راهنمای کیت

STI-3 RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۱/۰

جهت تشخیص DNA باکتری های کلامیدیا تراکوماتیس، نایسریا گونوره‌آ
و مایکوپلاسما ژنیتالیوم
به روش Multiplex Real-Time PCR
جهت کار با دستگاه Rotor-Gene
مخصوص تحقیقات

Σ 24 (Cat#STI3RQ24)
Σ 48 (Cat#STI3RQ48)
Σ 96 (Cat#STI3RQ96)
NG-WI-ASL-62-100

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا
تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱. مقدمه ۳
۲. حیطه کاربرد ۳
۳. اطلاعات زمینه ای ۳
۴. اساس آزمایش ۴
۵. محتویات کیت ۴
۶. مدل های بسته بندی ۵
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت ۵
۸. محدودیت کاربرد ۵
۹. سایر موارد مورد نیاز ۶
۱۰. احتیاط و نکات لازم ۶
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن ۷
۱۲. کنترل داخلی ۷
۱۳. استخراج DNA ۸
۱۴. دستورکار PCR و مراحل آزمایش ۹
۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها ۹
۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene ۹
۱۷. تنظیم سایر دستگاه ها ۱۲
۱۸. تحلیل نتایج Rotor-Gene ۱۲
۱۹. میزان حساسیت ۱۶

۲۰. روش امحاء..... ۱۷
۲۱. پشتیبانی فنی..... ۱۷
۲۲. اطلاعات تماس..... ۱۷
۲۳. منابع..... ۱۷
۲۴. توضیحات برچسب..... ۱۸

۱. مقدمه

کیت STI-3 RQ جهت تشخیص DNA سه باکتری کلامیدیا تراکوماتیس (Chlamydia trachomatis)، نایسریا گونوره‌آ (Neisseria gonorrhoeae) و مایکوپلاسما ژنیتالیوم (Mycoplasma genitalium) به روش Real-time PCR طراحی شده است. در این روش، DNA هر باکتری به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین میکس این کیت حاوی سری ثانویه ای از پرایمرها و پروب جهت شناسایی یک توالی سنتتیک به عنوان کنترل داخلی می‌باشد. کنترل داخلی از گزارش منفی کاذب ناشی از استخراج نامناسب و یا مهار PCR جلوگیری می‌کند. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

۲. حیطه کاربرد

کیت حاضر امکان بررسی نمونه بیمار، جهت تشخیص سه باکتری کلامیدیا تراکوماتیس (Chlamydia trachomatis)، نایسریا گونوره‌آ (Neisseria gonorrhoeae) و مایکوپلاسما ژنیتالیوم (Mycoplasma genitalium) را به روش Multiplex Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

عفونت‌های مقاربتی (STI ,Sexually Transmitted Infection) یکی از عمده ترین مشکلات بهداشت عمومی در سراسر جهان می‌باشند. این عفونت ها می‌توانند توسط عوامل مختلفی مانند باکتری ها، ویروس ها و انگل ها ایجاد شوند. سه نمونه از شایع ترین باکتری هایی که از راه تماس جنسی منتقل می‌شوند شامل باکتری های کلامیدیا تراکوماتیس (Chlamydia trachomatis)، نایسریا گونوره‌آ

(Neisseria gonorrhoeae) و مایکوپلاسما ژنیتالیوم (Mycoplasma genitalium) می‌شوند. افراد مبتلا به این عفونت ها ، علائم مختلفی از خود نشان می‌دهند البته در بسیاری از موارد علایم خاصی ظاهر نمی‌شود. تشخیص دیرهنگام این عفونت‌ها سبب تاخیر در درمان شده که منجر به عوارض جدی و گاها دائمی در وضعیت سلامت فرد می‌شود. از جمله این عوارض می‌توان به بیماری‌های التهابی لگنی (pelvic inflammatory) وهمچنین ناباروری اشاره کرد.

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی عامل عفونی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction/PCR انجام می‌شود. طی این واکنش بخشی از ژنوم عامل عفونی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می‌شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب‌های فلورسنت قابل تشخیص می‌گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می‌توان وجود عامل عفونی را در نمونه تشخیص داد، بدون آنکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول واکنش با روش‌هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز برطرف می‌شود.

۵. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، فلش کارت و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
STI Mix A	میکس PCR* برای تشخیص Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium, Neisseria gonorrhoeae	۳۶۰ میکرولیتر

STI-3 Pos Ctrl	شاهد مثبت	۱۵۰ میکرولیتر
Internal Ctrl	کنترل داخلی*	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

*۱، ۲، ۴ عدد، به ترتیب برای کیت‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست وچهار، چهل و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می باشد.

۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰- درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه ای و آموزش دیده طراحی شده است.
- تمامی مراحل کار بایستی مطابق دفترچه راهنمای کامل کیت انجام شود و هرگونه تغییری در آن منجر به بروز خطا در نتایج می‌گردد.
- از محتویات کیت نباید پس از گذشت تاریخ انقضای درج شده روی کیت استفاده نمود.

- در صورت تغییر رنگ لیبل حرارتی (به صورتی یا قرمز) حتی به صورت جزئی کیت نباید مورد استفاده قرار گیرد.
- این کیت تنها برای مصارف تحقیقاتی طراحی شده و برای تشخیص طبی (IVD) مورد تایید نمی‌باشد.

۹. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA
- تیوب ۱/۵ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۱۰. احتیاط و نکات لازم

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای انتقال میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش

(برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود داشته باشند به ویژه سمپلر. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.

- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- پیش از باز کردن درپوش تیوب های کیت، آن ها را روی یخ خرد شده نگهداری کنید تا کاملاً ذوب شود. سپس با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر تیوب اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانترفیوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ‌های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارآیی آنها می‌شود.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش، نمونه ادرار (نمونه از اولین تخلیه صبحگاهی)، سواب واژینال یا دهانه رحم و سواب از مجاری ادراری مردان می‌باشد.
نمونه در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد برای چند ساعت قابل نگهداری است و برای زمان های طولانی تر می باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر یا پائین تر نگهداری شود. در چنین شرایطی نمونه تا چندین روز پایدار می‌ماند.

۱۲. کنترل داخلی

برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار PCR و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، این کیت حاوی کنترل داخلی می‌باشد.

کنترل داخلی را می‌توانید در مرحله استخراج استفاده نموده یا آن را صرفاً در مرحله PCR به STI Mix A اضافه نمایید. در حالت اول، کنترل داخلی علاوه بر بررسی مهار واکنش، نشانگر کیفیت استخراج نیز می‌باشد. برای استفاده در مرحله استخراج، کنترل داخلی را پس از افزودن بافر lysis به نمونه، اضافه کنید. میزان مورد نیاز از کنترل داخلی ده درصد حجم حلال نهایی (elution buffer) می‌باشد. یعنی در صورتی که DNA را نهایتاً در ۱۰۰ میکرولیتر بافر حل می‌کنید، ۱۰ میکرولیتر از کنترل داخلی را به مخلوط نمونه و بافر Lysis اضافه نمایید. توجه داشته باشید که کنترل داخلی نباید مستقیماً به نمونه بیمار (یعنی پیش از افزودن بافر lysis) اضافه شود، زیرا کارآیی خود را از دست خواهد داد.

در صورتی که کنترل داخلی را به STI Mix A اضافه می‌نمایید، تنها می‌توانید مهار واکنش PCR را بررسی کنید. به این منظور به ازای هر واکنش PCR، یک میکرولیتر از کنترل داخلی را STI Mix A اضافه نمایید. به طور مثال برای ۱۰ واکنش به ۱۵۰ میکرولیتر از میکس، ۱۰ میکرولیتر کنترل داخلی اضافه کنید و مخلوط حاصل را مطابق توضیحات بخش ۱۵ استفاده نمایید.

در صورت موفق بودن واکنش، کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۷ تا ۳۲ می‌شود.

۱۳. استخراج DNA

برای استخراج DNA باکتری از نمونه از روش ها و کیت های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می‌کنیم:

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat# 51104, Qiagen, Germany)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)

۱۴. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی تیوب های کیت را روی یخ خرد شده قرار دهید تا به طور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آن ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید. به تعداد مورد نیاز میکروتیوب PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه‌های مورد آزمایش، یک میکروتیوب برای شاهد مثبت و یک میکروتیوب برای کنترل منفی (آب) نیز در نظر بگیرید.

در صورتی که کنترل داخلی را در حین استخراج وارد کرده اید، به هر لوله مستقیماً ۱۵ میکرولیتر از STI Mix A اضافه کنید.

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به STI Mix A اضافه نمایید، با توجه به توضیحات قسمت ۱۲، آن را به میکس افزوده و ۱۵ میکرولیتر از مخلوط حاصل را به هر لوله منتقل کنید.

در پایان ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده، کنترل مثبت یا آب به هر لوله اضافه کنید.

درپوش میکروتیوب ها را بگذارید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید. توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت STI-3 RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene طراحی شده است.

۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

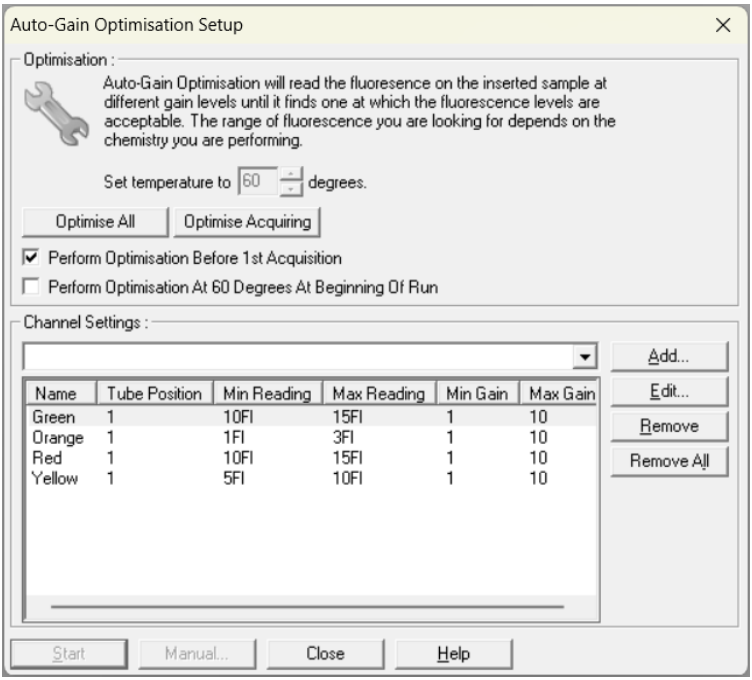
دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر متصل کرده و سپس آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

فایل تمپلیت STI-3 را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل STI-0.2 3 یا 0.1 STI-3 را با توجه به نوع لوله استفاده شده انتخاب کنید.

نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منوی نرم افزار، گزینه View، سپس Gain Optimisation را انتخاب کنید. در پنجره باز شده در Auto-Gain Optimisation Setup ابتدا گزینه Optimise Acquiring را بزنید. تنظیمات را دقیقا مطابق تصویر صفحه بعد برای هر دو کانال انجام دهید.

Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس STI-3 باشد).

گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را فعال کنید و پنجره را ببندید.



سپس در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای شاهدها Positive Control و برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۷. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های Real-Time PCR استفاده می‌کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید.

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ‌های FAM، VIC، ROX و Cy5 تنظیم شود.

توجه داشته باشید که در این آزمایش *ROX* نباید به عنوان رنگ مرجع *(reference dye)* انتخاب شود.

۱۸. تحلیل نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. سپس آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. فرایند فوق را برای سایر کانال های Yellow و Red و Orange نیز تکرار کنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدهای مثبت و منفی و کنترل داخلی تصاویر ۱، ۲، ۳ و ۴ را ملاحظه فرمایید. توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **Chlamydia trachomatis** و افزایش **تابش نارنجی(Orange)** حاصل از **Mycoplasma genitalium** و افزایش **تابش قرمز (Red)** مربوط به **Neisseria gonorrhoeae** و **تابش زرد (Yellow)** مربوط به **کنترل داخلی** می‌باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر

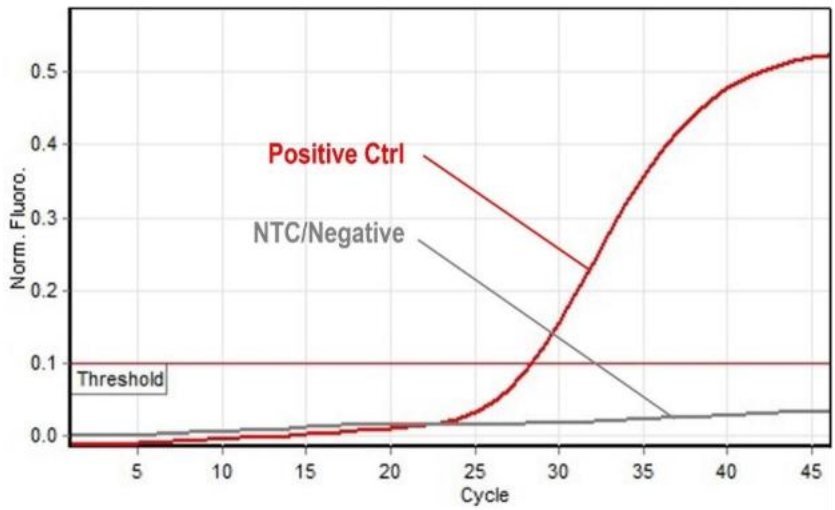
بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می‌باشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

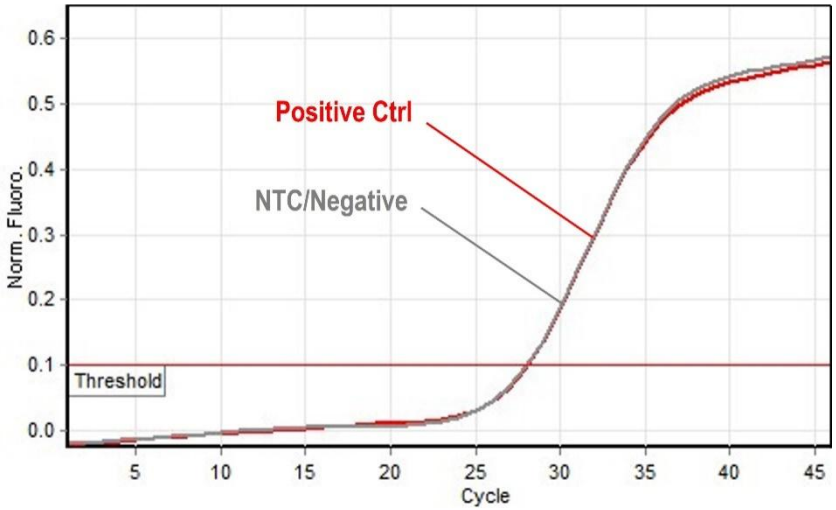
- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** مثبت با CT کمتر از ۴۰ و در کانال زرد مثبت با CT بین ۲۷ تا ۳۲ باشد، از نظر **Chlamydia trachomatis** **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **نارنجی** مثبت با CT کمتر از ۴۰ و در کانال زرد مثبت با CT بین ۲۷ تا ۳۲ باشد، از نظر **Mycoplasma genitalium** **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **قرمز** مثبت با CT کمتر از ۴۰ و در کانال زرد مثبت با CT بین ۲۷ تا ۳۲ باشد، از نظر **Neisseria gonorrhoeae** **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** و **نارنجی** و **قرمز** منفی و در کانال **زرد** مثبت با CT بین ۲۷ تا ۳۲ باشد، نمونه از نظر وجود هر سه باکتری منفی است.
- در صورتی که نمونه در کانال **زرد** منفی باشد بدون توجه به نتیجه در سه کانال **سبز** ، **نارنجی** ، **قرمز**، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

خلاصه تفسیر نتایج آزمایش در جدول ۱ زیر آمده است.

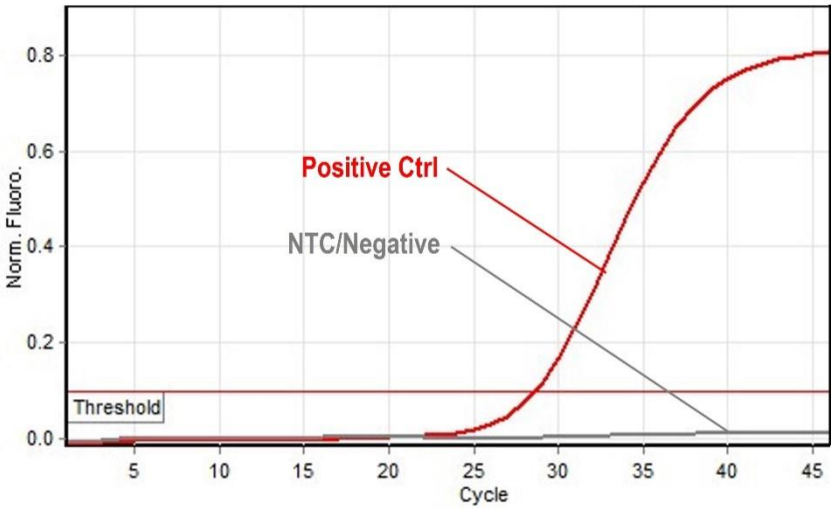
Green	Yellow	Red	Orange	Result
+	+	-	-	Pos for Chlamydia trachomatis
-	+	-	+	Pos for Mycoplasma genitalium
-	+	+	-	Pos for Neisseria gonorrhoeae
-	+	-	-	Negative
- / +	-	- / +	-/ +	Inconclusive



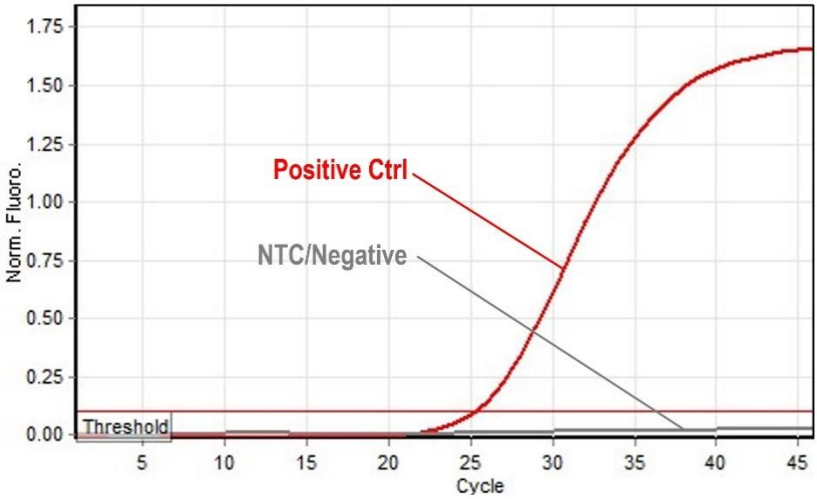
شکل ۱. منحنی شاهدها در کانال سبز دستگاه روتورژن (کلامیدیا تراکوماتیس)



شکل ۲. منحنی شاهدها در کانال زرد دستگاه روتورژن (کنترل داخلی)



شکل ۳. منحنی شاهدها در کانال قرمز دستگاه روتورژن (نایسریا گونورهآ)



شکل ۴. منحنی شاهدها در کانال نارنجی دستگاه روتورژن (مایکوپلاسما ژنیتالیوم)

۱۹. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم بررسی شده است. برای کلامیدیا تراکوماتیس معادل ۲/۸ کپی در میکرولیتر می‌باشد و برای نایسریا گونوره‌آ معادل ۳/۸ کپی در میکرولیتر و برای مایکوپلاسما ژنیتالیوم معادل ۴ کپی در میکرولیتر می‌باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتر باکتری در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیتر نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

۲۰. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیک یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیما به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه های عفونی آزمایشگاه را در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت حداقل یک شبانه روز قرار دهید و سپس آنها را به سطل زباله منتقل کنید.

۲۱. پشتیبانی فنی

برای ارتباط با بخش پشتیبانی فنی می‌توانید با شماره تلفن یا آدرس ایمیل زیر تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

۲۲. اطلاعات تماس

شرکت نوین ژن پارس ویرا

آدرس: تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

تلفن تماس: ۸۸۸۳۷۳۹۳-۲۱

۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com

وبسایت: www.novingene.ir

۲۳. منابع

- Buder, S., Schöfer, H., Meyer, T., Bremer, V., Kohl, P.K., Skaletz-Rorowski, A. and Brockmeyer, N. (2019). Bacterial sexually transmitted infections. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 17(3), pp.287–315.

- CDC (2023). STI Treatment Guidelines. [online] Centers for Disease Control and Prevention. Available at: https://cdc.gov/std/treatment-guidelines/default.htm [Accessed 21 May 2024].
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Mahon, C.R. and Lehman, D.C. (2023). Textbook of Diagnostic Microbiology - E-Book. Elsevier Health Sciences.

۲۴. توضیحات برچسب

RUO	جهت مصارف پژوهشی		تولید کننده		دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید
LOT	کدبهر (شماره بچ)	Σ	تعداد <n> آزمون کافی		تاریخ انقضاء
REF	شماره کاتالوگ	SN	شماره سریال	-10°C -30°C	محدوده دمایی

برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.ir مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.

STI-3 RQ Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.0

For Real-Time PCR Detection of Chlamydia trachomatis,
Neisseria gonorrhoeae, and Mycoplasma genitalium
For use with Rotor-Gene
For Research use only

Σ 24 (Cat#STI3RQ24)
Σ 48 (Cat#STI3RQ48)
Σ 96 (Cat#STI3RQ96)
NG-WI-ASL-62-100

RUO

NovinGene ParsVira
No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

Novin Gene

Table of Contents

1. Introduction 3
2. Intended Use 3
3. Background Information 3
4. Test Principle 4
5. Kit Contents 4
6. Packaging models 4
7. Storage and Stability 4
8. Product Use Limitations 5
9. Additionally Required Materials 5
10. General Precautions 5
11. Specimen, Storage and Transport 6
12. Internal Control (IC) 6
13. DNA Isolation 7
14. PCR Protocol 7
15. Devices and software 8
16. Programming of the Rotor-Gene 8
17. Programming Other Machines 9
18. Data Analysis: Rotor-Gene 10
19. Sensitivity 13

20. Disposal Method 13
21. Technical Support 14
22. Contact Information 14
23. References 14
24. Symbols 15

1. Introduction

STI-3 RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting DNA of the following bacteria: Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and Mycoplasma genitalium. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit. This Mix also contains a different series of primers and probe for detecting a synthetic DNA sequence. The kit supplies this synthetic DNA sequence as an Internal Control (IC). The IC can be used either during DNA extraction or in the PCR reaction to prevent false negative results due to failure in the above steps.
This kit is intended for Research Use Only!

2. Intended Use

STI-3 RQ kit is intended for detecting DNA of following bacteria, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and Mycoplasma genitalium. Detection is achieved using Multiplex Real-Time PCR system with Rotor-Gene machine.

3. Background Information

Sexually Transmitted Infections (STIs) represent a significant global public health concern. They can be caused by bacteria, viruses or parasites. Most common bacteria transmitted through sexual contact including; Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and Mycoplasma genitalium. Infected persons may exhibit various symptoms, although in many cases infected person may remain asymptomatic. Delayed diagnosis and treatment may lead to serious and sometimes permanent health complications such as pelvic inflammatory diseases and infertility.

4. Test Principle

The pathogen is detected using PCR, where primers specific to the target genome amplify its unique sequence. Real-Time PCR facilitates the detection of the amplified product through fluorescent-labeled probes. Therefore, monitoring fluorescence provides a means for detecting the target without requiring post-amplification analysis. This eliminates the possibility of PCR product contamination.

5. Kit Contents

The kit contains a manual, a flash card and the following reagents:

Label	Content	Quantity
STI Mix A	PCR Master mix* for Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and Mycoplasma genitalium	360 µl
STI-3 Pos Ctrl	Positive Control	150 µl
Internal Ctrl	Internal Control*	250 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits respectively.

6. Packaging models

The kit is available in 24, 48, and 96 reactions of 25 microliters.

7. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiration date mentioned. Avoid repeated freeze-thaw more than three times to prevent reduced sensitivity.

8. Product Use Limitations

- This kit is intended to be used only by specially instructed and trained personnel.
- The user manual should be strictly followed, and any modification will invalidate the results.
- The kit and its contents should not be used past the expiration date on the package.
- The kit and its contents should not be used if there is any sign of pink or red color on the Warm Mark label.
- This kit is for Research use only and is not validated for IVD (in vitro diagnostics) applications.

9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease-free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

10. General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- Treat all samples as potentially infectious.
- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent

preparation where the PCR mix is aliquoted into tubes, and c) Reaction preparation area for addition of extracted DNA to the tubes.

- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw on ice kit components completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Keep PCR Mix tube at -20°C at all times. Take it out just before use and return it to freezer immediately after.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cold block instead.

11. Specimen, Storage and Transport

Proper samples to test is urine (20ml of voided urine), cytobrush, swabs include: vaginal, cervical and male urethral. Samples can be stored at 2-8°C for a few hours or at -20°C or lower for a few months.

12. Internal Control (IC)

To assess the possibility of DNA extraction failure and PCR inhibition, and to prevent false negative results, the STI-3 RQ kit contains an internal control (IC). This IC can be used during the extraction process or added directly to the STI Mix A. To monitor both DNA extraction and PCR reaction, the IC should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample during extraction. The required volume of IC is 10% of the elution buffer. For instance, if the extracted DNA is eluted with 100ul, then 10ul of IC should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample.

Please note that the IC should not be added directly to the patient sample (i.e, before the addition of lysis buffer) as it loses its efficiency.

If the IC is added to STI Mix A, only PCR inhibition can be monitored. For this purpose, 1ul of the IC should be added to each reaction. For example, for 10 PCR reactions, 10ul of the IC should be added to 150ul of the STI Mix A before it is added to the tubes. In a successful DNA extraction and PCR test, the IC should generate a CT of 27-32 in the Yellow/VIC Channel.

13. DNA Isolation

DNA isolation from bacteria can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend the following:

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat# 51104, Qiagen, Germany)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)

14. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely, followed by a brief mixing and a quick spin. Place the required number of tubes on a cold block. Consider one tube for each sample, plus one for positive sample and one for water.

If IC is introduced during the extraction process, pipette 15µl of the STI Mix A Mix to each PCR tube.

If the IC is added to the STI Mix A Mix, add 15ul of the prepared mix (as described in section 12) to each PCR tube.

Then add 10ul of isolated DNA, Pos Ctrl, or water to each tube.

Cap the tubes and visually inspect to ensure all are caped securely. Place the tubes in the machine.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

15. Devices and software

STI-3 RQ kit is designed to work with Rotor-Gene.

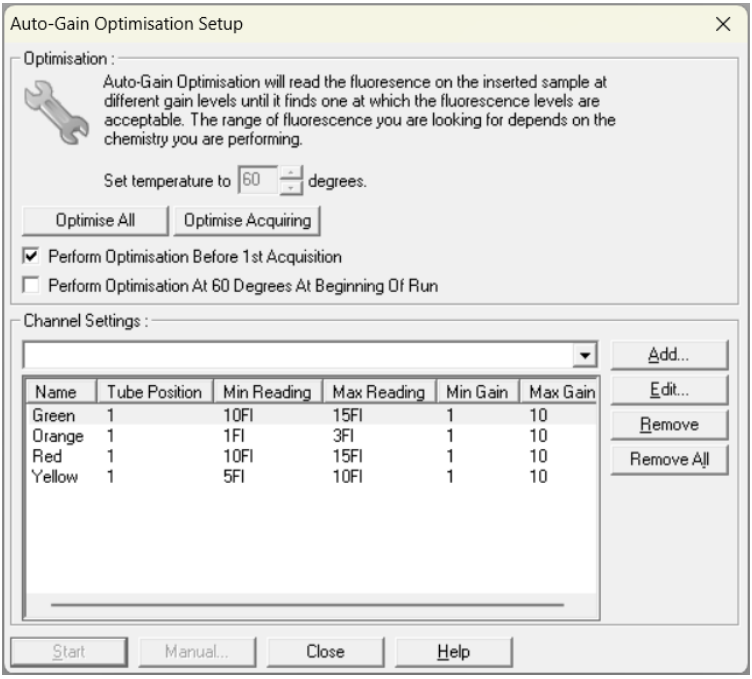
16. Programming of the Rotor-Gene

Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the STI-3 template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); STI-3 0.1 is for strip tubes and STI-3 0.2 is for 0.2ml tubes. Program starts.

Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation. Adjust the setting according to the following image.

Make sure to set the Tube Position to number 1 for all channels (note that Tube number 1 should contain STI-3 Mix).



Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the file to start the machine.

17. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table (please note that following program is not applicable to Rotor-Gene):

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM, VIC, ROX and Cy5 dyes.

Note! ROX should not be selected as reference dye in this test.

18. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure that in the sample menu, the Positive controls have been defined as “Positive control”. Patient samples are defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively.

To analyze data briefly, click on the Analysis menu and then under Quantitation tab double click on Cycling A. Green. Manually put threshold, at 0.1. Repeat the above for Yellow, Red and Orange Channels.

Figures 1, 2, 3 and 4 represent typical graphs for Rotor-Gene. To interpret the results, please note that:

A Signal in the **Green** channel indicates **Chlamydia trachomatis**, **Orange** channel indicates **Mycoplasma genitalium** and **Red** channel is due to **Neisseria gonorrhoeae,** and a signal in the **Yellow** channel is due to **Internal Control**.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** for Chlamydia trachomatis if it is positive in the **Green** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40 and also positive in the **Yellow** channel with a CT of 27-32.
- A sample is **Positive** for Mycoplasma genitalium if it is positive in the **Orange** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40 and also positive in the **Yellow** channel with a CT of 27-32.
- A sample is **Positive** for Neisseria gonorrhoeae if it is positive in the **Red** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40 and also positive in the **Yellow** channel with a CT of 27-32.
- A sample is **Negative** for Chlamydia trachomatis, Mycoplasma Genitalium and Neisseria gonorrhoeae if it is negative in the **Green** and the **Yellow** and the **Red** channels while it is positive in the **Yellow** channel with a sigmoid graph and CT of 27-32.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in **Yellow** channel.

The interpretation of results is summarized in the next page Table.

Green	Yellow	Red	Orange	Result
+	+	-	-	Pos for Chlamydia trachomatis
-	+	-	+	Pos for Mycoplasma genitalium
-	+	+	-	Pos for Neisseria gonorrhoeae
-	+	-	-	Negative
- / +	-	- / +	-/ +	Inconclusive

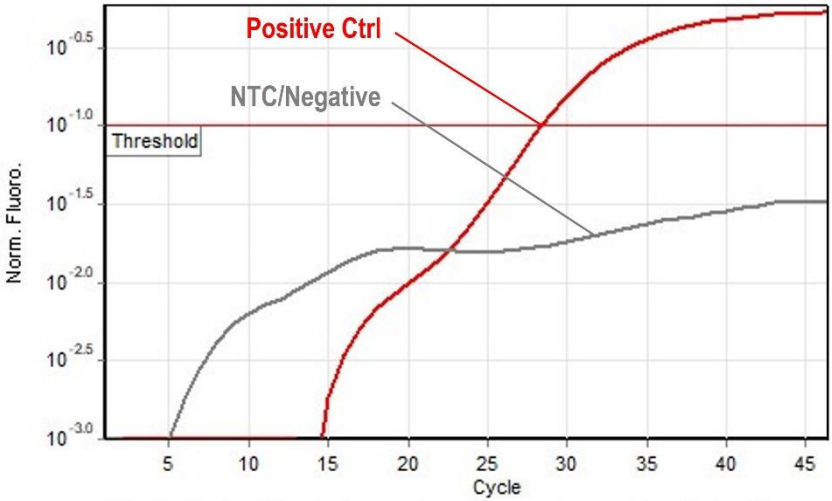


Fig 1. Typical Controls graph in Green channel for Rotor-Gene (Chlamydia trachomatis)

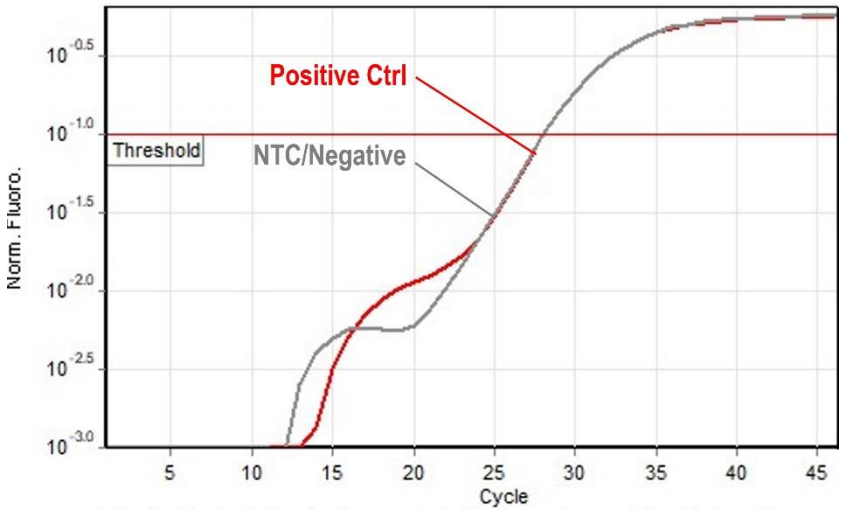


Fig 2. Typical Controls graph in Yellow channel for Rotor-Gene (Internal Control)

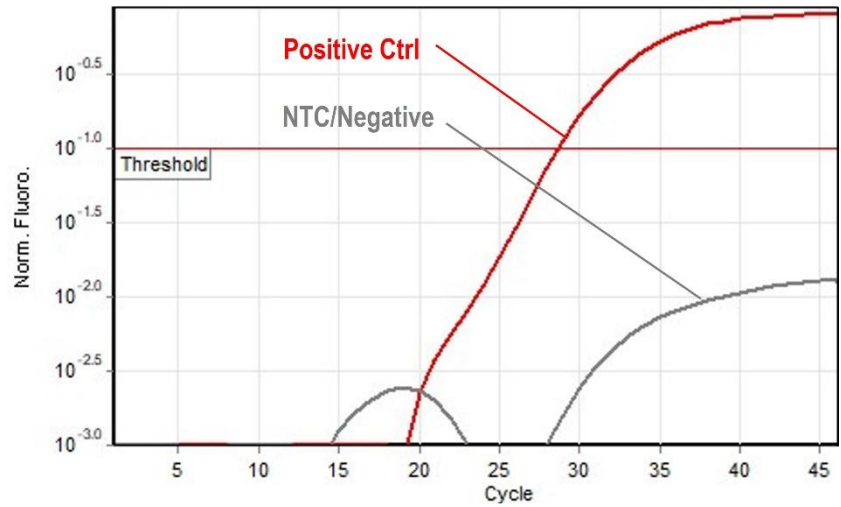


Fig 3. Typical Controls graph in Red channel for Rotor-Gene (Neisseria gonorrhoeae)

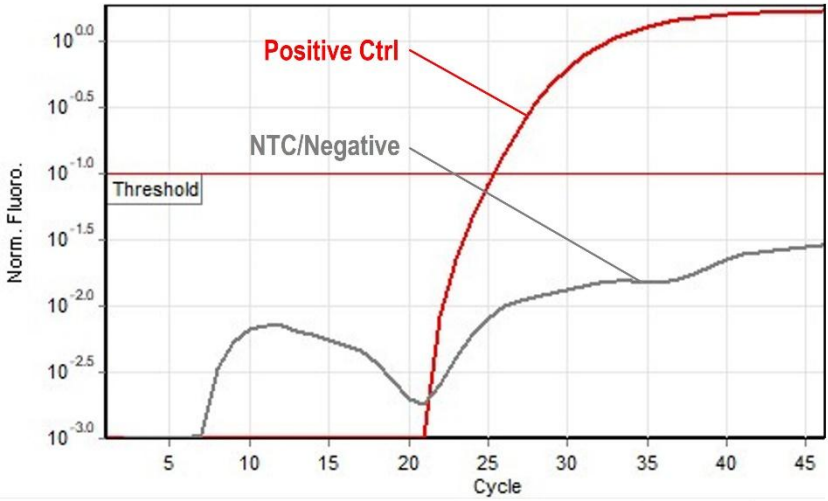


Fig 4. Typical Controls graph in Orange channel for Rotor-Gene (Mycoplasma genitalium)

19. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with a cloned targets genomes and showed a limit of detection equal to 2.8 copies/µl for Chlamydia trachomatis and 3.8 copies/µl for Neisseria gonorrhoeae, and 4 copies/µl for Mycoplasma genitalium.

20. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special method of disposal and can be directly discarded. But infectious laboratory specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

21. Technical Support

For technical support, contact us via phone at +98 993-6223241 and email: info@novingene.com

22. Contact Information

NovinGene ParsVira
Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.
Tel: +98 21-88837393
+98 990 -1813124
Email: info@novingene.com
Website: www.novingene.com

23. References

- Buder, S., Schöfer, H., Meyer, T., Bremer, V., Kohl, P.K., Skaletz-Rorowski, A. and Brockmeyer, N. (2019). Bacterial sexually transmitted infections. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 17(3), pp.287–315.
- CDC (2023). STI Treatment Guidelines. [online] Centers for Disease Control and Prevention. Available at: https://cdc.gov/std/treatment-guidelines/default.htm [Accessed 21 May 2024].
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Mahon, C.R. and Lehman, D.C. (2023). Textbook of Diagnostic Microbiology - E-Book. Elsevier Health Sciences.

24. Symbols

RUO Research use only	Manufacturer	Consult instructions for use
LOT Lot number	Content sufficient for <n> tests	Use-by date
REF Catalogue number	SN Serial number	-10°C -30°C Temperature limit

For more information and resources please visit our website; www.novingene.com