دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کیفی

Sexual Transmitted Disease (STD)

با روش

Real-Time PCR

Doc. #: IFU-STD-01 Doc. Version: 00 Revision Date: 03-11-2024

فهرست مطالب

شماره رفرانس 3
شرح کیت 3
اصول 3
دامنه کاربرد 3
محتویات کیت 6
نگهداری و انتقال کیت 6
نکات احتیاط عمومی 7
هشدارها و محدودیت‌ها 8
نمونه گیری و نگهداری 8
عوامل تداخلی 9
آماده سازی 10
اضافه کردن الگو 10
برنامه ریزی دمایی 11
تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها 11
دستگاه Rotor-Gene 11
دستگاه **MIC** 13
..... 13
آنالیز نتایج 14
نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف 15
دستگاه Rotor-Gene 15
دستگاه **MIC PCR** 16
ارزیابی آنالیتیکال 17
حساسیت آنالیتیکال 17
اختصاصیت آنالیتیکال 17
ارزیابی کلینیکال 18
حساسیت و اختصاصیت کلینیکال 18
پشتیبانی فنی 19
اطلاعات تماس 19

شماره رفرانس

- BONSTD-24

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به صورتReal-Time ساخته شده‌است. پنل تشخیص STD سین‌مورو شامل 4 لوله با قابلیت شناسایی 13 پاتوژن است؛ لوله‌ی ۱ قابلیت افتراق بین پاتوژن‌های *Neisseria gonorrhoeae*،*Chlamydia trachomatis* و *Mycoplasma genitalium* را داشته و همچنین کنترل داخلی در این لوله می‌باشد. لوله‌ی ۲ به منظور تشخیص پاتوژن‌های *Trichomonas vaginalis*،*Mycoplasma hominis*، *Ureaplasma urealyticum* و *Ureaplasma parvum* طراحی شده است. لوله 3 برای تشخیص افتراقی HSV1 و HSV2 طراحی شده است؛ در این لوله نیز کنترل داخلی تعبیه شده است که امکان استفاده به صورت تک لوله را نیز میسر می سازد.

لوله‌ی 4 به منظور تشخیص پاتوژن‌های *Treponema pallidum*، *Candida Albicans* ، *Haemophilus ducreyi* و *Gardnerella vaginalis* طراحی شده است.نتایج تشخیصی به‌دست‌آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم ویروس میباشد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق رنگ‌های فلوروسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلوروسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص و کمی سازی محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به بازکردن مجدد لوله های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

دامنه کاربرد

هدف از غربالگری بیماری های مقاربتی، شناسایی و درمان افراد مبتلا به عفونت، قبل از ایجاد عوارض و قبل از انتقال بیماری به دیگران است. علاوه بر این، غربالگری برای شناسایی، آزمایش و درمان شرکای جنسی افرادی که مبتلا به بیماری های مقاربتی هستند، می‌تواند از گسترش مداوم عفونت جلوگیری کند.

در حالی که همه افراد فعال جنسی در معرض خطر ابتلا به STD هستند، لازم نیست همه افراد برای STD غربالگری شوند. غربالگری STD بر روی افرادی تمرکز دارد که به دلیل عواملی مانند سن، جنسیت، سابقه سلامتی و تعداد شرکای جنسی در معرض خطر بالایی برای ابتلا هستند.

اطلاعات پاتوژن

بیماری‌های مقاربتی (STDs)، عفونت‌هایی هستند که بر سلامت جنسی و تولید مثل افراد تاثیر گذاشته و به عنوان یکی از مهم‌ترین معضل‌های بهداشت عمومی به شمار می‌آیند. عوامل ایجادکننده‌ی عفونت‌های مقاربتی شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها هستند. برخی از این میکروارگانیسم‌ها پس از مدتی از بدن حذف میشوند، در حالی که بعضی دیگر عود می‌کنند و برخی از آن‌ها بدون علامت در بدن باقی می‌مانند و باعث پیشرفت بیماری و ایجاد پیامدهایی مانند التهاب دستگاه تناسلی-ادراری، ناباروری، عفونت نوزاد و حتی سرطان می‌شوند.

C. trachomatisیک باکتری درون سلولی کوچک است که برای تکثیر به سلول‌های زنده نیاز دارد. در زنان، عفونت دستگاه فوقانی توسط این باکتری می تواند منجر به بیماری التهابی لگن (PID) و طیفی از اختلالات بالینی شامل عفونت و التهاب رحم، لوله‌های فالوپ و تخمدان ها شود. اگرچه این پاتوژن در مردان می‌تواند باعث اپیدیدیمیت شود، تاکنون عواقب طولانی مدتی برای آن گزارش نشده است.

N. gonorrhoeae یک پاتوژن اجباری انسانی و عامل ایجادکننده‌ی سوزاک است. سندروم‌ها شامل التهاب دهانه‌ی رحم در زنان، و عفونت مجرای ادرار، التهاب گلو و روده در مردان و زنان می‌باشد.

M. genitalium یک ارگانیسم بی‌هوازی اختیاری است و به عنوان یک عامل ایجادکننده‌ی التهاب پیشاب‌راه غیرگنوکوکی در مردان شناخته می‌شود. در زنان، این پاتوژن با التهاب مثانه، التهاب اندومتر رحم، بیماری التهابی لگن (PID)، ناباروری، استعداد ابتلا به ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) و پیامدهای نامطلوب هنگام زایمان همراه بوده، که نشان دهنده یک ارتباط آسیب‌شناختی با دستگاه تناسلی زنان است.

T. vaginalis با عفونت‌های واژن، دهانه‌ی رحم و پیشاب‌راه، و نیز با پارگی زودرس غشاهای جنینی و زایمان زودرس در زنان باردار ارتباط مستقیم دارد. همچنین عفونت تریکوموناس واژینالیس ریسک ابتلا به HIV را در زنان افزایش می‌دهد.

M. hominis مجرای ادراری تناسلی تحتانی را کلونیزه می کند و با عفونت های دستگاه ادراری تناسلی، به ویژه عفونت واژن باکتریایی و عفونت مجرای ادراری غیرگونوکوکی ارتباط دارد. همچنین در عفونت های خارج دستگاه تناسلی، مانند تب پس از زایمان یا بعد از سقط جنین، در عفونت های زخم پس از سزارین یا پس از هیسترکتومی نقش دارد.

گونه‌های***Ureaplasma*** معمولا از مخاط تناسلی افراد بدون علائم جدا میشوند. در انسان، دو گونه ی اصلی یعنی، ***U. parvum***و ***U. urealyticum***بخشی از فلور تناسلی مردان و زنان را تشکیل می دهند و تقریباً در۷۰٪ از جمعیت انسانی که از لحاظ جنسی فعال هستند، وجود دارند. این باکتری‌ها می‌توانند باعث التهاب و پارگی زودرس غشاهای جنینی و زایمان زودرس شوند.

ویروس‌های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲ (1-HSV و 2-HSV) از مهم‌ترین ویروس‌های بیماری‌زای انسانی و دو عضو بسیار مهم از خانواده‌ی Herpesviridae هستند .این ویروس‌ها بسیار شایع و مسری هستند و از طریق تماس مستقیم با ترشحات حاوی ویروس مانند بزاق و ترشحات دستگاه تناسلی منتقل می‌شوند.

Gardnerella vaginalis (GV)،یک باکتری بی هوازی غالب است که مسئول ایجاد واژینوز باکتریایی (BV) در زنان است. اگرچه G واژینالیس یک جزء طبیعی فلور طبیعی واژن است، اما تکثیر بیش از حد این باکتری می تواند منجر به BV، علت اصلی ترشحات غیر طبیعی واژن یا واژینیت شود. عفونت گاردنرلا به دلیل پیامدهای گسترده آن بر سلامت باروری زنان، حساسیت به بیماری های مقاربتی و احتمال ایجاد عوارض در دوران بارداری، چالش های متمایزی را ایجاد می کند. BV با ناباروری، زایمان زودرس، اندومتریت پس از زایمان، بیماری التهابی لگن، و افزایش خطر ابتلا به ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) و سایر عفونت های مقاربتی (STIs) مرتبط است.

Candida Albicans (CA)، قارچ بیماریزای انسانی، معمولاً در سطوح مخاطی مانند واژن یافت می شود. این قارچ ممکن است به عنوان یک عامل بی ضرر باقی بماند، اما همچنین می تواند باعث بیماری شود. حدود 75 درصد از زنان حداقل یک بار کاندیدیازیس ولوواژینال (VVC) را در طول زندگی خود تجربه می کنند. برخی از عوامل مستعد کننده برای VVC، مانند دیابت یا بارداری، شناسایی شده اند. با این حال، VVC در بین زنان سالم نیز رایج است. چسبندگی قارچ به اپیتلیوم یک پیش نیاز برای کلونیزاسیون است و عفونت ها با حمله به سلول های اپیتلیال واژن مشخص می شوند. علاوه بر این، تشکیل هیف با آسیب رساندن به بافت اپیتلیال به عفونت های علامت دار واژن کمک می کند. بنابراین، تعدادی از عوامل ممکن است مسئول VVC باشند، اما مکانیسم‌های بیماری‌زایی دقیق عفونت‌های کاندیدا واژینال هنوز به خوبی شناخته نشده است.

Treponema pallidum (Tp)، عامل اتیولوژیک سیفلیس، باعث عفونت مقاربتی چند مرحله ای (STI) می شود. این باکتری عامل ایجاد سیفلیس است و همچنین تصور می شود که احتمال انتقال HIV را افزایش می دهد. عفونت T.pallidum در صورت عدم درمان در 4 مرحله پیشرفت می کند. چندین نوع آزمایش آزمایشگاهی برای تشخیص ترپونما پالیدوم موجود است. سرولوژی، میکروسکوپ میدان تاریک و PCR استانداردهای طلایی برای تشخیص این پاتوژن هستند. با این حال، سنجش Real Time PCR به عنوان ابزار تشخیصی حساس‌تر و اختصاصی‌تر برای تشخیص آن نشان داده شده است.

Haemophilus ducreyi (HD)،یک باکتری بیماریزای گرم منفی، میله ای شکل و غیر متحرک از خانواده Pasteurellaceae است. عفونت انسان با این باکتری باعث Chancroid، یک بیماری زخم ناحیه تناسلی عمدتاً مردانه می شود که در کشورهای در حال توسعه بومی است و مشخص شده است که با افزایش خطر انتقال HIV مرتبط است. H. ducreyi یک باکتری فرصت طلب است که میزبان خود را از طریق شکستگی در پوست یا اپیدرم آلوده می کند. انتقال بیماری از طریق تماس جنسی (تماس پوست با پوست یا زخم های باز) اتفاق می افتد. پس از ورود به پوست، حضور باکتری، سلول‌های اپیدرمی و فیبروبلاست‌ها را تحریک می‌کند تا IL-6 و IL-8 ترشح کنند و در نتیجه لکوسیت‌های پلی‌مورفونوکلئر و ماکروفاژها در درم و اپیدرم تجمع پیدا کنند. پاسخ ایمنی اولیه سبب انتشار سیتوکین ها شده و منجر به التهاب و تشکیل زخم در محل عفونت می شود. مدت کوتاهی پس از عفونت، یک برآمدگی کوچک در محل عفونت ظاهر می شود که به سرعت به زخمی تا اندازه 2.5 سانتی متر تبدیل می شود. زخم به طور کلی دردناک است و در صورت ایجاد اختلال به راحتی خونریزی می کند.

محتویات کیت

Title	24 Tests Volume per Vial
STD Master-1	360 µl/tube × 1
STD Master-2	360 µl/tube × 1
STD Master-3	360 µl/tube × 1
STD Master-4	360 µl/tube × 1
Internal Control*	300 µl/tube × 1
Positive Control	100 µl/tube × 1

*تنها در صورت استفاده **STD Master-3** به تنهایی از **Internal Control** استفاده کنید.

نگهداری و انتقال کیت

1- کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری گردد، همچنین به منظور انتقال و جا به جایی کیت از یونولیت با درب و یخ خشک استفاده نمایید.
2- نگهداری کیت دردمای4 درجه سانتیگراد هیچ گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.
3- این کیت نیاز به حمل برروی بسته‌های یخزده (Frozen Ice Pack) را دارد.
4- همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان‌طور که روی برچسب بسته‌بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
5- از چرخه‌های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و درنتیجه عدم کارایی کیت می‌شود.
6- از قراردادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
7- معرف‌ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (15 تا 25 درجه سانتی‌گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله‌ها را به طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به طور یکنواخت مخلوط شده‌اند.

مواد و تجهیزات مورد نیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود؛

1. کیت استخراج DNA
2. سمپلر قابل تنظیم دراندازه های مختلف و نوک سمپلر فیلتردار

3. سانتریفوژ رومیزی
4. بلوک خنک کننده
5. وایتکس10 درصد
6. گان و دستکش
7. دستگاه Rotor-Gene , MIC, Azur با 4 کانال فلوروسنت رنگ Green و Yellow و Orange و Red و یا انتخاب فلورفورهای FAM و HEX و Texas Red(Rox)و CY5
8. نرم افزار Rotor-Gene Q نسخه 1.7.94 ، نرم افزار Rotor-Gene 6000 نسخه 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 و نرم افزار Rotor-Gene 3000 نسخه 6.0.23 و یا بالاتر.
9. استریپ و کپ 0.1 ml برای استفاده در روتور 72 چاهکی

نکات احتیاط عمومی

1- لطفاً دستورالعمل را با دقت بخوانید و قبل از استفاده محصول با تمام اجزای کیت آشنا شوید و درحین کار دستورالعمل را دقیقاً دنبال کنید.
2- لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرآیند را با آن‌ها جلو ببرید.
3- از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضا استفاده نکنید.
4- در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.
5- استفاده از سرسمپلرهای فیلتردار وRNase & DNase free
6- نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای STD نمونه های گرفته شده از مریض، کنترلها و محصولات حاصل از PCR باید درمحلی کاملا جدا از محل نگهداری و آماده سازی MasterMix صورت پذیرد.
7- همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.
8- بعد از ذوب شدن، کلیه مواد (به ویژه استانداردهای کیت) را به خوبی پیپتاژ نمایید و به طور مختصراسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به طور کامل توصیه میشود.
9- تمام مراحل مربوط به تهیه MasterMix باید بر روی یخ یا جعبه های سرد(Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به Master Mix بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.
10- هنگام کار با موادشیمیائي، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهي، دستکش یکبارمصرف، و عینکهاي محافظ داشته باشید.
11- کیت حاوی کنترل مثبت است. برای جلوگیری از آلودگی که ممکن است باعث ایجاد مثبت کاذب شود، کنترل مثبت را از سایر مواد موجود در کیت کاملا جدا کنید.
12- PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.

13- هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.
14- از تیپ های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ‌های فیلتر دار برای جلوگیری از ورود آلودگی DNA استفاده کنید.
15- لطفاً لوله‌های PCR را با نایلکس یکبارمصرف بسته‌بندی کرده و به‌درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR پس از امپلیفای را باز نکنید.
16- همه مواد یکبار مصرف، یکبار مصرف هستند، مجدداً استفاده نکنید.
17- مواد موجود درکیت که بلا استفاده هستند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به‌درستی دور انداخته شوند.
18- پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اتانول 75٪ و وایتکس 10٪ اسپری کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

1. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP[1] توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ (PPE)[2] انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط 2-BSL انجام شود.استفاده از دستورالعمل :
Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Of Specimen
2. پیشنهاد می شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس 10 درصد تمیز شود و همین طور بعد از کار لامپ UV زده شود .
3. پیشنهاد می شود محل استخراج DNA ، آماده سازی مخلوط واکنش از فضای آماده کردن اضافه کردن نمونه و نمونه استاندارد جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید .
4. پس از آماده سازی مخلوط واکنش ، آن را در تاریکی نگهداری نمایید .

کنترل‌ها

1. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک حاصل از استخراج DNA استفاده شود.
2. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب بجای نمونه استفاده شود.
3. کنترل مثبت (PTC): از کنترل مثبت کیت به‌جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

نمونه گیری و نگهداری

1. برای تشخیص عفونت STD می‌توان از نمونه‌ی ادرار یا نمونه‌ی سواب از قسمت فعال عفونت مانند واژن، دهانه‌ی رحم، مجرای ادراری و مقعد، و همچنین روش LBC استفاده کرد.

---

[1] Good Laboratoty Practice

[2] Personal Protective Equipment

2. نمونه مناسب می‌تواند حاوی میزان کافی از مخاط دهانه یا گردن رحم باشد.

نگهداری نمونه‌های گرفته شده

نمونه می‌تواند کمتر از 8 ساعت در یخچال با محدوده دما از 2 تا 8 درجه سانتی‌گراد و برای نگهداری طولانی‌مدت آن، باید در دمای 20 – درجه سانتیگراد منجمد شده و نگهداری شود.

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

کنترل داخلی (**Internal Control**)

برای بررسی راندمان استخراج و PCR از کنترل داخلی Endogene در STD Master-1 استفاده شده است. همچنین حضور کنترل داخلی Exogene در کیت به کاربر این امکان را می‌دهد که فرآیند تخلیص و احتمال وجود مواد مهارکننده PCR را در STD Master-3(HSV1,HSV2) به طور مستقل نیز مورد بررسی قرار دهد.

عوامل تداخلی

حضور EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه‌های سیلیس (1µl)، خون (1µl)، اوره (40 گرم در 100 میلی‌لیتر) و بافر لیز موجب مهار واکنش PCR می‌شود. وجود مهارکننده در واکنش با ژن کنترل داخلی قابل ردیابی است.

خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسیدنوکلئیک باید توسط کیت‌های جداسازی موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود.

مواد نمونه باید از سلول‌های نمونه‌برداری شده از دهانه و ترشح دستگاه ادراری تناسلی استخراج شده باشد. کیت استخراج DNA در این کیت گنجانده نشده است.

1) برای نمونه‌های رحم، از وسیله مخصوص برای تراشیدن سلول‌های ضایعات دهانه استفاده کنید، نمونه حاصله را داخل ویال جمع‌آوری نمونه استریل قرار دهید.

2) نمونه‌های ترشح مجاری ادراری تناسلی، شامل مجرای ادراری مردان، دستگاه تناسلی زنان و ترشح مجرای ادراری است.

الف) برای مجرای ادراری مردان، یک سواب کوچک را درکانال مجرای ادرار به ابعاد 2 تا 4 سانتی‌متر قراردهید، جهت جمع‌آوری ترشح، سواب را به‌آرامی در جهت عقربه‌های ساعت 3 تا 5 بار بچرخانید، سپس نمونه را در یک ویال استریل جمع‌آوری نمایید.

ب) برای دستگاه تناسلی زنان، از یک سواب استریل آغشته به سالین برای حذف ترشحات اضافی خارج از دهانه رحم استفاده کنید و یک برس استریل یا سواب پنبه‌ای را وارد کانال درون دهانه رحم کنید، به‌آرامی 3 تا 5 بار سواب

را در جهت عقربه‌های ساعت بچرخانید تا ترشح دهانه رحم را جمع‌آوری کنید و سپس نمونه را در یک ویال استریل قرار دهید.

ج) برای مجرای ادراری زنان، از یک سواب برای شستن مجرای ادرار استفاده کنید و یک سواب استریل را دو سانتی‌متر در کانال مجرای ادرار قرار دهید، جهت جمع‌آوری ترشح، سواب را به‌آرامی در جهت عقربه‌های ساعت 3 تا 5 بار بچرخانید، سپس نمونه را در ویال جمع‌آوری نمونه استریل قرار دهید.

3) نمونه‌ها باید با کیسه یخ زیرصفر درجه سانتیگراد منتقل شده و استخراج شوند تا بلافاصله DNA به دست آید. اگر DNA استخراج شده بلافاصله مورداستفاده قرارنگیرد، باید دردمای 20- درجه سانتیگراد ذخیره شود.

آماده سازی

1. ابتدا لوله‌ها را روی رک یخ بگذارید تا محتویات آن‌ها ذوب شوند و لوله‌های MasterMix و کنترل مثبت را به آرامی ورتکس کنید و به طور مختصر سانتریفیوژ کنید.
2. 15 میکرولیتر MasterMix را به لوله‌های PCR اضافه کنید.
3. مقدار 5 میکرولیتر از نمونه اسید نوکلئیک جدا شده یا 5 میکرولیتر کنترل مثبت را به لوله‌های PCR جداگانه اضافه کرده و با پیپتاژ مخلوط کنید. در حین تهیه PCR لازم است همه اجزا در دمای 2 تا 8 درجه سانتیگراد نگهداری شوند. از مواد بالینی منفی می‌توان به عنوان کنترل جداسازی منفی استفاده کرد.
4. لوله‌ها را ببندید، مختصراً سانتریفیوژ کنید، آنها را داخل دستگاه قرار دهید و اجازه دهید مطابق مشخصات برنامه قید شده در این دفترچه تکثیر شوند. هنگام استفاده از کنترل مثبت یا مواد بالینی بسیار مراقب باشید.
5. در این مرحله، بهتر است از فضاهای جداگانه برای اضافه‌کردن مستر واکنش و نمونه‌های بیمار استفاده کرد و همچنین در نظر داشته باشید که در ویال کنترل مثبت را تنها در محل آماده‌سازی مستر واکنش و فضای تمیز باز کنید.

نکته: از PTC برای میکس اول استفاده شود.

نکته در هر بار انجام تست یک لوله به‌عنوان No Template Control باید گذاشته شود. در NTC به‌جای نمونه استخراج شده از آب استفاده می‌شود که برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.

اضافه کردن الگو

پس از آماده سازی محلول‌ها و انتقال آن به تیوب‌های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، 5 میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید. پس از انتقال به هود آلوده، 5 میکرولیتر از کنترل مثبت و5 میکرولیتر از نمونه‌های بیمار را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید. سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید.

Reaction Setup	Volume
Master Mix	15 µl
Sample or Control	5 µl
Final Volume	20 µl

برنامه ریزی دمایی

دستورالعمل برای دستگاه‌های MIC و Rotor-Gene توصیف شده است. دیگر دستگاه‌های Real-Time PCR دارای کانالهای Red، Orange، Green و Yellow نیز مناسب برای استفاده از این کیت هستند. پس از تنظیمکردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول آورده شده است.

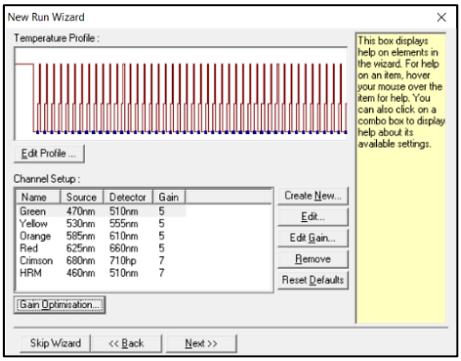
	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	4 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	45
Annealing and Acquisition on Channel Green, Orange, Red and Yellow	58°C	60 sec	

علاوه بر تعریف دمایی دستگاه که در قسمتبالا آمده است دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیمگردد. اندازه‌گیری تابش فلورسانس باید برای رنگ‌های FAM، Texas Red(ROX)، HEX و CY5 تنظیم شود.برای پشتیبانی فنی لطفا با تلفن های شرکت تماس حاصل فرمایید.

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها

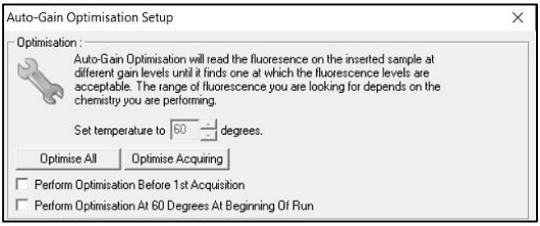
دستگاه Rotor-Gene

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه‌ی Gain Optimization را انتخاب کنید (شکل 1).



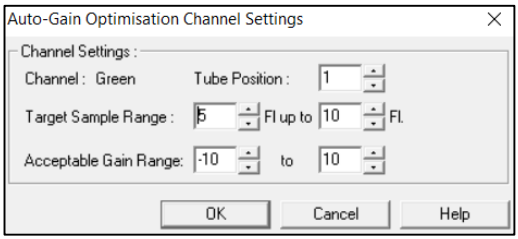
شکل 1. تنظیمات دستگاه

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimise Acquiring برای هر 4 کانال سبز، زرد، نارنجی و قرمز، بازه‌ی Target sample range از 5 تا 10 (حالت پیش‌فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل 2).



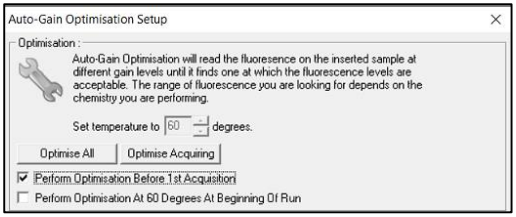
شکل2. تنظیمات دستگاه

همچنین Gain دستگاه باید برمبنای تیوب شامل STD Master-1 انجام شود، بنابراین عدد نوشته شده در کادر Tube Position باید صحیح نوشته شده باشد (شکل 3).



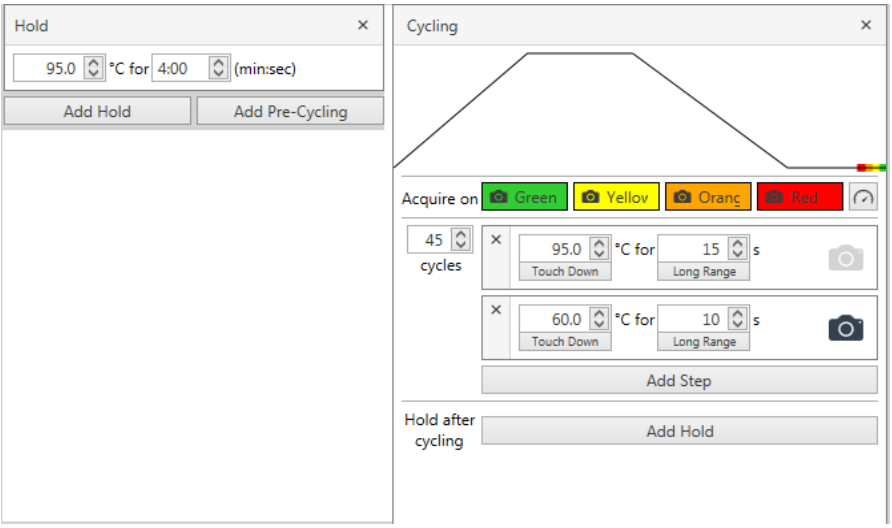
شکل3. تنظیمات دستگاه

پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی Perform Optimization Before 1st Acquisation را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل 4).



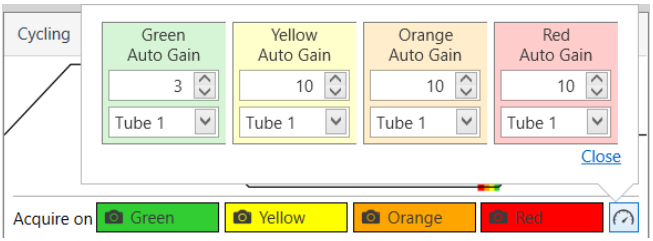
شکل4. تنظیمات دستگاه

بدین منظور در دستگاه MIC با انتخاب گزینه‌ی Run Profile پروفایل دمایی کیت را وارد کرده و در بخش cycling سنجش فلورسنت را در هر 4 کانال فعال کنید (شکل 5).



شکل5. تنظیمات دستگاه

از آنجایی که Gain دستگاه باید برمبنای تیوب شامل STD Master-1 انجام شود، با بازکردن پنجره‌ی تنظیمات Gain برای کانال‌های مختلف، در کادر مربوط به تیوب Gain، گزینه All tube را از حالت پیش‌فرض به تیوب مورد نظر تغییر دهید (شکل 6).



شکل6. تنظیمات دستگاه

1.آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در 4 کانال رنگی Green و Yellow و Orange و Red و یا انتخاب فلورفورهای FAM و HEX و ROX و CY5 پس از قرار دادن درصد حذف داده‌های پرت بر 5%، آستانه را در بازه‌ی مناسب قرار دهید.

2. برای تفسیر نتایج، مطابق جدول صفحه بعد عمل کنید. خوانش هر یک از میکس‌های 1و 2 در هر یک از کانال‌های فلورسانس مشخص می‌کند کدام تایپ STD در نمونه وجود دارد.

	Green	Yellow	Orange	Red
STD Master-1	**NG**	**β-globin**	**CT**	**MG**
STD Master-2	**TV**	**MH**	**UU**	**UP**
STD Master-3	**HSV1**	**IC**	**HSV2**	**-**
STD Master-4	**GV**	**HD**	**CA**	**TP**

بعد از آنالیز باید نتایج را به صورت زیر تفسیر کرد:

- نتیجه منفی یک نمونه مستلزم داشتن میکس 1 مثبت در کانال زرد و جواب منفی برای بقیه میکس‌ها در کانال‌های دیگر است.

زمانی که منحنی سیگموئیدی نباشد جواب نمونه منفی خواهد بود.

- نمونه زمانی مثبت می‌شود که دارای دو شرط زیر باشد.

A دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی

B مقدار **Ct** نمونه در حالت آستانه 0.02 کمتر از35 باشد.

- نمونه باید در کانال زرد میکس 1 که کنترل داخلی (ß-گلوبین) است، مثبت و کمتر از ۳۰ باشد. هرکدام از این شرایط برقرار نباشد، جواب از اعتبار کافی برخوردار نبوده و باید آزمایش دوباره تکرار شود.

- در آنالیز میکس 3 برای **HSV**، در صورت مشاهده‌ی اختلاف سیکل کمتر از 10 سیکل بین دو نوع **HSV**-1 و**HSV**-2 ، نمونه دارای هر دو واریانت **HSV**-1 و**HSV**-2 می باشد. در اختلاف بیشتر از 10 سیکل ، ویروس با سیکل آستانه ای کمتر مثبت می باشد.

جدول تفسیر نتایج

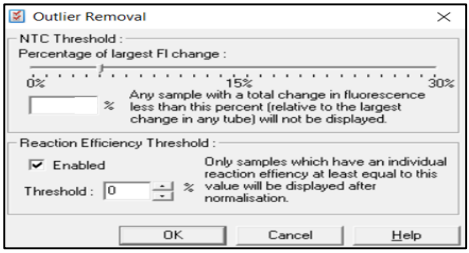
	Green	Yellow	Orange	Red	Result
Master-1	+	-	-	-	**Neisseria gonorrhoeae**
	-	+	-	-	**β-globin**
	-	-	+	-	**Chlamydia trachomatis**
	-	-	-	+	**Mycoplasma genitalium**
Master-2	+	-	-	-	**Trichomonas vaginalis**
	-	+	-	-	**Mycoplasma hominis**
	-	-	+	-	**Ureaplasma urealyticum**
	-	-	-	+	**Ureaplasma parvum**
Master-3	+	-	-	-	**HSV1**
	-	-	+	-	**HSV2**
	-	+	-	-	**IC**
Master-4	+	-	-	-	**Gardnerella vaginalis**
	-	+	-	-	**Haemophilus ducreyi**
	-	-	+	-	**Candida Albicans**
	-	-	-	+	**Treponema pallidum**

نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف

دستگاه Rotor-Gene

آنالیز اطلاعات در دستگاه Rotor-gene 6000 و Rotor-gene 3000 باید توسط نرم‌افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.

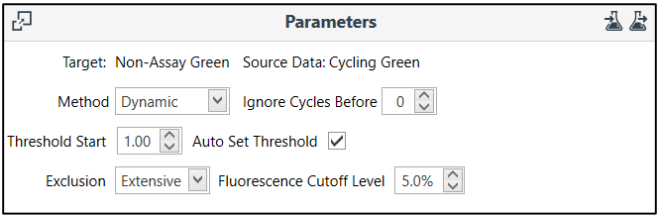
1. از منوی Quantitation، Analysis را انتخاب کرده و روی یک رنگ، به طور مثال Green، دوبار کلیک کنید.
2. با کلیک بر گزینه ی Outlier Removal، ترشلد افیشنسی واکنش را به شکل زیر فعال کنید (شکل 7).
3. آستانه (Threshold) را در کانال‌های Green, Orange، Yellow و Red بر روی بازه ی مناسب (0.02-0.1) و بالاتر از فلورسانس نمونه ی منفی قرار دهید.



شکل 7. تنظیمات دستگاه

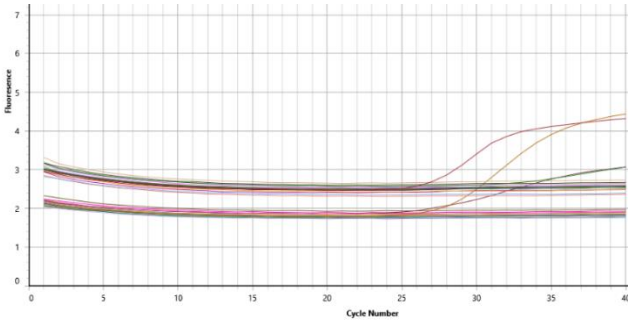
آنالیز اطلاعات در دستگاه Magnetic Induction Cycler (Mic) PCR توسط نرم‌افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.

1. از منوی Analysis انتخاب کرده و روی یک رنگ، به طور مثال Non-Assay Green، کلیک کنید.
2. در بخش Parameters به طور پیش‌فرض حالت Extensive برای Exclusion انتخاب شده است؛ و در بخش Flourescence Cutoff Level بر 5% تنظیم است. در غیر این صورت، این تنظیمات را وارد کنید
3. انتخاب Threshold را به صورت اتوماتیک با فعال کردن گزینه‌ی Auto Set Threshold انجام دهید.(شکل 8)



شکل 8. تنظیمات دستگاه

4. مراحل بالا را برای کانال‌های دیگر Orange، Yellow و Red تکرار کنید.
5. در صورت وجود نویز ابتدایی در بخش Data (شامل داده‌های خام) کانال مورد نظر به شکل زیر، در بخش Parameters با قرار دادن عدد 5 در کادر مقابل Ignore Cycles Before، 5 سیکل ابتدایی را نادیده گرفت.



شکل 9. تنظیمات دستگاه

ارزیابی آنالیتیکال

حساسیت آنالیتیکال

باتوجه به نتایج حاصله، حدپایین تشخیصی برای این کیت در تایپهای مختلف به شرح زیر است:

Target	LOD
Neisseria gonorrhoeae	50 copies per PCR
Mycoplasma genitalium	5 copies per PCR
Chlamydia trachomatis	5 copies per PCR
β-globin	50 copies per PCR
Ureaplasma urealyticum	15 copies per PCR
Mycoplasma hominis	10 copies per PCR
Ureaplasma parvum	10 copies per PCR
Trichomonas vaginalis	5 copies per PCR
HSV1	25 copies per PCR
HSV2	5 copies per PCR
Gardnerella vaginalis	5 copies per PCR
Haemophilus ducreyi	10 copies per PCR
Candida Albicans	5 copies per PCR
Treponema pallidum	25 copies per PCR

اختصاصیت آنالیتیکال

به جهت بررسی اختصاصیت پرایمرها و پروب‌های محصول برای STD احتمال شناسایی غیراختصاصی دیگر عوامل عفونی مربوطه مورد بررسی قرارگرفته است.همچنین انتخاب شرایط واکنش دقیق مورد تأیید نیز تضمین شده است. این کیت با DNA عوامل زیر واکنش متقاطع ندارد. این عوامل معمولاً از دستگاه ادراری تناسلی جدا شده و بعضی نیز سبب بیماری می‌شوند:

Bacterium	Streptococcus hemolytis-β	Enterococcus faecalis
	Clostridium sporogenes	syphilis
	Escherichia coli	Bacillus pumilus
	Serratia marcescens subsp marcescens	
	Salmonella enterica subsp enterica	Pseudomonas aeruginosa
	Staphylococcus aureus subsp.aureus	Micrococcus luteus
Virus	herpes simplex virus 6-8	Human papilloma virus
Fungus	Candida albicans	monilia albican

ارزیابی کلینیکال

حساسیت و اختصاصیت کلینیکال

برای تعیین حساسیت و اختصاصیت کلینیکال از 100 نمونه مثبت و 100 نمونه منفی استفاده شد که نتایج در جدول زیر نشان‌داده‌شده است:

Target	Sensitivity	Specificity
Neisseria gonorrhoeae	90%	100%
Mycoplasma genitalium	96%	100%
Chlamydia trachomatis	95%	100%
Ureaplasma urealyticum	93%	100%
Mycoplasma hominis	95%	100%
Ureaplasma parvum	94%	100%
Trichomonas vaginalis	95%	100%
HSV1	94%	100%
HSV2	96%	100%
Gardnerella vaginalis	95%	100%
Candida Albicans	95%	100%
Treponema pallidum	95%	100%
Haemophilus ducreyi	96%	100%

پشتیبانی فنی

برای پشتیبانی فنی لطفا با تلفن های شرکت تماس حاصل فرمایید .

نشانه‌ها

	Research Use Only	برای مصارف پژوهشی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولید شده
	Temprature Limitation	محدودیت دمایی
	Concult Instructon For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficent for <n> tets	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

اطلاعات تماس

شرکت فناوری بن یاخته- گروه سین مورو

دفتر مرکزی : تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار 24 متری سعادت آباد، خیابان حیدرنیا) دوم شرقی(، پلاک9 ، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی :1997775555 تلفن : 22082120 پشتیبان فنی:09301821601

تلفن های تماس :02122082120

Web Site: www.Senmurv.co Email: info@senmurv.ir