, Armijo G, Lamig L, et al. A simple RNA preparation method for SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR. *Sci Rep*. 2020;10:16608.

7. Biswal JK, Ranjan R, Dahiya SS. Mallick S, Mohapatra JK. Regenerated silica-based RNA purification columns to address the short supply of RNA purification kits for COVID-19 diagnosis. *Mol Biol Rep*. 2021;48:6871–6877.

8. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 1979;18(24):5294–5299.

9. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156–159.

10. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation for RNA, DNA, and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*. 1993;15:532–535.

11. Suliman BA. Comparison of five viral nucleic acid extraction kits for the efficient extraction of viral DNA and RNA from cell-free samples. *Trends Med*. 2019;19:1-10.