



دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کیفی

Sepsis

با روش

Real-Time PCR

Cat# BONSEPSIS-24



Doc. #:IFU-Sepsis-01 Doc. Version: 03 Revision Date: 1404/06/16

Version 03

۳	شماره رفرانس
۳	شرح کیت
۳	اصول
۴	دامنه کاربرد
۶	نگهداری و انتقال کیت
۷	نکات احتیاط عمومی
۹	هشدارها و محدودیت‌ها
۹	نمونه گیری و نگهداری
۱۰	عوامل تداخلی
۱۱	آماده سازی
۱۳	برنامه ریزی دمایی
۱۴	تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها
۱۴	دستگاه Rotor-Gene
۱۶	دستگاه MIC
۱۷	آنالیز نتایج
۱۸	نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف
۱۸	دستگاه Rotor-Gene
۱۸	دستگاه MIC PCR
۲۰	ارزیابی آنالیتیکال
۲۱	پشتیبانی فنی
۲۱	نشانه‌ها
۲۲	اطلاعات تماس

● BONSEPSIS-24

شرح کیت

سپسیس (Sepsis) وضعیتی است که به دلیل پاسخ نامنظم سیستم ایمنی به عفونت ایجاد می‌شود و می‌تواند به نارسایی اندام‌ها و اگر به موقع درمان نشود، حتی به مرگ منجر شود. شناسایی سریع و دقیق عوامل ایجادکننده سپسیس برای هدایت درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب و بهبود نتایج بیمار بسیار مهم است. روش‌های تشخیصی سنتی مانند کشت خون معمولاً زمان‌بر هستند و ممکن است به دلیل بار میکروبی پایین یا استفاده قبلی از آنتی‌بیوتیک‌ها در شناسایی برخی از پاتوژن‌ها ناکام بمانند.

کیت Real-Time PCR برای تشخیص سپسیس یک ابزار تشخیصی مولکولی بسیار حساس و دقیق است که برای شناسایی طیف گسترده‌ای از پاتوژن‌ها شامل باکتری‌ها و قارچ‌ها به‌طور مستقیم از نمونه‌های خون طراحی شده است. این کیت با استفاده از قدرت واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در زمان واقعی، امکان شناسایی سریع ارگانیزم‌های مسبب سپسیس را در مدت چند ساعت فراهم می‌کند و این امکان را می‌دهد تا تصمیم‌گیری‌های بالینی به موقع انجام شود.

این کیت با استفاده از پرایمرها و پروب‌های اختصاصی طراحی شده برای شناسایی رایج‌ترین و مرتبط‌ترین پاتوژن‌های درگیر در سپسیس، شامل باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و گونه‌های قارچی کار می‌کند.

کیت Real-Time PCR سپسیس از طریق یک فرآیند ساده که زمان دستیابی به نتیجه را به حداقل می‌رساند، اطلاعات حیاتی را به‌مراتب سریع‌تر از روش‌های سنتی ارائه می‌دهد. این کیت برای استفاده در آزمایشگاه‌های بالینی برای تشخیص زودهنگام سپسیس ایده‌آل است و به پزشکان امکان می‌دهد تا تصمیمات درمانی آگاهانه بگیرند و درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب را آغاز کنند، که شانس بهبودی بیمار را افزایش می‌دهد.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم پاتوژن می‌باشد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق رنگ‌های فلورسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلورسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص دقیق محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به بازکردن مجدد لوله‌های واکنش پس از انجام PCR ممکن می‌سازد.

دامنه کاربرد

با استفاده از این کیت ۱۵ پاتوژن شامل باکتری‌های گرم مثبت (شامل استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پنومونیه، انتروکوکوس فسیلیس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس)، باکتری‌های گرم منفی (شامل اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا، اسینتو باکتر بومانی، سیتروباکتر فروندی، پروتئوس میرابیلیس، همچنین مایکوپلازما پنومونیه، لژیونلا پنومونیه) و قارچ‌ها (شامل کاندیداها) (البیکن، گلابراتا، تروپیکال)) و سویه‌های آسپرژیلوس تشخیص داده می‌شود. نمونه مورد نظر برای انجام این آزمایش نمونه خون فرد مشکوک به عفونت می‌باشد.

اطلاعات پاتوژن

۱. باکتری‌های گرم مثبت

استافیلوکوکوس اورئوس: این باکتری معمولاً در پوست و غشای مخاطی یافت می‌شود و می‌تواند عفونت‌های جدی مانند پنومونی و سپسیس را ایجاد کند.

استرپتوکوکوس پنومونیه: این باکتری پاتوژنی مهم در عفونت‌های تنفسی، مننژیت و عفونت‌های گوش می‌باشد. واکسن‌های موثر برای پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری موجود است.

انتروکوکوس فسیلیس: این باکتری‌ها فلور طبیعی روده هستند و می‌توانند باعث عفونت‌های ادراری و زخم شوند و به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شوند.

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس: علیرغم اینکه جزء میکروبی طبیعی پوست است، می‌تواند در بیماران بستری عفونت‌های جدی ایجاد کند.

۲. باکتری‌های گرم منفی

اشریشیا کلی: باکتری روده‌ای که می‌تواند باعث عفونت‌های ادراری، انتریت و عفونت‌های خونی شود.

کلبسیلا پنومونیه: می‌تواند عفونت‌های ریه و ادراری ایجاد کند.

سودوموناس آئروژینوزا: باکتری مقاومی که عفونت‌های جدی، به‌ویژه در بیماران با سیستم ایمنی ضعیف ایجاد می‌کند.

اسینتو باکتر بومانی و سیتروباکتر فروندی: این باکتری‌ها به عنوان پاتوژن‌های فرصت‌طلب در بیمارستان‌ها شناخته می‌شوند و می‌توانند عفونت‌های ادراری و شکمی ایجاد کنند.

۳. مایکوپلازما و لژیونلا

مایکوپلازما پنومونیه: عفونت‌های تنفسی ایجاد می‌کند.
لژیونلا پنومونیه: علت اصلی لژیونلوز، نوعی پنومونی شدید است که معمولاً از آب‌های آلوده ناشی می‌شود.

۴. قارچ‌ها

کاندیداها: شامل کاندیدا آلبیکنس و گلابراتا، می‌توانند باعث عفونت‌های قارچی سیستمیک و عفونت‌های پوستی شوند.

نتیجه‌گیری

آگاهی از ویژگی‌ها و خطرات این پاتوژن‌ها می‌تواند به تشخیص و درمان سریع‌تر عفونت‌ها کمک کند. رعایت بهداشت و واکسیناسیون از عوامل کلیدی پیشگیری در برابر این عفونت‌ها هستند.

Title	24 Tests
	Volume per Vial
SEPMaster- 1	360 µl/tube
SEPMaster- 2	360 µl/tube
SEPMaster- 3	360 µl/tube
SEPMaster- 4	360 µl/tube
Positive Control	100 µl
Internal control	1200 µl/tube

جدول ۱. محتویات کیت

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری گردد، همچنین به منظور انتقال و جابه جایی کیت از یونولیت با درب و یخ خشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی گراد هیچ گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل بر روی بسته های یخ زده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان طور که روی برچسب بسته بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخه های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و در نتیجه عدم کارایی کیت می شود.
- ✓ از قرار دادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
- ✓ معرف ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله ها را به طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به طور یکنواخت مخلوط شده اند.

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

۱. کیت استخراج DNA پاتوژن (شامل باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها)
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه های مختلف و نوک سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفوژ رومیزی
۴. بلوک خنک کننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
۶. گان و دستکش
۷. دستگاه Rotor-Gene , MIC, Azur با ۴ کانال فلوروسنت رنگ Green و Yellow و Red و Orange و یا انتخاب فلورفورهای FAM و HEX و ROX و Cy5
۸. نرم افزار Rotor-Gene Q نسخه ۱/۷/۹۴، نرم افزار ۶۰۰۰ Rotor-Gene نسخه ۱/۷/۶۵، ۱/۷/۸۷، ۱/۷/۹۴ و یا بالاتر.
۹. استریپ و کپ ۰/۱ ml برای استفاده در روتور ۷۲ چاهکی

نکات احتیاط عمومی

۱. لطفاً دستورالعمل را با دقت بخوانید و قبل از استفاده محصول با تمام اجزای کیت آشنا شوید و در حین کار دستورالعمل را دقیقاً دنبال کنید.
۲. لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرآیند را با آن‌ها جلو ببرید.
۳. از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضا استفاده نکنید.
۴. در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.
۵. از سرسمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free استفاده نمایید.
۶. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای سپسیس و نمونه های گرفته شده از مریض، کنترل ها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده سازی Master Mix صورت پذیرد.
۷. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.

۸. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد (به ویژه کنترل مثبت کیت) را به خوبی پیتاژ نمایید و به طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به طور کامل توصیه میشود.
۹. تمام مراحل مربوط به تهیه Master Mix 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.
۱۰. هنگام کار با موادشیمیایی، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یکبار مصرف، و عینکهای محافظ داشته باشید.
۱۱. 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 کاملاً جدا کنید.
۱۲. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.
۱۳. هنگام کار با نمونه ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش ها باید مرتباً تعویض شوند.
۱۴. از تیپ های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ های فیلتر دار برای جلوگیری از ورود آلودگی نوکلئیک اسید استفاده کنید.
۱۵. لطفاً لوله های PCR را با دو دستکش یکبارمصرف بسته بندی کرده و به درستی دور بیندازید. لوله های PCR را پس از امپلی فای باز نکنید.
۱۶. از مواد یکبار مصرف، بیش از یک بار استفاده نکنید.
۱۷. مواد موجود در کیت که بلا استفاده هستند، کیت استفاده شده و زباله ها باید به درستی دور انداخته شوند.
۱۸. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیت ها و تجهیزات را با اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ اسپری کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP¹ توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه‌ای و محافظ² (PPE) انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 انجام شود. (استفاده از دستورالعمل: Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Specimen Associated)
۲. پیشنهاد می‌شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همین‌طور بعد از کار لامپ UV زده شود.
۳. پیشنهاد می‌شود ۳ مکان مجزا برای استخراج اسید نوکلئیک، آماده سازی مخلوط واکنش و اضافه کردن نمونه و نمونه استاندارد در نظر گرفته شود تا از ایجاد نتایج مثبت کاذب جلوگیری شود.
۴. پس از آماده سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

کنترل‌ها

۱. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک حاصل از استخراج نمونه استفاده شود.
۲. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب بجای نمونه استفاده شود.
۳. کنترل مثبت (PTC): از کنترل مثبت کیت به جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

نمونه گیری و نگهداری

معمولاً برای شناسایی پاتوژن‌ها و نشانگرهای التهاب به‌ویژه در سپسیس، نمونه خون مورد بررسی قرار می‌گیرد.

نگهداری نمونه‌های گرفته شده

بهتر است نمونه‌های خون به محض جمع‌آوری به آزمایشگاه ارسال شوند. در صورت امکان، این کار باید در اسرع وقت انجام شود تا از بروز تغییرات در ویژگی‌های بیوشیمیایی جلوگیری شود. اگر ارسال نمونه‌ها فوراً ممکن نیست، آنها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد (یخچالی) نگهداری کنید. این دما مانع از رشد باکتری‌های غیرهدف و حفظ کیفیت نمونه می‌شود.

¹ Good Laboratory Practice

² Personal Protective Equipment

نمونه‌های خون معمولاً نباید منجمد شوند، زیرا یخ زدن می‌تواند به ساختار سلولی آسیب بزند و باعث مختل شدن نتایج آزمایش شود.

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

کنترل داخلی (Internal Control)

کنترل کیت حاضر، بصورت اگزوزن می‌باشد. این امر به کاربر نهایی اجازه می‌دهد تا فرآیند تخلیص را چک کرده و همچنین احتمال وجود مواد مهارکننده PCR را بررسی نماید. به طور کل در این حالت کنترل داخلی موجود در کیت را به مقدار $0.5/1$ میکرو لیتر به اجزاء هر 1 میکرو لیتر از حجم الوشن بافر افزوده شده در مرحله پایانی استخراج نمونه، اضافه نمایید. برای مثال اگر ژنوم تخلیص شده را در 50 میکرو لیتر آب یا الوشن بافر حل می‌کنیم باید در هنگام تخلیص 25 میکرو لیتر کنترل داخلی اضافه نماییم. به بیان دیگر حجم کنترل اضافه شده تنها تابعی از میزان الوشن (Elution) نهایی می‌باشد. این کنترل داخلی را می‌توان به مخلوط بافر لیز و نمونه اضافه نمود. این نکته قابل ذکر است که اضافه کردن کنترل داخلی به مخلوط بافر لیز و نمونه باید به صورت تازه صورت گیرد. همچنین کنترل داخلی به هیچ عنوان نباید به خود نمونه به صورت مستقیم و در غیاب بافر لیز اضافه شود. همچنین می‌توان کنترل داخلی را تنها در طی مرحله PCR اضافه کرد که در این حال هیچ گونه کنترلی بر روی مرحله تخلیص وجود نخواهد داشت. در این حالت یک میکرو لیتر کنترل داخلی به 15 میکرو لیتر SEPMaster-2 اضافه شده و سپس از این مخلوط، مقدار 15 میکرو لیتر با 5 میکرو لیتر از نمونه تخلیص شده میکس می‌گردد.

عوامل تداخلی

حضور EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه‌های سیلیس ($1\mu\text{l}$)، خون ($1\mu\text{l}$)، اوره (40 گرم در 100 میلی لیتر) و بافر لیز موجب مهار واکنش PCR می‌شود. وجود مهارکننده در واکنش باژن کنترل داخلی قابل ردیابی است.

خالص سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسید نوکلئیک باید توسط کیت های جداسازی موجود در بازار مطابق پروتکل های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود.

محتوای ژنتیکی باید از نمونه خون استخراج شده باشد. کیت استخراج DNA در این کیت گنجانده نشده است.

✓ برای استخراج DNA باید در نظر داشته باشید با توجه به تشخیص انواع پاتوژن ها شامل باکتری های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ ها، باید از کیت استخراجی استفاده کرد که بصورت کلی توانایی استخراج DNA این پاتوژن ها را دارا باشد یا در غیر اینصورت برای استخراج DNA هر کدام (باکتری گرم مثبت و منفی و قارچ) از کیت های استخراجی مجزا استفاده کرد.

در صورت استفاده از محیط کشت خون، به منظور حذف مهار کننده های کیت Real-time، حتما نیاز است که مقدار یک میلی لیتر از محیط کشت خون به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ RPM سانتریفیوژ شود تا سلول ها ته نشین شوند، سپس محیط رویی کاملاً خارج و دور ریخته شود و در ادامه به مقدار مورد نیاز برای شروع استخراج (مثلاً ۳۰۰ میکرولیتر) به رسوب آب مقطر استریل اضافه شود و پس از همگن کردن رسوب با آب مقطر استخراج صورت گیرد.

آماده سازی

۱. میکروتیوب های کیت را روی رک یخ بگذارید تا محتویات آن ها ذوب شوند و محتویات لوله ها را به آرامی پیپتاژ و یا ورتکس کنید و به طور مختصر سانتریفیوژ کنید.

۲. سپس به ازای هر نمونه مورد تست، ۴ میکروتیوب PCR را به ترتیب بر روی رک یخ بگذارید. میکروتیوب های دیگری را نیز به ترتیب برای NTC و PTC در نظر بگیرید.

✓ اگر از کیت استخراج کلی برای DNA استفاده کردید، برای سنجش وضعیت سپسیس به ازای هر نمونه ۴ تست انجام خواهد شد، اما اگر کیت استخراجی باکتری و قارچی بصورت مجزا تهیه شده باشد، برای لوله ۴ که توانایی تشخیص باکتری *Staphylococcus epidermidis* و قارچ های *Candida albicans*، *Candida glabrata*، و *Candida tropicalis* را دارد باید دو بار تست مجزا با نمونه استخراج شده توسط کیت باکتریایی و نمونه استخراج شده توسط کیت قارچی گذاشته شود.

۳. در صورتی که کنترل داخلی را در مرحله استخراج و طی مراحل آماده سازی اضافه کرده اید، مقادیر لازم برای آماده سازی MasterMix برای هر واکنش ۱۵ میکرولیتر می باشد.

اگر از IC فقط به عنوان یک کنترل کننده مهار RT-PCR در حین فرایند Real-time استفاده شود، اما نه به عنوان یک کنترل کننده برای روش استخراج و آماده سازی نمونه، در این حالت، ابتدا، ۱ میکرو لیتر از کنترل داخلی به مسترمیکس دوم اضافه می شود و سپس از این مخلوط ۱۵ میکرو لیتر برای هر واکنش استفاده می گردد.

۴. پس از آماده سازی محلول ها و انتقال آن به تیوب های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، ۵ میکرو لیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید و درب آن را ببندید. سپس لوله ها را به منطقه کار با اسید نوکلئیک انتقال دهید، ۵ میکرو لیتر از کنترل مثبت و یا ۵ میکرو لیتر از نمونه های بیمار را به تیوب های مربوطه اضافه نمایید. در حین تهیه PCR لازم است همه اجزا در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگهداری شوند (جدول شماره ۲).

جدول ۲. آماده سازی واکنش

Reaction Setup	Volume
SEPMaster- 1 or 2 or 3 or 4	15 μ l
Sample or Control	5 μ l
Final Volume	20 μ l

۵. لوله ها را ببندید، مختصراً سانتریفیوژ کنید، آنها را داخل دستگاه قرار دهید و اجازه دهید مطابق مشخصات برنامه قید شده در جدول شماره ۳ تکثیر شوند. هنگام استفاده از کنترل مثبت یا مواد بالینی بسیار مراقب باشید.

✓ نکته در هر بار انجام تست یک لوله به عنوان No Template Control باید گذاشته شود. در NTC به جای نمونه استخراج شده از آب استفاده می شود که برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.

✓ بهتر است از فضاهای جداگانه برای اضافه کردن مستر واکنش و نمونه های بیمار استفاده کرد و همچنین در نظر داشته باشید که در ویال کنترل مثبت را تنها در محل آماده سازی نمونه و فضای آلوده باز نمایید.

✓ در صورتیکه برای هر ۴ مستر، PTC را ران نکردید، گذاشتن یک PTC در هر ران، حداقل برای SEPMaster-1 اکیدا توصیه می شود. وجود PTC و بستن gain دستگاه روی آن، سبب می شود گراف های بهتری در amplification plot، دیده شود.

برنامه ریزی دمایی

دستورالعمل برای دستگاه های MIC و Rotor-Gene توصیف شده است. دیگر دستگاه های Real-Time PCR دارای کانالهای Green (FAM)، Orange (ROX or Texas Red)، Red (CY5) و Yellow (HEX) نیز مناسب برای استفاده از این کیت هستند. پس از تنظیم کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید.

	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	40
Annealing and Acquisition on Channel Green, Orange, Red and Yellow	60°C	45 sec	

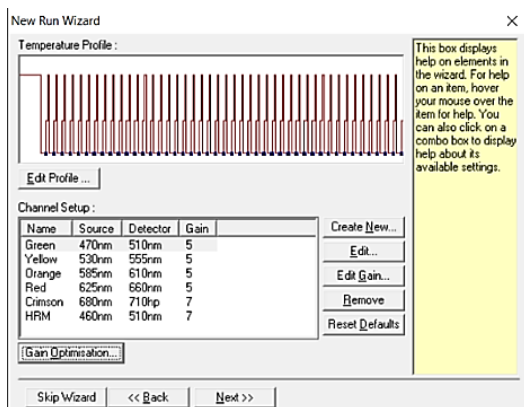
جدول ۳: برنامه دمایی دستگاه

علاوه بر این، لازم به ذکر است که کانال Yellow کیت در صورت عدم خوانش رنگ یا فلوروفور HEX در دستگاه Real-Time PCR مورد استفاده، قابلیت ستاپ و تنظیم با فلوروفورهای VIC یا Joe نیز دارا است که میتوانید برای پشتیبانی فنی و اطلاعات بیشتر با تلفن های شرکت تماس حاصل فرمایید.

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها

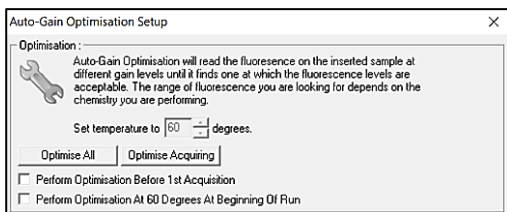
دستگاه Rotor-Gene

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه‌ی Gain Optimization را انتخاب کنید (شکل ۱).



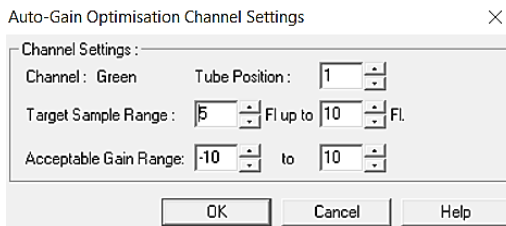
شکل ۱: تنظیمات دستگاه برای Gain Optimization

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimize Acquiring برای هر ۴ کانال سبز، زرد، نارنجی و قرمز، بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



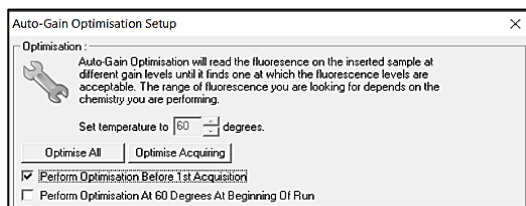
شکل ۲: تنظیمات دستگاه برای Auto Gain Optimization

توجه نمایید Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب شامل SEPMaster-1 انجام شود، بنابراین عدد نوشته شده در کادر Tube Position باید صحیح نوشته شده باشد (شکل ۳). بهتر است در این position میکروتیوب PTC مربوط به SEPMaster-1 قرار داده شود.



شکل ۳: تنظیمات دستگاه برای Auto Gain Optimization

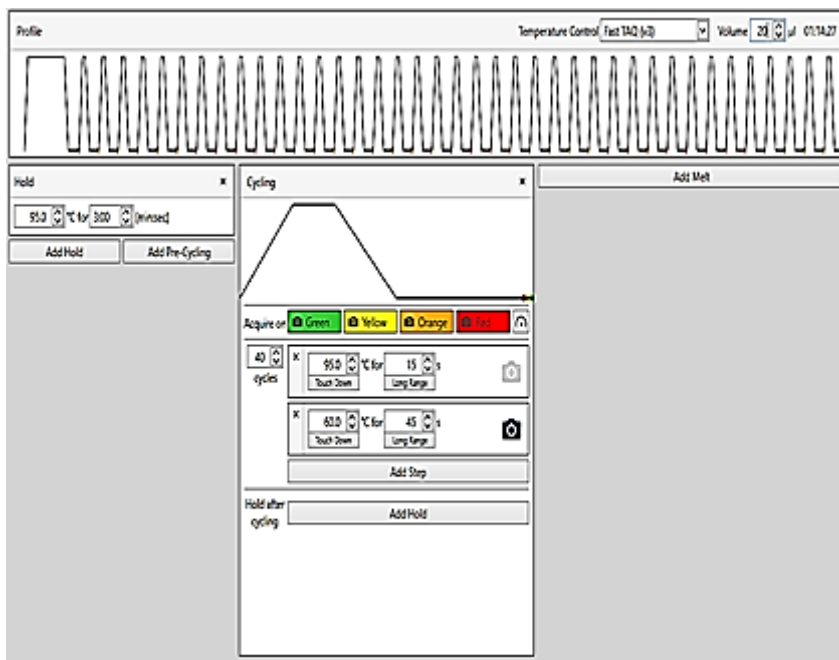
پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی 1st Perform Optimization Before Acquisition را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۴).



شکل ۴: تنظیمات دستگاه برای Auto Gain Optimization

دستگاه MIC

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 ۴ کانال فعال کنید (شکل ۵).



شکل ۵: تنظیمات دستگاه MIC

آنالیز نتایج

۱. آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در ۴ کانال رنگی Green و Yellow و Orange و Red و یا فلورفورهای FAM و HEX و ROX و Cy5 آستانه را در بازه‌ی مناسب قرار دهید. نتایج را به صورت زیر تفسیر کنید:

نمونه زمانی مثبت می‌شود که دارای دو شرط زیر باشد.

۱. دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد.

۲. نمونه در میکس ۲ در کانال نارنجی که کنترل داخلی (IC) است، مثبت باشد و

$CT > 30$ داشته باشد.

۳. محدوده Ct قابل قبول لوله ۲ کیت sepsis برای کانال Green (FAM) و Yellow

(HEX) کمتر از ۳۵ ($CT > 35$) می‌باشد.

جدول تفسیر نتایج

	Green (FAM)	Yellow (HEX)	Orange (ROX)	Red (CY5)	Result
Mix 1	+	-	-	-	Pos: Staphylococcus aureus
	-	+	-	-	Pos: Enterococcus faecalis
	-	-	+	-	Pos: Acinetobacter baumannii
	-	-	-	+	Pos: Streptococcus pneumoniae
Mix 2	+	-	-	-	Pos: Klebsiella pneumoniae
	-	+	-	-	Pos: Pseudomonas aeruginosa
	-	-	+	-	Internal Control
	-	-	-	+	Pos: Legionella pneumophila
Mix 3	+	-	-	-	Pos: E. coli
	-	+	-	-	Pos: Proteus mirabilis
	-	-	+	-	Pos: Mycoplasma pneumoniae
	-	-	-	+	Pos: Citrobacter freundii
Mix 4	+	-	-	-	Pos: Candida albicans
	-	+	-	-	Pos: Candida tropical
	-	-	-	-	Pos: Candida glabrata
	-	-	+	-	Pos: Staphylococcus epidermidis

جدول ۴: تفسیر نتایج

نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف

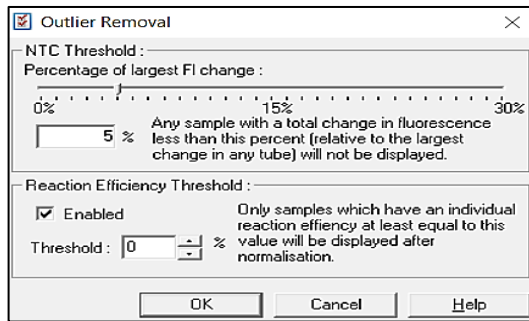
دستگاه Rotor-Gene

آنالیز اطلاعات در دستگاه ۶۰۰۰ Rotor-gene Q و Rotor-gene باید توسط نرم‌افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.

۱. از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی یک رنگ، به طور مثال Green، دوبار کلیک کنید.

۲. در صورت وجود نویز با کلیک بر گزینه ی Outlier Removal، ترشلد NTC را بر ۰.۵٪ تنظیم کرده و ترشلد افیشنسی واکنش را به شکل زیر فعال کنید (شکل شماره ۷).

۳. آستانه (Threshold) را در کانال‌های Green، Orange، Yellow و Red بر روی بازه‌ی مناسب (۰.۲/۰) و بالاتر از فلورسانس نمونه‌ی منفی قرار دهید.



شکل ۷. تنظیمات دستگاه

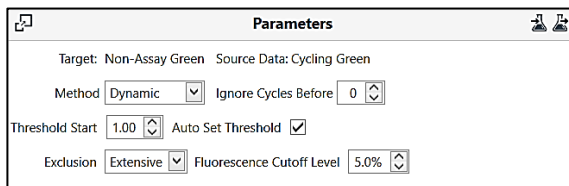
دستگاه MIC PCR

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

۱. از منوی Analysis روی یک رنگ، به طور مثال Non-Assay Green، کلیک کنید.

۲. در بخش Parameters به طور پیش‌فرض حالت Extensive برای Exclusion انتخاب شده است؛ و بخش Fluorescence Cut off Level بر ۰.۵٪ تنظیم شده است. در غیر این صورت، این تنظیمات را وارد کنید (شکل ۸):

۳. انتخاب Threshold را به صورت اتوماتیک با فعال کردن گزینه‌ی Auto Set Threshold انجام دهید.



Parameters

Target: Non-Assay Green Source Data: Cycling Green

Method: Ignore Cycles Before:

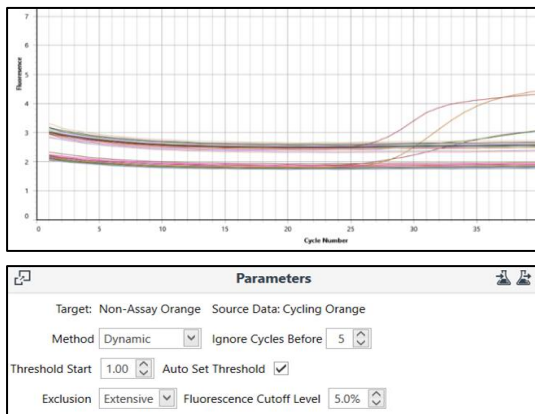
Threshold Start: Auto Set Threshold: ☒

Exclusion: Fluorescence Cutoff Level:

شکل ۸. تنظیمات دستگاه

۴. مراحل بالا را برای کانال‌های دیگر Orange، Yellow و Red تکرار کنید.

۵. در صورت وجود نویز ابتدایی در بخش Data (شامل داده‌های خام) کانال موردنظر به شکل زیر، در بخش Parameters با قرار دادن عدد ۵ در کادر مقابل Ignore Cycles Before، ه سیکل ابتدایی را نادیده بگیرید (شکل ۹).



شکل ۹. تنظیمات دستگاه

ارزیابی آنالیتیکال

حساسیت آنالیتیکال

باتوجه به نتایج حاصله، حدپایین تشخیصی برای این کیت در تایپ های مختلف به شرح زیر است (جدول ۵):

جدول ۵. ارزیابی حساسیت آنالیتیکال

Target	LoD
Staphylococcus aureus	2 copies per PCR
Enterococcus faecalis	5 copies per PCR
Acinetobacter baumannii	10 copies per PCR
Streptococcus pneumoniae	4 copies per PCR
Klebsiella pneumoniae	12 copies per PCR
Pseudomonas aeruginosa	16 copies per PCR
Legionella pneumophila	8 copies per PCR
E. coli	3 copies per PCR
Proteus mirabilis	10 copies per PCR
Mycoplasma pneumoniae	9 copies per PCR
Citrobacter freundii	20 copies per PCR
Candida albicans	15 copies per PCR
Candida tropicalis	7 copies per PCR
Candida glabrata	2 copies per PCR
Staphylococcus epidermidis	4 copies per PCR

اختصاصیت آنالیتیکال

اختصاصیت کیت SENMURV Sepsis qRT-PCR در قدم اول با انتخاب پرایمرها و پروب ها و همچنین انتخاب شرایط واکنش دقیق مورد تأیید قرار می گیرد. با استفاده از آنالیز مقایسه‌ای توالی‌ها، پرایمرها و پروب‌ها از منظر هومولوژی‌های احتمالی با تمامی توالی‌های ثبت‌شده در بانک‌های ژنی بررسی شده‌اند. قابلیت تشخیصی (Detectability) تمامی ژنوتیپ‌های مرتبط با هر سویه از طریق همترازسازی توالی‌ها و همین‌طور توسط واکنش PCR بر روی دستگاه‌های Rotor-Gene بر روی باکتری‌ها مورد تأیید قرار گرفت. همچنین پرایمرها و پروب‌های مربوط به هر باکتری و یا قارچ با سایر پاتوژن‌های موجود و همچنین ویروس‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و عملکرد اختصاصی هر کدام تأیید شد.

پشتیبانی فنی

جهت ارتباط با پشتیبانی فنی با شماره‌های زیر تماس حاصل فرمایید .

✓ ۰۹۹۳۶۶۹۳۹۴۱ (آقای قره داغی-مدیر پشتیبانی فنی)

✓ ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

نشانه‌ها

	Research Use Only	برای مصارف پژوهشی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولید شده
	Temperature Limitation	محدودیت دمایی
	Consult Instruction for Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficient for <n> test	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

شرکت فناوری بن یاخته- گروه سین مورو

دفتر مرکزی : تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار 24 متری سعادت آباد، خیابان
حیدر نیا (دوم شرقی)، پلاک 9 ، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی : 1997775555 تلفن تماس : 02122082120

Web Site: www.Senmurv.co

Email: info@senmurv.ir