

راهنمای کیت مولکولی نسل جدید تشخیص بیماری‌های مقاربتی

نام محصول: GA STD9Plus RT-PCR Kit

شهریور ۱۴۰۱

کد محصول: GA-STD9P.50

IVD

معرفی

بیماری‌های مقاربتی یا منتقل شونده از طریق جنسی شامل دسته‌ای از عوامل بیماری‌زا مانند ویروس، باکتری و انگل می‌باشند که می‌توانند مشکلات بهداشتی فراوانی در سطح جامعه ایجاد کنند^۱

ویروس‌های هرپس سیمپلکس تیپ ۱ و تیپ ۲ از خانواده هرپس ویریده دارای ژنوم به صورت DNA دو رشته‌ای می‌باشد. انتقال عفونت از روش‌های مختلف صورت می‌گیرد ولی راه انتقال عمده آنها تماس نزدیک و رابطه جنسی می‌باشد.

بیماری تریکومونیاژیس به عنوان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مقاربتی شناخته می‌شود که توسط یک انگل کوچک تک سلولی تاژکدار به نام تریکوموناس واژینالیس انتقال می‌یابد.

بیماری واژینوز باکتریایی نیز یکی دیگر از انواع بیماری‌های مقاربتی نسبتاً شایع است که توسط باکتری بی‌هوازی اختیاری به نام گاردنلا واژینالیس منتقل می‌شود. کلامیدیا تراکوماتیس یک باکتری گرم منفی درون سلولی اجباری است که می‌تواند طیف وسیعی از عفونت‌های چشمی، تناسلی و مقعدی در مردان و زنان ایجاد کند و به عنوان عامل اصلی ابتلا به نابینایی عفونی شناخته می‌شود. نایسریا گونوره‌ا یک باکتری دیپلوکوک گرم منفی است که عامل بیماری گنوره یا سوزاک می‌باشد، این بیماری پس از کلامیدیا شایع‌ترین عفونت باکتریایی منتقله از راه جنسی است. همچنین مایکوپلازما ژنیتالایوم یک باکتری مقاربتی بیماری‌زا است که روی سلول‌های اپیتلیال مخاطی دستگاه ادراری تناسلی در انسان زندگی می‌کند. باکتری اوردها پلاسما اوردها لیتیکوم نیز می‌تواند باعث عفونت مجرای ادراری و واژن شود و باکتری اوردها پلاسما پارووم نیز نوعی باکتری کومنسال رحم می‌باشد که به عنوان بخشی از میکروبیوم در زنان سالم در سنین باروری است.^۲

کیت GA STD9Plus RT-PCR قادر است بصورت کیفی هر ۹ پاتوژن باکتریایی، انگلی و ویروسی نامبرده را به طور همزمان به روش TaqMan Real Time PCR در یک مرحله شناسایی و افتراق دهد. از داده‌های این کیت می‌توان به عنوان یک عامل کمک کننده در تشخیص استفاده کرد.

اساس تست

مخلوط پرایمر و پروب این کیت بصورت Nonuple بوده که ۹ ناحیه حفاظت شده از میکروارگانیسم‌های مایکوپلازما ژنیتالایوم، اوردها پلاسما اوردها لیتیکوم، اوردها پلاسما پارووم، تریکوموناس واژینالیس، گاردنلا واژینالیس، کلامیدیا تراکوماتیس، نایسریا گونوره‌ا، HSV1 و HSV2 را شناسایی می‌کنند. این نواحی توسط مخلوط واکنش موجود در کیت تکثیر شده و آزاد سازی سیگنال فلورسنس ایجاد شده، توسط دستگاه Real Time PCR مورد سنجش قرار می‌گیرد.

کنترل داخلی در این کیت شامل یک طراحی پرایمر و پروب اختصاصی برای ژن Microglobulin β₂ به صورت اندوژن می‌باشد که علاوه بر بررسی مراحل نمونه برداری و استخراج الگو، کیفیت قابل قبول DNA استخراج شده را مشخص کرده تا مانع از نتایج منفی کاذب شود.

محتویات کیت

این کیت حاوی موارد مورد نیاز آزمایش به فرمت ۵۰ تستی بوده که به شرح زیر می‌باشد:

ردیف	محتول	مقادیر	تعداد
۱	GA STD9Plus MasterMix T1	۲۵۰ میکرولیتر در هر ویال	۲ ویال ۲۵ تستی
۲	GA STD9Plus MasterMix T2	۲۵۰ میکرولیتر در هر ویال	۲ ویال ۲۵ تستی
۳	GA STD9Plus Positive Control	۱۰۰ میکرولیتر در هر ویال	۱ ویال
۴	GA STD9Plus Negative Control	۱۰۰ میکرولیتر در هر ویال	۱ ویال

شرایط نگهداری

- دمای نگهداری این کیت $2 \pm 5^{\circ}\text{C}$ می‌باشد.
- از فریز و دفریز شدن محلول‌های موجود در کیت تا حد امکان خودداری کنید.
- مدت زمان استفاده از محتویات این کیت تا ۱ سال بعد از زمان تولید می‌باشد، تاریخ انقضاء بر روی کیت درج شده است.

دستگاه‌های هماهنگ با کیت

این کیت قابلیت انجام در تمامی دستگاه‌های Real Time PCR دارای کانال‌های TEXAS RED, FAM, HEX و CY5 (نارنجی، سبز، زرد و قرمز) را دارد.

مشخصات نمونه

- نمونه مورد استفاده در این کیت شامل ادرار، سواب ژنیتال، سواب رکتال و سایر ترشحات نواحی ادراری-تناسلی می‌باشد.^۳
- شرایط نمونه‌گیری: جمع آوری نمونه‌ها بر اساس پروتکل استاندارد مطابق با نوع نمونه انجام شود.
- نگهداری و انتقال نمونه: نمونه‌های جمع آوری شده بلافاصله برای انجام آزمایش قابل استفاده هستند که باید در زمان ارسال به آزمایشگاه در محفظه بسته و در مجاورت یخ انتقال انجام شود. برای ذخیره طولانی مدت، بهتر است نمونه‌ها را بلافاصله پس از جمع آوری، در دمای فریزر -20 یا -70 درجه سانتیگراد نگهداری کرد.

آماده سازی الگو پیش از آزمایش

الگوی مورد نیاز برای انجام این تست DNA باکتریایی، انگلی و ویروسی بوده که می‌توان طبق پروتکل استاندارد کیت‌های معتبر استخراج مانند QIAamp cadior Pathogen Mini Kit و دیگر کیت‌های استخراج DNA باکتریایی، انگلی و ویروسی معتبر عمل کرد. الگو استخراج شده بصورت مستقیم قابل استفاده برای انجام آزمایش می‌باشد و در غیر این صورت الگو استخراج شده را در دمای 70°C نگهداری کنید. همچنین تا حد امکان از فریز و دفریز کردن مکرر نمونه خودداری کنید.

آماده سازی مخلوط واکنش

محتویات کیت را از داخل جعبه آن خارج کنید و اجازه دهید تا به دمای اتاق رسیده و کامل بصورت مایع درآیند. پس از رسیدن محلول‌ها به دمای اتاق، چند ثانیه ویال‌ها را اسپین کنید و سپس طبق موارد زیر عمل کرده و هر تیوب واکنش را آماده کنید:

- ابتدا به هر کدام از تیوب‌های واکنش اول ۱۰ میکرولیتر مخلوط واکنش GA STD9Plus Mastermix T1 (حاوی مواد مورد نیاز واکنش، پرایمر و پروب) اضافه کنید.
- سپس به هر کدام از تیوب‌های واکنش دوم ۱۰ میکرولیتر مخلوط واکنش GA STD9Plus Mastermix T2 (حاوی مواد مورد نیاز واکنش، پرایمر و پروب) اضافه کنید.

اضافه کردن الگو به مخلوط واکنش

۳. پس از آماده سازی مخلوط واکنش، مخلوط‌های حاصل را به منطقه تمیز انجام آزمایش منتقل کنید.

★ **تیوب نمونه‌های مجهول:** به هر کدام از تیوب‌های واکنش اول و دوم، ۱۰ میکرولیتر الگو اضافه کنید.

★ **تیوب کنترل منفی:** به هر کدام از تیوب‌های واکنش کنترل منفی، ۱۰ میکرولیتر از کنترل منفی اضافه کنید.

سپس درب تیوب‌های آماده شده در مرحله ۱ و ۲ را بسته و اسپین کنید (در صورت استفاده از دستگاه‌های Real Time PCR دارای روتور چرخان نیازی به اسپین کردن تیوب‌ها نمی‌باشد)

★ **تیوب کنترل مثبت:** در یک فضای دیگر و دور از محوطه آماده سازی سایر مخلوط‌های واکنش، به تیوب واکنش کنترل مثبت ۱۰ میکرولیتر از مخلوط کنترل مثبت موجود در کیت اضافه کنید.

میزان مورد نیاز برای هر تست	مواد مورد نیاز برای هر تست
۱۰ میکرولیتر در تیوب ۱	مخلوط واکنش GA STD9Plus MasterMix T1
۱۰ میکرولیتر در تیوب ۲	مخلوط واکنش GA STD9Plus MasterMix T2
۱۰ میکرولیتر	الگو (DNA، کنترل منفی یا کنترل مثبت)
۲۰ میکرولیتر	حجم نهایی واکنش

★ قابل ذکر است می‌توان در زمان استخراج الگو در آخرین مرحله استخراج، با دو برابر کردن حجم Elution بافر (از ۵۰ میکرولیتر به ۱۰۰ میکرولیتر) از میزان مهارکنندگی الگو کاسته تا واکنش با کیفیت بهتری انجام شود.

انجام واکنش RealTime PCR

۱. نام‌گذاری نمونه‌ها:

تیوب‌ها را داخل دستگاه Real Time PCR قرار داده و بعد از آن هر کدام از تیوب‌ها (نمونه های مجهول، کنترل مثبت و کنترل منفی) را نام‌گذاری کنید.

۲. انتخاب کانال سنجش:

★ در تیوب اول، کانال سبز یا FAM را برای تشخیص مایکوپلازما ژنیتالایوم، اوردها پلاسما پارووم و اوردها پلاسما اوردها لیتیکوم، کانال زرد یا HEX را برای تشخیص تریکوموناس واژینالیس و گاردنلا واژینالیس، کانال نارنجی یا TEXAS RED را برای تشخیص کلامیدیا تراکوماتیس، کانال قرمز یا CY5 را برای تشخیص نایسریا گونوره‌ا در دستگاه Real Time PCR انتخاب کنید.

★ در تیوب دوم، کانال سبز یا FAM را برای تشخیص HSV1، کانال زرد یا HEX را برای تشخیص HSV2 و کانال نارنجی یا TEXAS RED را برای تشخیص کنترل داخلی انتخاب کنید

۳. برنامه دمایی و زمانی واکنش مورد نظر مطابق با شرایط جدول زیر می‌باشد:

برنامه دمایی و زمانی استاندارد کیت GA STD9Plus RT-PCR Kit				
ترتیب واکنش	مرحله	دما	زمان	تعداد سیکل
۱	Holding	25°C	۵ دقیقه	۱
۲	Holding	95°C	۳ دقیقه	۱
۳	cycling	94°C	۵ ثانیه	۴۶ سیکل
		60°C	۳۰ ثانیه	

پس از ایجاد برنامه و تنظیمات جدید، فایل مورد نظر را ذخیره و شروع انجام واکنش را راه اندازی کنید.

پس از انجام و واکنش، نتایج ذخیره شده را مطابق با جدول زیر آنالیز کنید:

مراحل	حالت مورد نظر	رد یا قبول بودن واکنش
۱. مرحله اول: کنترل کیت و واکنش	بدون گراف تکثیر یا سیگنال سیگموتیدی یا میزان فلورسنس غیر قابل قبول در هر کدام از کانال‌ها	قبول - عدم آلودگی مخلوط واکنش
	داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq بالاتر از ۳۵ در هر کدام از کانال‌ها	قبول با یک شرط - در این حالت تنها نمونه‌های بیمارار دارای Cq با فاصله حداقلی ۹ سیکل از آلودگی در کانال مربوطه را می‌توان به عنوان نمونه‌های دارای ژنوم ویروس مورد قبول دانست.
	داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۳۵ در هر کدام از کانال‌ها	رد واکنش و تکرار دوباره واکنش بعد از حذف آلودگی - هر کدام از کانال ها با داشتن آلودگی Cq کمتر از ۳۵ قابل تفسیر نمی‌باشند.
۲. مرحله دوم: بررسی نتایج	دارای سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۳۵ در هر کدام از کانال‌ها	قبول - عملکرد صحیح پرایمر و پروب، مخلوط واکنش و عدم تخریب کنترل مثبت یا دیگر اعضا واکنش که نشان از نگهداری صحیح آن دارد.
	دارای سیگنال سیگموتیدی اما Cq بالاتر از ۳۵ در هر کدام از کانال‌ها	رد واکنش - تخریب کنترل مثبت یا یکی دیگر از اعضا واکنش که نشان از عدم نگهداری صحیح آن دارد. در صورت مثبت بودن نمونه های تحت بررسی می‌توانید از این عیب صرف نظر کنید.
	کانال FAM: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود باکتری‌های Mycoplasma genitalium ، Ureaplasma urealyticum یا Ureaplasma مثبت می‌باشد.	
۳. مرحله سوم: بررسی نمونه بیچال	کانال HEX: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود ویروس Trichomonas vaginalis یا Gardnerella vaginalis مثبت می‌باشد.	
	کانال TEXAS RED: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود باکتری Chlamydia trachomatis مثبت می‌باشد.	
	کانال CV5: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود باکتری Neisseria gonorrhoeae مثبت می‌باشد.	
	کانال FAM: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود ویروس Herpes Simplex Virus 1 مثبت می‌باشد.	
	کانال HEX: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود ویروس Herpes Simplex Virus 2 مثبت می‌باشد.	
تیوب دوم	کانال TEXAS RED: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۳۵ که نشان از نمونه گیری و استخراج ژنومی درست می باشد و در غیر اینصورت نمونه گیری و استخراج ژنومی تکرار شود.	

حد آستانه مثبت

با توجه به مطالعه مقدار مرجع، Cq مرجع برای ژن های مورد نظر تا مقدار ۴۰ با داشتن شرایط ذکر شده قابل قبول است.

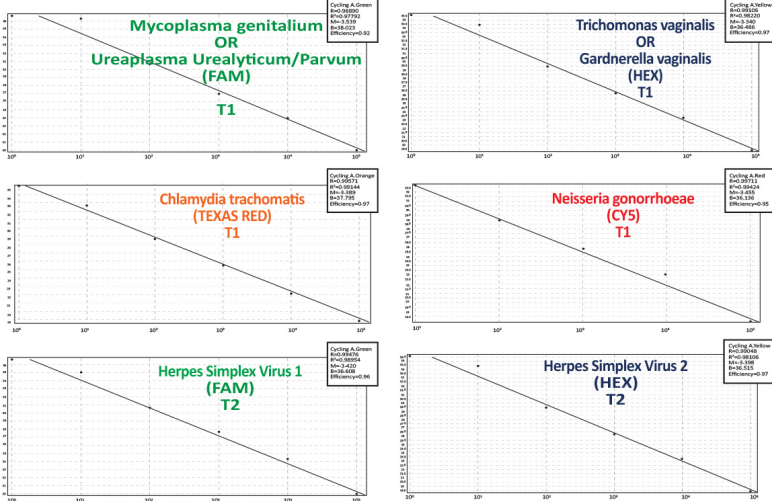
محدودیت های روش تشخیص

- زمان نمونه‌گیری و انجام نمونه‌گیری نامناسب، انتقال نادرست، پردازش نامناسب نمونه، شرایط بد نگهداری کیت، عدم انجام صحیح واکنش توسط کاربر می‌تواند باعث ایجاد نتایج منفی کاذب شود.
- آلودگی نمونه‌ها به بعضی مواد یا داروهای خاص و یا آلودگی در حین پردازش نمونه می‌تواند باعث ایجاد نتایج منفی کاذب شود.
- امکان ایجاد جهش و تغییرات توالی در میکروارگانیسم‌های هدف می‌تواند یکی از دلایل ایجاد نتایج منفی کاذب شود.
- آزمایش باید طبق پروتکل سازنده کیت و در شرایط Good Laboratory Practice انجام شود.

عملکرد و ارزیابی محصول

پرایمر و پروب‌های این کیت براساس توالی ژنی اختصاصی میکروارگانیسم‌های مایکوپلازما ژنیتالیم، اوره پلاسما اوره لیتیکوم، اوره پلاسما پارووم، تریکوموناس واژینالیس، گاردنلا واژینالیس، کلامیدیا تراکوماتیس و نایسریا گونوره، HSV1 و HSV2 طراحی شده است. همچنین طراحی انجام شده هیچ واکنش متقاطع با دیگر توالی‌های ژنومی انسانی، انگلی، ویروسی و باکتریایی در تست in silico از خود نشان نداده است.

جدول نمونه ارزیابی بالینی کیت GA STD9Plus RT-PCR Kit		
نوع نمونه	نتیجه با کیت تجاری کمپانی X به روش Onestep RT-PCR	نتیجه با کیت GA STD9Plus RT-PCR
نمونه منفی از نظر میکروارگانیسم های مایکوپلازما ژنیتالیم، اوره پلاسما اوره لیتیکوم، اوره پلاسما پارووم، تریکوموناس واژینالیس، گاردنلا واژینالیس، کلامیدیا تراکوماتیس، نایسریا گونوره، HSV1 و HSV2	۱۰۰ نمونه منفی	۱۰۰ نمونه منفی
نمونه مثبت از نظر میکروارگانیسم‌های مایکوپلازما ژنیتالیم، اوره پلاسما اوره لیتیکوم، اوره پلاسما پارووم، تریکوموناس واژینالیس، گاردنلا واژینالیس، کلامیدیا تراکوماتیس، نایسریا گونوره، HSV1 و HSV2	۴۰ نمونه مثبت	۴۰ نمونه مثبت



منحنی استاندارد پرایمر و پروب‌های کیت GA STD9Plus RT-PCR در کانال‌های جداگانه تیوب اول و دوم

کمترین حد تشخیص (LOD) میکروارگانیسم‌های مایکوپلازما ژنیتالیم، اوره پلاسما اوره لیتیکوم، اوره پلاسما پارووم، تریکوموناس واژینالیس، گاردنلا واژینالیس، کلامیدیا تراکوماتیس، نایسریا گونوره، HSV1 و HSV2 برابر با ۴۰۰ کپی می‌باشد که دارای حساسیت بالای ۹۸ درصد در تکرار ۲۰ تایی با حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر است. رنج دینامیک و رنج خطی کیت موجود برابر با ۱۰^۱ تا ۱۰^{۱۰} می‌باشد. عرض از مبدا واکنش (میزان Cq قابل قبول در کمترین کپی) در سیکل ۴۰ بوده و ضریب همبستگی واکنش (R^۲) یا میزان تطابق با منحنی استاندارد در حدود ۰.۹۹ درصد می‌باشد. همچنین بازده واکنش در ۴ ژن برابر با ۹۳ تا ۹۸ درصد است.

خطرات و پیشگیری

- لطفا پیش از استفاده راهنمای کیت را با دقت مطالعه کنید. پرسنل آزمایشگاه باید آموزش دیده و آشنایی کامل با روند و خطرات دستگاه‌ها را داشته باشند. تمام وسایل و امکانات باید پیش از استفاده استریل بوده و جابه جایی وسایل بین بخش‌های مختلف PCR صورت نگیرد. در واقع هر بخش باید وسایل و مواد مختص به خود را داشته باشد. به همراه این کیت، لوازم نمونه‌گیری، نگهداری نمونه و استخراج ژنوم وجود ندارد و در زمان انجام تست توصیه می‌شود از تیپ‌های فیلتردار استفاده شود.
- این کیت تنها قابلیت استفاده در شرایط آزمایشگاهی را دارد و کاربرد دیگری برای آن تعریف نشده است. همچنین کنترل کیفی برای هر آزمایش انجام شود.
- مدیریت آزمایشگاه طبق دستورالعمل‌های آزمایشگاه‌های مولکولی انجام گیرد. تمام نمونه‌ها باید به صورت بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند و باید در یک فضا یا هود با کلاس ایمنی زیستی سطح II مورد پردازش قرار گیرد. پرسنل تمامی تمهیدات لازم مانند تجهیزات حفاظت شخصی (PPE) که شامل استفاده از دستکش‌های یکبار مصرف، عینک، گان یا روپوش آزمایشگاهی می‌شود را رعایت کنند. به همراه این کیت لوازم محافظتی شخصی مورد نیاز وجود ندارد و لازم است قبل از استفاده تهیه شود.
- پرسنل در طی انجام مراحل استخراج یا آماده‌سازی مخلوط واکنش، دستکش‌های خود را بین هر مرحله باید مرتب تعویض کنند تا از ایجاد آلودگی‌های کاذب کننده در روند آزمایش جلوگیری کند. مراحل کار باید طبق شرایط استاندارد آزمایشگاه در پیشگیری از ایجاد آلودگی و عفونت انجام گیرد. همچنین شرایط دفع زباله‌های عفونی این تست به مانند دیگر عوامل بیماری‌زا می‌باشد.
- شرایط نگهداری این کیت به مدت ۷ روز در دمای یخچال یا در پک‌های یخی می‌باشد که برای نگهداری طولانی مدت و حفظ نیمه عمر محصول آن را در دمای ۲۰- °C قرار دهید.

- Muldrew, K.L. (2018). Molecular Diagnostics of Sexually Transmitted Diseases: Bacterial, Trichomonas, and Herpes Simplex Virus Infections. In: Tang, Y.W., Stratton, C. (eds) Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/9_95111-319-3-978/.
- Park, Hye-Jee, et al. "Trend Analysis of the Profiles of 12 Sexually Transmitted Disease Pathogens in the Republic of Korea in 2019." INQUIRY: The Journal of Health Care Organization, Provision, and Financing 58 (2021): 00469580211065684.
- Yassin R, Hanna J, El Bikaïr, Mohtar J, El ChaarM (2022) Comparison of two commercial multiplex PCR assays for the detection of sexually transmitted infections. Journal of infection in developing countries 16:333338-. doi: 10.3855/jidc.15279

mabna Gene
مبنا ژن پارس
مشاور، راه اندازی، تجهیز
و تامین کتبه اقلیم بخش مولکولی

تهران، اشرفی اصفهانی، جنب درمانگاه بهرام، ساختمان شماره ۵۴، طبقه دوم واحد ۴، تلفکس: ۴۴۰۰۱۵۸-۶

- Do not use after the year, month and date mentioned
- Upper limit of temperature
- Read instructions before use
- IVD in vitro diagnostic
- Manufacturer
- Keep away from sunlight
- Catalogue number
- Sufficient for
- Do not re-use
- Temperature limit
- Batch code
- Manufacturing code