راهنمای کیت تشخیص
STD Kit (RUO-48 Test)
رادمان تشخیص پارس
REF:RTP062

❖ مقدمه

بیماری‌های مقاربتی Sexually Transmitted Diseases (STDs) ، که با نام عفونت های مقاربتی (STIs)[1] نیز شناخته می شوند بر سلامت جنسی و تولید مثل افراد تاثیر می گذارند. عوامل ایجادکننده‌ی عفونت‌های STD شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها هستند. برخی از این میکروارگانیسم‌ها پس از مدتی از بدن حذف می شوند، در حالی که بعضی دیگر عود کرده و برخی بدون ظهور علایم در بدن باقی می‌مانند. در صورت عدم درمان، برخی از بیماری های مقاربتی می توانند باعث ایجاد پیامدهایی مانند التهاب دستگاه تناسلی-ادراری، ناباروری و حتی سرطان می‌شوند.

کیت تشخیصی STD Panel تولیدی شرکت رادمان تشخیص پارس مبتنی بر تکنیک Real-Time PCR است که امکان تشخیص کیفی در DNA نمونه های بیولوژیک انسانی فراهم می‌کند:

پاتوژن های مورد شناسایی شامل کلامیدیا تراکوماتیس Chlamydia trachomatis، نایسریا گونوره Neisseria gonorrhoeae، مایکوپلاسما ژنیتالیوم Mycoplasma genitalium، تریکوموناس واژینالیس Trichomonas vaginalis، گاردنرلا واژینالیس Gardnerella vaginalis، اورهاپلاسما (اوره لیتیکوم/پاروم) (Ureaplasma /Ureaplasma parvum urealyticum) و هرپس سیمپلکس ویروس HSV 1 و ویروس هرپس سیمپلکس HSV 2 می باشد.

❖ حیطه کاربرد

کیت RTP STD Kit کیت تشخیصی جهت شناسایی، تعیین کیفی و تمایز کلامیدیا تراکوماتیس، نایسریا گونوره، مایکوپلاسما ژنیتالیوم، تریکوموناس واژینالیس، گاردنرلا واژینالیس، اورهاپلاسما اوره لیتیکوم/پاروم و هرپس سیمپلکس1 و2 بر اساس روش Real-Time PCR در نمونه های سواب ادرار، رکتوم و تناسلی انسان طراحی شده است.

[1] Sexually transmitted infections

Site : www.rtpmed.com
Email: info@rtpmed.com

❖ محتویات کیت

کیت حاوی معرف های تکثیر کننده برای 48 تست می باشد.

محتویات	توضیح محتویات	حجم
STD QL Master Mix	مخلوط PCR مستر میکس مورد نیاز برای	720µL x 2
STD QL Primer & Probe Mix 1	پرایمر پروب مخصوص شناسایی کلامیدیا تراکوماتیس، ژنیتالیوم گونوره، مایکوپلاسما نایسریا و ژن کنترل داخلی	120µL x 2
STD QL Primer & Probe Mix 2	پرایمر پروب مخصوص شناسایی و هرپس سیمپلکس1، و هرپس سیمپلکس2 و ژن کنترل داخلی	120µL x 2
STD QL Primer & Probe Mix 3	پرایمر پروب مخصوص شناسایی ، اورهاپلاسما اوره لیتیکوم/پاروم، گاردنرلا واژینالیس، تریکوموناس واژینالیس و ژن کنترل داخلی	120µL x 2
STD QL Positive Control (PC)	Positive Control	250 µL x 2
STD QL Negative Control (NTC)	Nuclease free Water	500 µL

جدول 1

❖ شرایط نگهداری کیت

- تمامی اجزای کیت می بایست در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری شوند. در صورت نگهداری در این شرایط تا زمان تاریخ انقضای مندرج بر روی ویال ها، کیت قابل استفاده می باشد.
- از ذوب و انجماد کردن مکرر اجزای کیت جدا خودداری نمایید. در صورت نیاز به استفاده مکرر، پیشنهاد می شود محلول ها را بسته به میزان مورد نیاز در هر بار استفاده در ویال های جداگانه در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری کنید. اینکار در حفظ کیفیت و حساسیت کیت نقش موثری دارد.
- نتایج کنترل کیفی نشان می دهد اجزای کیت قابلیت سه مرتبه متوالی ذوب و انجماد را دارند. از ذوب و انجماد محلول ها بیش از سه مرتبه جدا خودداری کنید.
- کلیه اجزای کیت تا تاریخ انقضا درج شده بر روی محصول پایدار می باشند و در نتیجه پس از گذشت تاریخ انقضا از این محصول استفاده نشود.

نتایج مطلوب و صحیح از طریق استفاده دقیق طبق دستورالعمل استفاده از کیت بدست می آید، هر گونه تخلف از این دستورالعمل می تواند منجر به بدست آمدن جواب های نامعتبر شود.

❖ **موارد مورد نیاز جهت انجام واکنش که در داخل کیت تعبیه نشده اند:**

- پیپت در اندازه های مختلف
- سمپلر و سر سمپلر فیلتر دار در سایز های مختلف
- ویال های میکروسانترفیوژ استریل در اندازه های 1/5 و 2 میلی لیتر
- هود لامینار
- دستگاه Real-Time PCR
- دستگاه ورتکس-اسپین
- کیت استخراج DNA
- ویال های مخصوص دستگاه PCR
- هات پلیت

❖ **دستگاه های سازگار با کیت RTP STD :**

کیت RTP STD قابل استفاده با انواع مختلف دستگاه Real-Time PCR روتوری و پیلیتی می باشند، در پایین به تعدادی از این دستگاه ها اشاره شده است :

1- Applied Biosystems™ 7500 series
2- Applied Biosystems™ QuantStudio® series
3- Rotor-Gene Q
4- Bio-Rad CFX96
5- MIC-Magnetics Induction Cycler

❖ **استخراج DNA**

جهت استخراج DNA می توان از انواع کیت های موجود در بازار استفاده نمود. لیکن پیشنهاد ما استفاده از کیت زیر است.

کمپانی سازنده	کیت پیشنهادی	نوع نمونه
رادمان تشخیص پارس	RTP Total Nucleic Acid Extraction	ادرار، رکتوم و سواب تناسلی

- با توجه به اهمیت نقش کیفیت و خلوص DNA استخراج شده در عملکرد کیت پیشنهاد می گردد، حتما پیش از آغاز ارزیابی موتاسیون، کیفیت و خلوص DNA با دستگاه اسپکتروفوتومتر سنجیده شود.
- میزان A260/A280 می بایست بین 1/7 تا 2/0 باشد، مقادیر کمتر این مقدار نشاندهنده وجود آلودگی پروتئینی است.

❖ مراحل انجام واکنش **Real-Time PCR**

- **آماده سازی واکنش برای نمونه ها**

سه ویال جداگانه باید برای یک نمونه واحد آماده شود.

ویال 1 شناسایی کننده ی : Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma genitalium

ویال 2 شناسایی کننده ی : Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2

ویال 3 شناسایی کننده ی: Ureaplasma/urealyticum/parvum,Gardnerella vaginalis, Trichomnas vaginalis

مخلوط واکنش را بر طبق جدول 2 آماده کنید.

نام معرف	ویال 1	ویال 2	ویال 3
Master Mix PCR	10 میکرولیتر	10 میکرولیتر	10 میکرولیتر
STD Primer probe mix-1	-	-	5 میکرولیتر
STD Primer probe mix-2	-	5 میکرولیتر	-
STD Primer probe mix-3	5 میکرولیتر	-	-

جدول 2

- 15 میکرولیتر از Mix Master PCR آماده شده فوق را در ویال های 0.2 PCR میلی لیتری انتقال دهید و درب آن را ببندید .
- برای 15 میکرولیتر از مخلوط واکنش بالا، تا 10 میکرولیتر DNA نمونه اضافه کنید.
- 10 میکرولیتر از کنترل مثبت ارائه شده را به لوله کنترل مثبت اضافه کنید و حجم نهایی ویال را به 25 میکرولیتر برسانید
- 10 میکرولیتر آب استریل را به لوله کنترل منفی اضافه کنید و حجم نهایی ویال را با آب استریل به 25 میکرولیتر برسانید.

❖ **نکات مهم در هنگام انجام فرآیند Real_Time PCR**

- تمام معرف ها را تا دمای محیط (25-15 درجه سانتیگراد) ذوب کنید.
- معرف ها را ورتکس نکنید، در عوض با ضربه ملایم محتوا را مخلوط کنید
- مخلوط واکنش آماده شده را ورتکس نکنید.
- تمام ویال های معرف را قبل از استفاده اسپین گردد.

❖ برنامه زمانی و دمایی دستگاه

مطابق جدول 3 پروفایل دمایی و زمانی دستگاه های ABI Quant Studio (Applied Biosystems), Rotor-Gene™ (QIAGEN), and CFX96™ (BIO-RAD) Realtime PCR Machine. را تنظیم کنید.

مرحله	دما به درجه سانتیگراد	زمان	خوانش فلورسنت	چرخه ها
1	94	10 دقیقه	-	1
2	94	15 ثانیه	-	7
	62	30 ثانیه	-	
	72	15 ثانیه	-	
3	94	15 ثانیه	-	35
	60	45 ثانیه	دارد	
	72	15 ثانیه	-	

جدول 3

مطابق جدول 4 پروفایل دمایی و زمانی دستگاه Magnetics Induction Cycler (MIC) را تنظیم کنید.

مرحله	دما به درجه سانتیگراد	زمان	خوانش فلورسنت	چرخه ها
1	94	10 دقیقه	-	1
2	94	15 ثانیه	-	7
	62	30 ثانیه	-	
	72	15 ثانیه	-	
3	94	15 ثانیه	-	32
	60	45 ثانیه	دارد	
	72	15 ثانیه	-	

جدول 4

کانال های دستگاه را مطابق جدول 5 انتخاب نمایید.

Tub no	Detection	Reporter	Quencher	Gain Setup
1	Chlamydia trachomatis	FAM/GREEN	None	Auto
	Neisseria gonorrhoeae	HEX/VIC/YELLOW	None	Auto
	Mycoplasma genitalium	Texas Red/ROX/ORANGE	None	Auto
	Endogenous Internal Control	Cy5/RED	None	Auto
2	Herpes simplex virus 1	FAM/GREEN	None	Auto
	Herpes simplex virus 1	HEX/VIC/YELLOW	None	Auto
	Endogenous Internal Control	Cy5/RED	None	Auto
3	Ureaplasma urealyticum/parvum	FAM/GREEN	None	Auto
	Gardnerella vaginalis	HEX/VIC/YELLOW	None	Auto
	Trichomonas vaginalis	Texas Red/ROX/ORANGE	None	Auto
	Endogenous Internal Control	Cy5/RED	None	Auto

جدول 5

❖ **تنظیمات نرم افزار دستگاه (تعیین Threshold)**

S.No.	Instrument	Threshold value range
1	Rotor-Gene Q	0.04-0.06
2	Applied Biosystems 7500	1.0e+004 – 2.0e+004
3	BioRad CFX 96	80-200
4	QuantStudio® 3 & 5	5000 - 40000
5	Magnetics Induction Cycler (MIC)	0.08-1.00

جدول 6

با توجه به اینکه تعیین Absolute threshold Value در هر ران واکنش، بسته به نوع دستگاه و مدل و کالیبراسیون متفاوت است، در صورتیکه دستگاه Time-Real مورد استفاده Applied Biosystem نمی باشد، خواهشمند است جهت تنظیم مناسب برای نخستین بار، با تیم پشتیبانی مولکولی شرکت رادمان تشخیص پارس تماس حاصل فرمایید.

❖ **تفسیر داده ها**

- واکنش های کنترل منفی برای مجموعه پرایمر- پروب های واکنش نباید منحنی تقویت فلورسانس را نشان دهند که از خط آستانه عبور کند. مشاهده هر گونه Ct در ویال NTC نشان دهنده ی آلودگی نمونه می تواند باشد.
- همه نمونه‌های بالینی باید منحنی‌های واکنش کنترل داخلی درون‌زا را نشان دهند که از خط آستانه در سیکل 28 یا قبل از آن در دستگاه های ABI Quant Studio (Applied Biosystems)، Rotor-Gene™ (QIAGEN) و CFX96™ (BIO-RAD) Real-time PCR عبور کرده اند. این امر نشان می دهد نمونه از کیفیت قابل قبولی برخوردار است. با این حال، این امکان وجود دارد که برخی از نمونه ها به دلایل زیر بعد از سیکل 28 از خط آستانه عبور کنند:
  - وجود بازدارنده هایی مانند اتانول یا نمک در نمونه استخراج شده
  - وجود بار میکروبی بالا در نمونه
  - اشتباهی در نحوه ی ست آپ واکنش رخ داده است

*در دستگاه Magnetics Induction Cycler (MIC) منحنی های واکنش کنترل داخلی درون زا که بایداز خط آستانه در سیکل 25 سیکل یا قبل از آن عبور کنند، این امر نشان دهنده کیفیت قابل قبولی برای نمونه می باشد.

❖ **آنالیز واکنش های مربوط به کنترل مثبت**

Tub no	Detection	Reporter	Value	Value for MIC PCR
1	Chlamydia trachomatis	FAM/GREEN	20±4	16±4
	Neisseria gonorrhoeae	HEX/VIC/YELLOW	20±4	16±4
	Mycoplasma genitalium	Texas Red/ROX/ORANGE	20±4	16±4
	Endogenous Internal Control	Cy5/RED	20±4	16±4
2	Herpes simplex virus 1	FAM/GREEN	20±4	16±4
	Herpes simplex virus 1	HEX/VIC/YELLOW	20±4	16±4
	Endogenous Internal Control	Cy5/RED	20±4	16±4
3	Ureaplasma urealyticum/parvum	FAM/GREEN	20±4	16±4
	Gardnerella vaginalis	HEX/VIC/YELLOW	20±4	16±4
	Trichomonas vaginalis	Texas Red/ROX/ORANGE	20±4	16±4
	Endogenous Internal Control	Cy5/RED	20±4	16±4

جدول 7

Cutoff: واکنش در 37 سیکل انجام می گیرد لیکن نباید هر گونه تکثیر پس از سیکل 32به عنوان نمونه ی مثبت در نظر گرفت بهمین دلیل Cutoff واکنش Ct 32 می باشد. در دستگاه Magnetics Induction Cycler (MIC) واکنش در 32 سیکل انجام می گیرد لیکن نباید هر گونه تکثیر پس از سیکل 28 به عنوان نمونه ی مثبت در نظر گرفت بهمین دلیل Cutoff واکنش Ct 28 می باشد.

هنگامی که همه کنترل های الزامات بیان شده بررسی گردید، تفسیرهای زیر را برای بررسی پاتوژن های STD دنبال کنید.

Tub no	Channel	Signal	STD Organism
1	FAM/GREEN	Present	Chlamydia trachomatis
	HEX/VIC/YELLOW	Present	Neisseria gonorrhoeae
	Texas Red/ROX/ORANGE	Present	Mycoplasma genitalium
	Cy5/RED	Present	Endogenous Internal Control
2	FAM/GREEN	Present	Herpes simplex virus 1
	HEX/VIC/YELLOW	Present	Herpes simplex virus 1
	Cy5/RED	Present	Endogenous Internal Control
3	FAM/GREEN	Present	Ureaplasma urealyticum/parvum
	HEX/VIC/YELLOW	Present	Gardnerella vaginalis
	Texas Red/ROX/ORANGE	Present	Trichomonas vaginalis
	Cy5/RED	Present	Endogenous Internal Control

جدول 8

❖ **ارزیابی عملکرد کیت**

- کمترین حد شناسایی (LOD) :

Tub no	STD Organism	LOD
1	Chlamydia trachomatis	$2X10^2$ IFU/ml
	Neisseria gonorrhoeae	$2.5X10^2$ CFU/ml
	Mycoplasma genitalium	$5X10^2$ copies/ml
2	Herpes simplex virus 1	$5X10^2$ copies/ml
	Herpes simplex virus 1	$5X10^2$ copies/ml
	Ureaplasma urealyticum/parvum	$1X10^3$ copies/ml

3	Gardnerella vaginalis	$1X10^3$ copies/ml
	Trichomonas vaginalis	$4X10^2$ copies/ml

جدول 9

- حساسیت بالینی: 97.47درصد
- اختصاصیت بالینی : 98.88 درصد

❖ **توصیه های لازم جهت رفع خطاهای احتمالی در Real-Time PCR**

راهکارهای احتمالی	دلایل احتمالی	خطای احتمالی
- تکرار واکنش با مواد جدید - پیپتاژ ویال کنترل مثبت در آخرین مرحله - ضدعفونی کردن محل انجام ازمایش و تمامی وسایل	- وقوع آلودگی در حین آماده سازی نمونه ها و یا در حین واکنش PCR	مشاهده تکثیر در نمونه ی کنترل منفی
- دقت در اضافه کردن تمامی مواد مورد نیاز در ویال - بررسی تمامی مراحل انجام کار بخصوص بررسی احتمال خطای سرسمپلر - درج نام نمونه ها روی تمامی ویال های 1/5ml میکروسانتریفیوژ و ویال PCR - بررسی شرایط نگهداری و تاریخ انقضای مندرج بر روی لیبل ویال کنترل مثبت و استفاده از ویال جدید - چک کردن پروفایل دمایی داده شده به دستگاه دستورالعمل داخل کیت	- درست کردن اشتباه مخلوط واکنش - عدم اضافه نمودن و یا اضافه کردن ناکافی کنترل مثبت - اضافه کردن اشتباه DNA نمونه در ویال کنترل مثبت - شرایط نگهداری نامناسب کنترل مثبت و یا استفاده از کنترل مثبت تاریخ مصرف گذشته - تنظیم اشتباه پروفایل دمایی و زمانی دستگاه	عدم مشاهده تکثیر در نمونه کنترل مثبت
- همانطور که هدف تکثیر ژن کنترل داخلی از منشاء انسانی می باشد، با استفاده از DNA کشت داده شده، تکثیر ژن انسانی مشاهده نخواهد شد. - بررسی مجدد شرایط نگهداری کیت - استفاده از نمونه ی تازه و استخرج مجدد نمونه با کیت های ذکر شده در دستورالعمل	- در صورت استفاده از نمونه کشت داده شده، هیچ گونه سیگنالی برای ژن کنترل داخلی وجود نخواهد داشت - ذوب و انجماد مواد بیش از حد نوشته شده در دستورالعمل و یا نگهداری در شرایط نامناسب - استفاده از DNA نمونه با کیفیت و خلوص پایین	عدم مشاهده سیگنال و یا سیگنال ضعیف در کانال مربوط به ژن کنترل داخلی

جدول 10

❖ **هشدار های عمومی و تخصصی لازم در استفاده از کیت**

- پیش از آغاز آزمایش از کالیبر بودن تمام تجهیزات اطمینان حاصل کنید.
- تمامی مواد را پیش از آغاز واکنش در دمای محیط ذوب و سپس کمی سانتریفوژ کنید.
- DNA نمونه استخراج شده را در دمای 20 - درجه سانتیگراد نگهداری نمایید و در حین انجام آزمایش بر روی کول رک[2] قرار دهید.
- پیش از آغاز، محل انجام آزمایش را با محلول ضدعفونی کننده مناسب، ضدعفونی نمایید.
- تمامی مراحل انجام آزمایش باید زیر هود لامینار، ورک استیشن استریل انجام گردد.
- با توجه به اهمیت تاثیر کاربر متخصص در عملکرد کیت و نتایج حاصل از آن، از افراد با سابقه، متخصص و آموزش دیده جهت انجام تست کمک بگیرید.
- از کیفیت جمع آوری نمونه و استخراج آن، پیش از آغاز آزمایش اطمینان حاصل نمایید
- تمامی نمونه ها باید به صورت بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند. پرسنل آزمایشگاه باید ملزومات پوشش حرفه ای و محافظ را رعایت کنند (شامل دستکش های یکبار مصرف، عینک محافظ، گان و یا روپوش آزمایشگاه). شستشوی دست ها قبل و بعد از شروع کار باید انجام شود. دستکش ها بعد از هر نمونه باید تعویض شوند تا از ایجاد آلودگی جلوگیری شود
- جهت تشخیص قطعی، نتایج حاصل از کیت می بایست همراه با سایر بررسی های بالینی مورد ارزیابی قرار گردد.
- پروسه آزمایش باید مطابق با پروتکل فوق انجام شود.
- این محصول بعد از گذشتن تاریخ مصرف نباید استفاده شود.

RTP
RADMAN TASHKHIS PARS
رادمان تشخیص پارس

[2] Cool rak