



Instruction for Use

STD Detection RT-qPCR Kit

باروش

Real-Time PCR

Cat-No: BONSTD4-V03-24



Doc. #: IFU-STD-01 Doc. Version: 05 Revision Date: 1404-02-13

فهرست مطالب

۳	شماره رفرانس
۳	شرح کیت
۳	اصول
۴	دامنه کاربرد
۷	محتویات کیت
۸	نگهداری و انتقال کیت
۹	نکات احتیاط عمومی
۱۰	هشدارها و محدودیت‌ها
۱۱	نمونه گیری و نگهداری
۱۳	عوامل تداخلی
۱۴	آماده سازی و اضافه کردن الگو
۱۴	برنامه ریزی دمایی
۱۶	تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها
۱۹	آنالیز نتایج
۲۴	ارزیابی آنالیتیکال
۲۶	ارزیابی کلینیکال
۲۷	پشتیبانی فنی
۲۸	اطلاعات تماس

- BONSTD4-V03-24

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) به صورت Real-Time ساخته شده است. پنل تشخیص STD سین مورو شامل ۴ لوله با قابلیت شناسایی ۱۳ پاتوژن است؛ لوله ۱ قابلیت افتراق بین پاتوژن های *Ureaplasma parvum* و *Neisseria gonorrhoeae*، *Candida Albicans* داشته و همچنین کنترل داخلی در این لوله می باشد. لوله ۲ به منظور تشخیص پاتوژن های *Ureaplasma urealyticum*، *Mycoplasma hominis*، *Trichomonas vaginalis* و *Mycoplasma genitalium* طراحی شده است. لوله ۳ 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. لوله ۴ تشخیص پاتوژن های *Chlamydia*، *Treponema pallidum*، *Haemophilus ducreyi*، *trachomatis* و *Gardnerella vaginalis* را بر عهده دارد.

نتایج تشخیصی به دست آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم ویروس می باشد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق رنگ های فلورسنت شناسایی می شوند. مشاهده شدت فلورسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص و کمی سازی محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به باز کردن مجدد لوله های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می سازد.

دامنه کاربرد

هدف از غربالگری بیماری‌های 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 بیماری‌های 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 می‌باشند.

اطلاعات پاتوژن

بیماری‌های مقاربتی (STDs)، عفونت‌هایی هستند که بر سلامت جنسی و تولیدمثل افراد تأثیر گذاشته و به‌عنوان 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. trachomatis یک باکتری درون سلولی کوچک است که برای تکثیر به سلول‌های زنده نیاز دارد. در زنان، عفونت دستگاه فوقانی توسط این باکتری می‌تواند منجر به بیماری التهابی لگن (PID) و طیفی از اختلالات بالینی شامل عفونت و التهاب رحم، لوله‌های فالوپ و تخمدان‌ها شود. اگرچه این پاتوژن در مردان می‌تواند باعث اپیدیدیمیت شود، تاکنون عواقب طولانی مدتی برای آن گزارش نشده است.

N. gonorrhoeae دیپلوکوک‌های گرم منفی لوبیایی شکل هستند که عامل ایجادکننده‌ی سوزاک و سندروم‌هایی شامل التهاب دهانه‌ی رحم در زنان، و عفونت مجرای ادرار، التهاب گلو و روده در مردان و زنان می‌باشد.

M. genitalium یک ارگانیزم بی‌هوازی اختیاری است و به‌عنوان 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 نشان‌دهنده 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 می‌کند و با عفونت‌های دستگاه ادراری-تناسلی، به‌ویژه عفونت واژن باکتریایی و عفونت مجرای ادراری غیرگنوکوکی ارتباط دارد. همچنین در عفونت‌های خارج دستگاه تناسلی، مانند تب پس از زایمان یا بعد از سقط جنین، در عفونت‌های زخم پس از سزارین یا پس از هیستروکتومی نقش دارد. گونه‌های *Ureaplasma* معمولاً از مخاط تناسلی افراد بدون علائم جدا می‌شوند. در انسان، دو گونه‌ی اصلی یعنی *U. parvum* و *U. urealyticum* بخشی از فلور تناسلی مردان و زنان را تشکیل می‌دهند و تقریباً در ۷۰٪ 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 (*HSV-1* و *HSV-2*) 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 بی‌هوازی غالب است که مسئول ایجاد واژینوز باکتریایی (BV) در زنان است. اگرچه *G* واژینالیس یک جزء طبیعی فلور طبیعی واژن است، اما تکثیر بیش‌ازحد این باکتری می‌تواند منجر به BV، علت اصلی ترشحات غیرطبیعی واژن یا واژینیت شود. عفونت گاردنرلا به دلیل پیامدهای گسترده آن بر سلامت باروری زنان، حساسیت به بیماری‌های مقاربتی و احتمال ایجاد عوارض در دوران بارداری، چالش‌های متمایزی را ایجاد

می‌کند. BV با ناباروری، زایمان زودرس، اندومتریوت پس از زایمان، بیماری التهابی لگن، و افزایش خطر ابتلا به ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) و سایر عفونت‌های مقاربتی (STIs) مرتبط است.

Candida Albicans (CA)، قارچ بیماری‌زای انسانی، معمولاً در سطوح مخاطی مانند واژن یافت می‌شود. این قارچ ممکن است به‌عنوان یک عامل بی‌ضرر باقی بماند، اما همچنین می‌تواند باعث بیماری شود. حدود ۷۵ درصد از زنان حداقل یک‌بار کاندیدیازیس ولوواژینال (VVC) را در طول زندگی خود تجربه می‌کنند. برخی از عوامل مستعد کننده برای VVC، مانند دیابت یا بارداری، شناسایی شده‌اند. با این حال، VVC در بین زنان سالم نیز رایج است. چسبندگی قارچ به اپیتلیوم یک پیش‌نیاز برای کلونیزاسیون است و عفونت‌ها با حمله به سلول‌های اپیتلیال واژن مشخص می‌شوند. علاوه بر این، تشکیل هیف با آسیب رساندن به بافت اپیتلیال به عفونت‌های علامت‌دار واژن کمک می‌کند. بنابراین، تعدادی از عوامل ممکن است مسئول VVC باشند، اما مکانیسم‌های بیماری‌زایی دقیق عفونت‌های کاندیدا واژینال هنوز به‌خوبی شناخته نشده است.

Treponema pallidum (Tp)، عامل ایتیلوژیک سیفلیس، باعث عفونت مقاربتی چندمرحله‌ای (STI) می‌شود. این باکتری عامل ایجاد سیفلیس است و همچنین تصور می‌شود که احتمال انتقال HIV را افزایش می‌دهد. عفونت *T. pallidum* در صورت عدم درمان در ۴ مرحله پیشرفت می‌کند. چندین نوع آزمایش آزمایشگاهی برای تشخیص تریپونما پالیدوم موجود است. سرولوژی، میکروسکوپ میدان تاریک و PCR استانداردهای طلایی برای تشخیص این پاتوژن هستند. با این حال، سنجش Real Time PCR به‌عنوان ابزار تشخیصی حساس‌تر و اختصاصی‌تر برای تشخیص آن نشان داده شده است.

Haemophilus ducreyi (HD)، یک باکتری بیماری‌زای گرم منفی، میله‌ای شکل و غیر متحرک از خانواده Pasteurellaceae است. عفونت انسان با این باکتری باعث Chancroid، یک بیماری زخم ناحیه تناسلی عمدتاً مردانه می‌شود 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 می‌کند. انتقال بیماری از طریق تماس جنسی (تماس پوست با پوست با زخم‌های باز) اتفاق می‌افتد. 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

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری گردد، همچنین به‌منظور انتقال و جابه‌جایی کیت از یونولیت با درب و یخ خشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هیچ‌گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل بر روی بسته‌های یخ‌زده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان‌طور که روی برچسب بسته‌بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخه‌های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و در نتیجه عدم کارایی کیت می‌شود.
- ✓ از قرار دادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
- ✓ معرف‌ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله‌ها را به‌طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به‌طور یکنواخت مخلوط شده‌اند.

مواد و تجهیزات موردنیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود:

۱. کیت استخراج DNA
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه‌های مختلف و نوک سمپلر فیلتر دار
۳. سانتریفیوژ رومیزی
۴. بلوک خنک‌کننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
۶. گان و دستکش
۷. دستگاه با قابلیت خوانش در کانال‌های فلوروسنت مخصوص Green, Yellow, Red و Orange
۸. نرم‌افزار دستگاه مورد استفاده
۹. استریپ و کپ مناسب دستگاه مورد استفاده

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.
- ✓ لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرآیند را با آنها جلو ببرید.
- ✓ از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضا استفاده نکنید.
- ✓ در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.
۲. از سرسپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free استفاده نمایید.
۳. نگهداری و تخلیص نمونه‌های گرفته‌شده، کنترل‌ها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده‌سازی مسترمیکس صورت پذیرد.
۴. همه مواد موردنیاز کیت قبل از شروع کار باید به‌طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.
۵. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد را به‌خوبی پیتاژ نمایید و به‌طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به‌طور کامل توصیه می‌شود.
۶. تمام مراحل مربوط به تهیه مسترمیکس باید بر روی یخ یا جعبه‌های سرد (Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به مسترمیکس بعد از برداشتن مقدار موردنیاز از آن باید به‌سرعت به فریزر منتقل شود.
۷. هنگام کار با مواد شیمیایی، روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یک‌بارمصرف، و عینک‌های محافظ داشته باشید.
۸. 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.
۹. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.
۱۰. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.
۱۱. از تیپ‌های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ‌های فیلتردار برای جلوگیری از ورود آلودگی RNA و DNA استفاده کنید.

۱۲. لطفاً لوله‌های PCR را با دو دستکش یک‌بارمصرف بسته‌بندی کرده و به‌درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR پس از امپلیفای را باز نکنید.
۱۳. از استفاده‌ی مجدد مواد یک‌بارمصرف بپرهیزید.
۱۴. مواد موجود در کیت که بلااستفاده شدند، کیت استفاده‌شده و زباله‌ها باید به‌درستی دور انداخته شوند.
۱۵. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیت‌ها و تجهیزات را با اسپری اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ تمیز کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP¹ توسط پرسنل آموزش‌دیده 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 محل استخراج اسید نوکلئیک، آماده‌سازی مخلوط واکنش از فضای آماده‌سازی و اضافه کردن نمونه و نمونه کنترل مثبت جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید.
۴. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

¹ Good Laboratory Practice

² Personal Protective Equipment

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.

نمونه‌گیری و نگهداری

۱. 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.
۲. نمونه مناسب می‌تواند حاوی میزان کافی از مخاط دهانه یا گردن رحم باشد.

نگهداری نمونه‌های گرفته‌شده

نمونه می‌تواند کمتر از ۸ ساعت در یخچال با محدوده دما از ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای نگهداری طولانی‌مدت آن، باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده و نگهداری شود.

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

کنترل داخلی (Internal Control)

به منظور بررسی راندمان استخراج و PCR، کنترل داخلی اندوژن در STD Master-1 قرار داده شده است. همچنین در STD Master-3 (HSV-1, HSV-2) کیت نیز کنترل داخلی اگزوژن در نظر گرفته شده است که به کاربر این امکان را می دهد که فرآیند تخلیص و احتمال وجود مواد مهارکننده PCR را زمانی که فقط تست HSV می گذارد به طور مستقل بررسی نماید.

توجه: در صورت استفاده از نمونه CSF و مایعات بدون بافت، ممکن است که کنترل داخلی اندوژن در STD Master-1 فاقد CT باشد.

توجه: در صورتی که قصد دارید مستقلاً تست HSV انجام دهید یا قصد بررسی صحت فرایند استخراج نمونه ها را دارید می توانید از طریق افزودن کنترل داخلی (IC) اگزوژن کیت به نمونه حین مراحل استخراج، این موضوع را بررسی نمایید. برای این منظور کنترل داخلی موجود در کیت را به مقدار 0.2 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 می کنیم باید در هنگام تخلیص نمونه مربوط به آن به نمونه، 10 میکرو لیتر کنترل داخلی اضافه نماییم. به بیان دیگر حجم کنترل اضافه شده تنها تابعی از میزان الوشن (Elution) نهایی می باشد. این کنترل داخلی را می توان 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 می توان 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 MasterMix-3 STD اضافه شده و سپس از این مخلوط، مقدار 15 میکرو لیتر به 5 میکرو لیتر از نمونه تخلیص شده میکس می گردد.

عوامل تداخلی

حضور EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه‌های سیلیس (1μl)، خون (1μl)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و بافر لیز موجب مهار واکنش PCR می‌شود. وجود مهارکننده در واکنش با ژن کنترل داخلی قابل‌ردیابی 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.

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

(۲) 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 در کانال مجرای ادرار به ابعاد ۲ تا ۴ سانتی‌متر قرار دهید، جهت جمع‌آوری ترشح، سواب را به آرامی در جهت عقربه‌های ساعت ۳ تا ۵ 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، به آرامی ۳ تا ۵ 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 به آرامی در جهت عقربه‌های ساعت ۳ تا ۵ بار بچرخانید، سپس نمونه را در ویال جمع‌آوری نمونه استریل قرار دهید.

۳) نمونه‌ها باید با کیسه یخ زیر صفر درجه سانتی‌گراد منتقل شده و استخراج شوند تا بلافاصله DNA به دست آید. اگر DNA استخراج شده بلافاصله مورد استفاده قرار نگیرد، باید دردمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شود.

آماده‌سازی و اضافه کردن الگو

به منظور انجام تست، به صورت جداگانه از میکس‌های آماده STD که شامل چهار مسترمیکس می‌باشد به میزان 15 µl به ازای هر واکنش به تیوب‌های واکنش اضافه نمایید. در مرحله بعد، ابتدا نمونه کنترل منفی را برای بررسی NTC به تیوب مورد نظر اضافه نموده، برای این کار، 5 میکرو لیتر از آب بدون نوکلئاز موجود در کیت را به تیوب کنترل منفی بی افزایید. پس از انتقال به منطقه کار با اسیدنوکلیک (استیشن آلوده)، به میزان 5 میکرو لیتر از کنترل مثبت و 5 میکرو لیتر از نمونه‌های بیمار را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید. سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید. (جدول ۲).

Reaction Setup	Volume
Master Mix (1, 2, 3 and 4)	15 µl
Sample or Positive Control	5 µl
Final Volume	20 µl

جدول ۱. آماده‌سازی واکنش

برنامه‌ریزی دمایی

دستورالعمل برای دستگاه‌های MIC و Rotor-Gene توصیف شده است. دیگر دستگاه‌های Real-Time PCR دارای کانال‌های Green، Orange (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 راه‌اندازی کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول ۲ آورده شده است.

	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	4 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	40
Annealing and Acquisition on Channel Green (FAM), Orange (Texas red) , Red (Cy5) and Yellow (HEX)	58°C	60 sec	

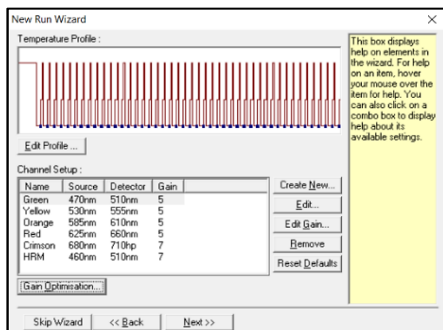
جدول ۲: برنامه دمایی دستگاه

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

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌ها

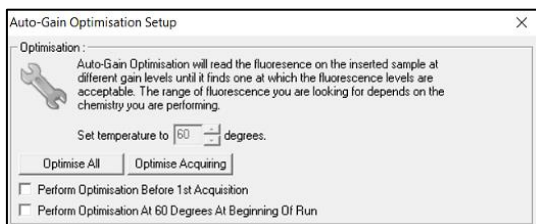
دستگاه Rotor-Gene

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



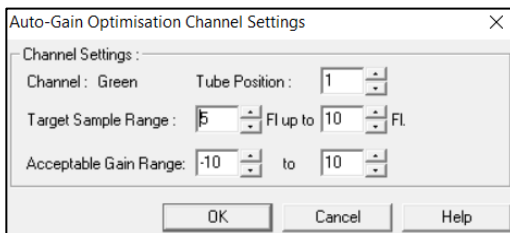
شکل ۱. تنظیمات دستگاه

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 پیش‌فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



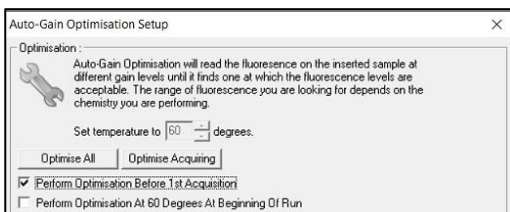
شکل ۲. تنظیمات دستگاه

همچنین Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب حاوی STD Master-1 و Positive Control انجام شود، بنابراین عدد نوشته شده در کادر Tube Position باید صحیح نوشته شده باشد (شکل ۳).



شکل ۳. تنظیمات دستگاه

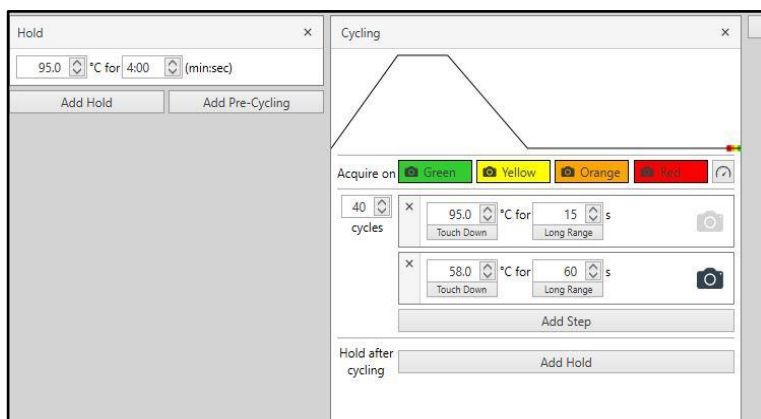
پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی Perform Optimization Before 1st Acquisition را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۴).



شکل ۴. تنظیمات دستگاه

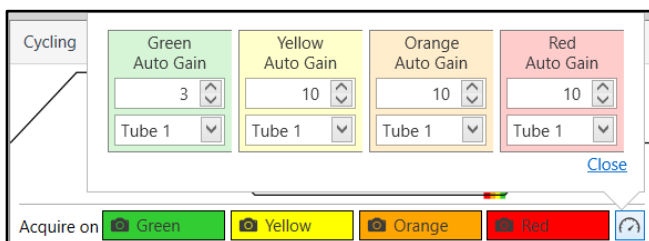
دستگاه MIC

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

از آنجایی که Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب شامل STD Master-1 انجام شود، با باز کردن پنجره‌ی تنظیمات Gain برای کانال‌های مختلف، در کادر مربوط به تیوب Gain، گزینه All tube را از حالت پیش فرض به جایگاه تیوب مورد نظر که حاوی STD Master-1 و Positive Control کیت است، تغییر دهید (شکل ۶).



شکل ۶. تنظیمات دستگاه

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 انتخاب فلورفورهای FAM و HEX و (ROX or TEXAS Red) و CY5 پس از قرار دادن درصد حذف داده های پرت بر ۰.۵٪، آستانه را در بازه ی مناسب قرار دهید.

۲. برای تفسیر نتایج، مطابق جدول صفحه بعد عمل کنید. خوانش هر یک از میکس های ۱ و ۲ در هر یک از کانال های فلورسانس مشخص می کند کدام تایپ STD در نمونه وجود دارد.

	Green (FAM)	Yellow (HEX)	Orange (ROX or TEXAS Red)	Red (CY5)
STD Master-1	NG	β -globin	CA	UP
STD Master-2	TV	MH	UU	MG
STD Master-3	HSV1	IC	HSV2	-
STD Master-4	GV	HD	CT	TP

جدول ۳: ژنوتایپ های موجود در هر لوله

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

✓ نتیجه منفی یک نمونه مستلزم داشتن میکس ۱ مثبت در کانال زرد و جواب منفی برای بقیه میکس ها در کانال های دیگر است.

زمانی که منحنی سیگموئیدی نباشد جواب نمونه منفی خواهد بود.

✓ نمونه زمانی مثبت می شود که دارای سه شرط زیر باشد.

A دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی

B مقدار Ct نمونه در حالت آستانه ۰.۲/۰ کمتر از ۳۵ باشد.

C نمونه باید در کانال زرد میکس ۱ که کنترل داخلی (۱۵-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.

✓ نمونه *Candida Albicans* زمانی مثبت است که علاوه بر شروط ذکرشده، دارای Ct کمتر از ۳۵ باشد.

✓ در آنالیز میکس ۳ برای HSV، در صورت مشاهده‌ی اختلاف سیکل کمتر از ۱۰ سیکل بین دو نوع HSV-1 و HSV-2، نمونه دارای هر دو واریانت HSV-1 و HSV-2 می‌باشد. در اختلاف بیشتر از ۱۰ سیکل، ویروس با سیکل آستانه‌ای کمتر مثبت می‌باشد.

جدول تفسیر نتایج

	Green (FAM)	Yellow (HEX)	Orange (ROX/ TEXAS Red)	Red (CY5)	Result
Master-1	+	-	-	-	Neisseria gonorrhoeae
	-	+	-	-	β -globin
	-	-	+	-	Candida Albicans
	-	-	-	+	Ureaplasma parvum
Master-2	+	-	-	-	Trichomonas vaginalis
	-	+	-	-	Mycoplasma hominis
	-	-	+	-	Ureaplasma urealyticum
	-	-	-	+	Mycoplasma genitalium
Master-3	+	-	-	-	HSV1
	-	-	+	-	HSV2
	-	+	-	-	IC
Master-4	+	-	-	-	Gardnerella vaginalis
	-	+	-	-	Haemophilus ducreyi
	-	-	+	-	Chlamydia trachomatis
	-	-	-	+	Treponema pallidum

جدول ٤: تفسیر نتایج

نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف

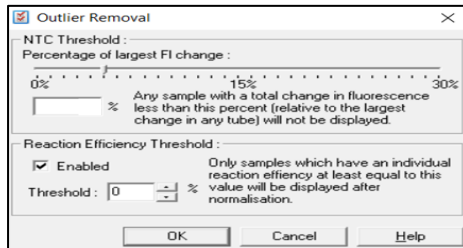
دستگاه Rotor-Gene

آنالیز اطلاعات در دستگاه Rotor-gene ۶۰۰۰ و Rotor-gene ۳۰۰۰ باید توسط نرم‌افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.

۱. از منوی Analysis, Quantitation را انتخاب کرده و روی یک رنگ، به‌طور مثال Green، دو بار کلیک کنید.

۲. با کلیک بر گزینه‌ی Outlier Removal، ترشید افیشنسی واکنش را به شکل زیر فعال کنید (شکل ۷).

۳. آستانه (Threshold) را در کانال‌های Green, Orange, Yellow و Red بر روی بازه‌ی مناسب (۰/۰۲-۰/۱) 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 انتخاب کرده و روی یک رنگ، به‌طور مثال Non-Assay Green، کلیک کنید.

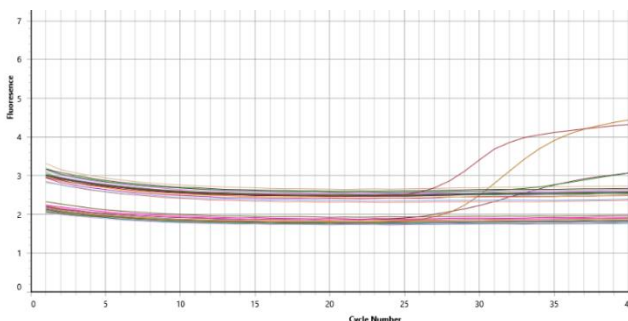
۲. در بخش Parameters به‌طور پیش‌فرض حالت Extensive برای Exclusion انتخاب‌شده است؛ و در بخش Fluorescence Cutoff Level بر ۵٪ تنظیم است. در غیر این صورت، این تنظیمات را وارد کنید

۳. انتخاب Threshold را به‌صورت اتوماتیک با فعال کردن گزینه‌ی Auto Set Threshold انجام دهید (شکل ۸).

شکل ۸. تنظیمات دستگاه

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

۵. در صورت وجود نويز 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، سیکل ابتدایی را نادیده گرفت.



شکل ۹. تنظیمات دستگاه

ارزیابی آنالیتیکال

حساسیت آنالیتیکال

با توجه به نتایج حاصله، حد پایین تشخیصی برای این کیت در تایپ های مختلف به شرح زیر است:

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

جدول ۵: حساسیت آنالیتیکال

اختصاصیت آنالیتیکال

به جهت بررسی اختصاصیت پرایمرها و پروب‌های محصول برای STD احتمال شناسایی غیراختصاصی دیگر عوامل عفونی مربوطه مورد بررسی قرار گرفته 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

جدول ۶: اختصاصیت آنالیتیکال

ارزیابی کلینیکال

حساسیت و اختصاصیت کلینیکال

برای تعیین حساسیت و اختصاصیت کلینیکال از ۱۰۰ نمونه مثبت و ۱۰۰ نمونه منفی استفاده شد که نتایج در جدول زیر نشان داده شده 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%

جدول ۷: حساسیت و اختصاصیت کلینیکال

پشتیبانی فنی

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

✓ ۰۹۹۳۶۶۹۳۹۴۱ (آقای قره داغی)

✓ ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

نشانه‌ها

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

شرکت فناوری بن یاخته- گروه سین مورو

دفتر مرکزی : تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار ۲۴ متری سعادت آباد، خیابان
حیدر نیا (دوم شرقی)، پلاک ۹، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی: ۱۹۹۷۷۷۵۵۵۵ تلفن تماس: ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

Web Site : www.Senmurv.co

Email : info@senmurv.ir