ساخت کیت تشخیص آلودگی میکروارگانیسمی سطوح (لومین تست)

فریبا دشتستانی[۱و۳]، مهدی علی‌جانیان‌زاده *[۲و۳]، علی شکوری گرکانی[۳]

۱- دکترای بیوفیزیک، دانشکده علوم نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- استادیار بیوفیزیک، گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، کرج، ایران
۳- کارشناسی ارشد بیوشیمی، شرکت دانش بنیان بهار زیست آزما پژوه، تهران، ایران

نویسنده مسئول: مهدی علی‌جانیان‌زاده، گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی

Email: Alijanian@khu.ac.ir

چکیده:

اندازه‌گیری‌های مبتنی بر اندازه گیری بیولومینسانس آدنوزین تری فسفات (ATP) در واحدهای RLU اغلب برای ارزیابی سریع سطح تمیزی سطوح محیطی در مراقبت های بهداشتی و سایر تنظیمات استفاده می شود. در این طرح کیت تشخیص سریع آلودگی میکروارگانیسمی سطوح (در عرض ۱۵ ثانیه) طراحی، ساخته و تجاری شده است و از اداره کل استاندارد، استاندارد آن اخذ شده است و همچنین به تایید آزمایشگاه مرجع وزارت بهداشت رسیده است.

در این مطالعه ابتدا از محلول های ATP خالص در غلظت های مختلف برای ایجاد منحنی استاندارد استفاده شد. خطی بودن و حساسیت رقت های متوالی کشت براث استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان نماینده بیمارستانی پاتوژن، سپس برای تعیین اینکه آیا قرائت های ATP با CFU های واقعی همبستگی دارد یا خیر، مورد استفاده قرار گرفتند. بعد، انواع مختلف مواد شیمیایی ضد عفونی کننده برای پتانسیل آنها برای تداخل با قرائت استاندارد ATP مورد آزمایش قرار گرفتند.

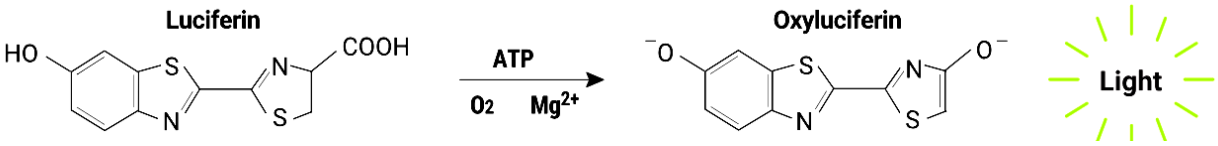
نحوه عملکرد این کیت و خطی بودن آن برای سوبسترای ATP و همچنین باکتری بررسی شده است. نتایج نشان می‌دهد که پاسخ کیت در بازه غلظتی $۱۰^{-۶} - ۱۰^{-۱۱}$ مولار ATP خطی می‌باشد. همچنین در مورد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نیز در بازه $۱۰^{۸} - ۱۰^{۴}$ CFU خطی می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد که حضور مواد شیمیایی ضد عفونی کننده می‌تواند در جواب‌ها اختلال ایجاد کند.

کلمات کلیدی: لوسیفراز، آدنوزین تری فسفات، CFU، RLU، لومین تست

مقدمه:

آدنوزین تری فسفات (ATP) منبع انرژی تمام سلول های زنده است و در بسیاری از واکنش های بیوشیمیایی حیاتی نقش دارد. هنگامی که سلول ها می‌میرند، سنتز ATP را متوقف می کنند و ATP موجود در سلول‌ها به سرعت تخریب می شود. بنابراین، ATP به طور گسترده ای به عنوان نشانگر سلول های زنده پذیرفته شده است. غلظت بالاتر ATP نشان دهنده تعداد سلول های زنده بیشتر است. سنجش ATP روشی است که می توانند زنده ماندن سلول را بر اساس تشخیص ATP اندازه گیری کنند. تمام سلول های زنده از جمله باکتری ها را می توان با سنجش ATP شناسایی کرد. چندین روش تشخیص می توان استفاده کرد، مانند رنگ سنجی، فلورسنت و بیولومینسانس. اکثر محققان به دلیل حساسیت بالاتر، پروتکل ساده و همگن و نتایج سریع، سنجش‌های ATP بیولومنسسنت را برای اندازه‌گیری زنده‌مانی سلول انتخاب می‌کنند.

سنجش‌های بیولومینسانس ATP از واکنش آنزیمی لوسیفراز کرم شب‌تاب استفاده می‌کنند که از ATP از سلول‌های زنده برای تولید فوتون‌های نور استفاده می‌کند. سلول های زنده لیز می شوند تا ATP را برای تشخیص آزاد کنند و معرف های حاوی آنزیم و سوبسترا لوسیفراز کرم شب تاب برای کاتالیز کردن یک واکنش دو مرحله ای اضافه می شوند. اولین مرحله واکنش فعال سازی لوسیفرین با ATP برای ایجاد لوسیفریل-آدنیلات و پیروفسفات است. در مرحله دوم، لوسیفریل-آدنیلات با اکسیژن مولکولی واکنش می دهد تا اکسی لوسیفرین را در حالت برانگیخته الکترونیکی و CO_2 تولید کند. سپس اکسی لوسیفرین حالت برانگیخته، با انتشار نور درخشان سبز تا زرد (۵۵۰ تا ۵۷۰ نانومتر) به حالت پایه باز می‌گردد (شکل ۱). شدت سیگنال شب تاب با استفاده از لومینومتر اندازه‌گیری می‌شود. هنگامی که ATP جزء محدود کننده در واکنش لوسیفراز است، لومینسانس با غلظت ATP متناسب است. سیگنال درخشان بالاتر نشان دهنده سطوح بالاتر ATP است.



شکل ۱- واکنش بیولومینیسانس آنزیم لوسیفراز

انواع مختلفی از پاتوژن ها می توانند به راحتی بر روی سطوحی که تماس زیاد دارند، زنده [۴-۱]. بنابراین این سطوح می‌توانند به پخش پاتوژن های بیمارستانی کمک کنند [۳-۵]. در سال ۲۰۰۲ در ایالات متحده، ۵٪ از همه بیماران به چنین عفونت هایی مبتلا شدند و از این میان میزان مرگ و میر تقریباً ۶٪ بود [۱۱-۶]. در ایالات متحده به تنهایی، هزینه عفونت های بیمارستانی (HAI) بین ۵ و ۲۹ میلیارد دلار در سال تخمین زده می شود [۱۴-۱۲, ۹]. برای محدود کردن تأثیر HAI ها، تمیز کردن و ضد عفونی کردن معمولی سطوح حساس محیطی در مراکز بهداشتی و درمانی برای کنترل عفونت بسیار مهم است [۱۹-۱۵, ۴, ۲]. علاوه بر این، ضروری است که اطمینان حاصل شود که روش های ضد آلودگی در چنین جاهایی بهینه هستند [۲۱،۲۰, ۷]. بنابراین نیاز است که به صورت کمی میزان آلودگی بعد از تمیز کردن سنجیده شود. به همین دلیل است که از روش بیولومینیسانس برای اندازه‌گیری آلودگی به صورت کمی استفاده می‌شود. در حالی که روش‌های بر پایه کشت میکروبی نتایج کمی ارائه می کنند، اما این

روش‌ها زمان‌بر هستند و نیاز به نیروی متخصص دارند. روش‌های بر پایه PCR یا آنتی‌بادی نیز محدودیت‌های خاص خود را دارند [۲،۱۳].

سنجش‌های بیولومینسانس ATP که غلظت ATP را به صورت(RLU) در مواد آلی و سلول های زنده اندازه‌گیری می‌کنند [۱۶]، به دلیل سهولت استفاده و جوابدهی سریع، به طور گسترده در صنایع مختلف غذایی و آشامیدنی استفاده می شوند. چنین روش‌هایی به طور فزاینده‌ای در مراکز بهداشتی درمانی نیز مورد استفاده قرار می گیرند.

کیت طراحی شده در این مطالعه از ساختار فیزیکی پلاستیکی ساخته شده است که دارای ۴ قسمت مجزا می‌باشد. یک قسمت برای نگهداری محلول آنزیمی (قسمت آکاردئونی)، یک قسمت برای جمع‌آوری نمونه از روی سطح (سواب)، یک قسمت برای خوانش (لوله) و یک قسمت شکننده برای ریخته شدن محلول آنزیمی بر روی سواب جمع‌آوری کننده.

در این کیت

مواد و روش‌ها:

آدنوزین تری فسفات (از شرکت سیگما آلدریچ)، استافیلوکوکوس اورئوس (از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم سازمان پژوهش‌های علمی-صنعتی)، محیط کشت TSA (از شرکت آریا طب)، کیت لومین تست

روش‌ها:

ساختار فیزیکی پلاستیکی لومین تست با استفاده از دستگاه تزریق پلاستیک و اکسترودر ساخته شده است.

ابتدا، لومین تست برای خطی بودن آنها در خواندن محلول های استاندارد ATP مورد آزمایش قرار گرفت. محلول ۰/۱ مولار پودر استاندارد ATP در آب دیونیزه شده اتوکلاو شده ((DI تهیه شد و به دنبال آن رقت های ۱۰ برابری از $۱۰^{-۲}$ تا $۱۰^{-۱۰}$ انجام شد. ۱۰ میلی لیتر از هر رقت مستقیماً با استفاده از سمپلر روی نوک سواب پیپت شد.

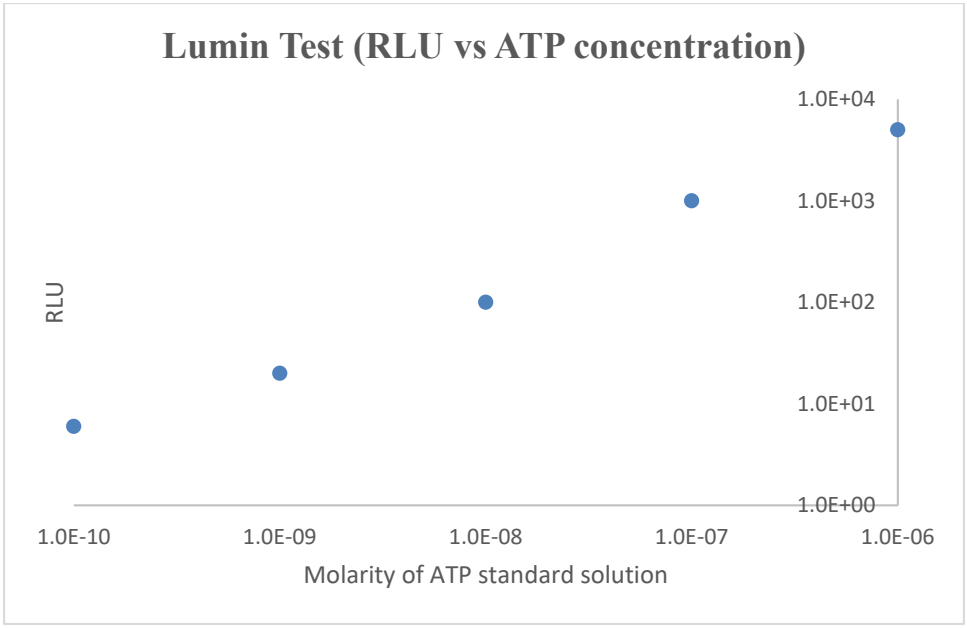
هر بار ATP را اندازه گیری کرده و داده ها را در RLU گزارش شده است. بعداً رقت‌های سریالی استافیلوکوکوس اورئوس از یک کشت تازه ذوب شده تهیه شد. حجم ۱۰ میکرولیتر از هر رقت سریال از ۱۰ تا $۱۰^{۸}$ به طور جداگانه مستقیماً روی نوک هر سواب پیپت شد و قرائت ها ثبت شد. برای ارتباط خواندن RLU با CFU واقعی، ۹۰۰ میکرولیتراز رقت‌های $۱۰^{-۹}$ و $۱۰^{-۱۰}$ از سوسپانسیون باکتریایی به طور جداگانه روی TSA کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. هرگونه تداخل شیمیایی از طریق خاموش کردن یا افزایش بیولومینسانس با قرار دادن ۱۰ میلی لیتر از رقت مناسب محلول استاندارد ATP بر روی نوک سواب و سپس قرار دادن ۱۰ میلی لیتر از ضد عفونی کننده آزمایش شد.

نتایج

شکل ۲ ساختار ساخته شده به همراه اجزای آن را نشان می‌دهد.

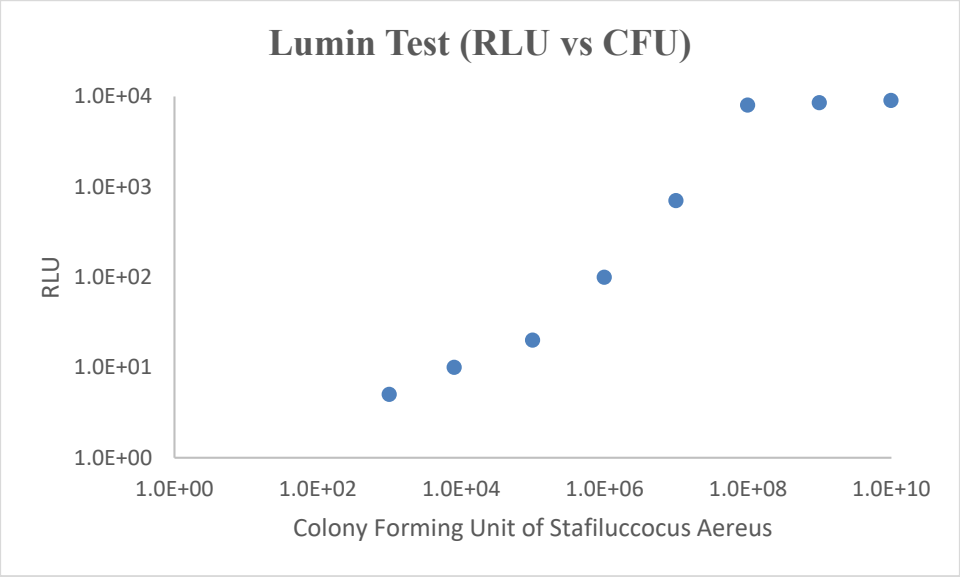
شکل ۲- ساختار پلاستیکی لومین تست

نمودار ۱ مقدار RLU را در برابر میزان ATP نشان می‌دهد:



خطی بودن میزان RLU در برابر مقدار ATP در غلظت‌های مختلف

نمودار ۳ مقدار RLU را در برابر CFU برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان می‌دهد:



نمودار ۳ : مقدار RLU را در برابر CFU برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

بحث و نتیجه‌گیری:

نتایج نشان می‌دهد که در لومین تست رابطه میزان RLU با مقدار ATP یا میزان باکتری به صورت خطی است و می‌توان به جواب‌ها اعتماد کرد. از طرفی این تست می‌تواند در عرض ۱۵ ثانیه میزان آلودگی را به صورت کمی نشان دهد که می‌تواند کمک شایانی به بازرسی محیط‌ها در زمان بسیار کوتاه بکند. ضمنا تاییدیه‌های این تست در انتهای مقاله آورده شده است.

منابع:

١- Havill NL, Havill HL, Mangione E, Dumigan DG, Boyce JM (2011) Cleanliness of portable medical equipment disinfected by nursing staff. American Journal of Infection Control 39: 602–604. doi:10.1016/j.ajic.2010.10.030.

٢- Dancer SJ (2009) The role of environmental cleaning in the control of hospitalacquired infection. Journal of Hospital Infection 73: 378–385. doi:10.1016/ j.jhin.2009.03.030.

٣- Kramer A, Schwebke I, Kampf G (2006) How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infect Dis 6: 130. doi:10.1186/1471-2334-6-130.

٤- Rampling A, Wiseman S, Davis L, Hyett AP, Walbridge AN, et al. (2001) Evidence that hospital hygiene is important in the control of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of Hospital Infection 49: 109–116. doi:10.1053/ jhin.2001.1013.

٥- Dancer S (1999) Mopping up hospital infection. Journal of Hospital Infection 43: 85–100.

٦- Green T, Russell S (1998) Effect of chemical sanitizing agents on ATP bioluminescence measurements. Journal of Food.

٧- Griffith CJ, Cooper RA, Gilmore J, Davies C, Lewis M (2000) An evaluation of hospital cleaning regimes and standards. Journal of Hospital Infection 45: 19–28. doi:10.1053/jhin.1999.0717.

٨- Green TA, Russell SM, Fletcher DL (1999) Effect of chemical cleaning agents and commercial sanitizers on ATP bioluminescence measurements. Journal of Food Protection 174; 62: 86–90.

٩- Hassan M, Tuckman HP, Patrick RH, Kountz DS, Kohn JL (2010) Cost of Hospital-Acquired Infection. Hospital Topics 88: 82–89. doi:10.1080/ 00185868.2010.507124.

١٠- Velazquez M (1997) Quenching and enhancement effects of ATP extractants, cleansers, and sanitizers on the detection of the ATP bioluminescence signal. j food prot 60: 799–803.

١١- Brown E, Eder AR, Thompson KM (2010) Do surface and cleaning chemistries interfere with ATP measurement systems for monitoring patient room hygiene? The Journal of hospital infection 74: 193–195.

١٢- Carrick K, Barney M, Navarro A (2001) The comparison of four bioluminometers and their swab kits for instant hygiene monitoring and detection of microorganisms in the brewery. Journal of the Institute of Brewing 107: 31–37.

١٣- Velusamy V, Arshak K, Korostynska O, Oliwa K, Adley C (2010) An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. Biotechnology Advances 28: 232–254. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.12.004.

١٤- Sciortino CV, Giles A (2012) Validation and comparison of three adenosine triphosphate luminometers for monitoring hospital surface sanitization: A Rosetta Stone for adenosine triphosphate testing. American Journal of Infection Control 40: e233–e239. doi:10.1016/j.ajic.2012.04.318.

١٥- Turner D, Daugherity E, Altier C (2010) Efficacy and Limitations of an ATPBased Monitoring System. Journal of the American.
١٦- Bellamy E (2012) An audit of cleaning effectiveness using adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence assay following outbreaks of infection. Journal of Infection Prevention 13: 154–157. doi:10.1177/1757177412455835.
١٧- Anderson RE, Young V, Stewart M, Robertson C, Dancer SJ (2011) Cleanliness audit of clinical surfaces and equipment: who cleans what? Journal of Hospital Infection 78: 178–181. doi:10.1016/j.jhin.2011.01.030.
١٨- Mulvey D, Redding P, Robertson C, Woodall C, Kingsmore P, et al. (2011) Finding a benchmark for monitoring hospital cleanliness. Journal of Hospital Infection 77: 25–30. doi:10.1016/j.jhin.2010.08.006.
١٩- Lewis T, Griffith C, Gallo M, Weinbren M (2008) A modified ATP benchmark for evaluating the cleaning of some hospital environmental surfaces. Journal of Hospital Infection 69: 156–163. doi:10.1016/j.jhin.2008.03.013.
٢٠- Murphy SC, Kozlowski SM, Bandler DK, Boor KJ (1998) Evaluation of Adenosine Triphosphate-Bioluminescence Hygiene Monitoring for TroubleShooting Fluid Milk Shelf-Life Problems. Journal of Dairy Science 81: 817–820. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75639-5.
٢١- Chen F-C, Godwin SL (2006) Comparison of a rapid ATP bioluminescence assay and standard plate count methods for assessing microbial contamination of consumers' refrigerators. j food prot 69: 2534–2538.

تاییدیه‌های اخذ شده برای لومین تست:

۱- گواهینامه محصول دانش بنیان KB-COC از سازمان ملی استاندارد ایران

۲- گواهی ایزو ۱۳۴۸۵

۳- برگه نتایج آزمون از آزمایشگاه ابن سینا

ف/۶

شماره: ۱۴۰۰۵۵۹۶
تاریخ صدور : ۱۴۰۰/۱۲/۳
تاریخ انقضاء : ۱۴۰۳/۱۲/۳
صفحه ۱ از ۲

سازمان ملی استاندارد ایران
اداره کل استاندارد استان تهران
گواهینامه محصول دانش بنیان (KB-COP)

بـراسـاس بند۲ مصوبات یکصد و نهمین اجلاسیه شورای عالی استاندارد و قوانین و مقررات موضوعه سازمان ملی استاندارد ایران و در اجرای تفاهم نامه شـماره ۱۱/۹۰۲۲۵ مورخ ۹۵/۱۱/۱۱ فی مابین سازمان ملی استاندارد ایران و معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری و با استناد به نامه شماره ۱۲۶۰۰/۱۱ مورخ۱۳۹۷/۴/۹ معاونـت مـذکور و تصمیمات متخذه در کمیته ارزیابی مورخ۱۴۰۰/۱۲/۳ بدینوسیله گواهی می شود کالای

کیت آنزیمی سنجش آلودگی میکرو ارگانیسمی محیط

ساخته شده توسط شرکت دانش بنیان **بهار زیست آزما پژوه** به شماره ثبت :**۳۶۱۸۲۷** با ویژگی های ثبت شده بشرح فرم پیوست مطابقت دارد .
این گواهی صرفا به منزله انطباق کالای مذکور با ویژگی (اظهار شده) مندرج و جهت ارائه به مشتریان حقیقی و حقوقی صادر گردید و مجوزی برای استفاده از علامت استاندارد ملی ایران نمی باشد .

مهدی اسلام پناه
ازطرف رئیس سازمان ملی استاندارد ایران
عباس نوری

QUALITY SYSTEM CERTIFICATE

This is to Certify that the **Quality Management System** of

BAHAR ZIST AZMA PAZHOUH CO.

No. 9, 3th Golshid Alley,
Nakhlestan St., Baharestan Blvd,
Shams Abad Industrial Zone, Tehran,
Iran

has been assessed by **KGS** Certification Sdn. Bhd.
and found to comply with

ISO 13485:2016

for the scope ***Medical Devices Quality Management System***

Design and Manufacturing of Rapid Hygiene Monitoring System (ATP Test)

Certificate No	: ***510516-2***
Date of Initial Certification	: ***16 November 2022***
Date of Issue/Reissue	: ***16 November 2022***
Renewal Due	: ***15 November 2025***

STANDARDS MALAYSIA ACCREDITED CERTIFICATION BODY

MDQMS 15102014 CB 01

KGS CERTIFICATION SDN. BHD. KGS

Authorized Signatory

This certificate is subject to the company maintaining its system to the required standards, which will be monitored by KGS. The use of this Certificate and the KGS Certification / Accreditation Mark are subject to the Regulations Applicable to Holders of KGS Certification Sdn. Bhd.

KGS Certification Sdn. Bhd. (824092-A)
No. 15, Lorong BLM 5/4, Bandar Laguna Merbok, 08000 Sungai Petani, Kedah Darul Aman, Malaysia.
Tel: 604 441 1524 Fax: 604 441 0610 Email: kgscertification@gmail.com
www.kgscert.com

The Certificate remains the property of KGS and shall be returned when requested. It may only be reproduced in its entirely and without change.

تاریخ پاسخ: **1400/10/14**

آزمایشگاه مرکز آموزشي ابن سينا

برگه الکترونیک نتایج آزمون

صفحه: 1 از 1

تاریخ ورود به آزمایشگاه: **1400/10/13**

جهت صحت سنجی این گزارش آزمون، رمزینه «QR code» فوق را اسکن نمایید.

این گزارش آزمون، شامل 1 صفحه می باشد.

کد hix پذیرش نمونه: 140000000018574553

نام کامل نمونه: **بيومواد انواع كيت تشخيصي**	نام تجاری: **لومین تست**
نام محصول از نگاه مشتری: **كيت تشخيص آلودگي ميكروارگانيسمي محيط (لومين تست)**	سازمان متقاضی: **بهارزیست آزما پژوه**
شماره و تاریخ ثبت درخواست: **862325 - 1400/10/12**	نام متقاضی: **بهارزیست آزما پژوه**
شماره و تاریخ نامه: **-**	سازنده:
تاریخ پاسخ: **1400/10/14**	وارد کننده:
تاریخ تولید: **1400/10/01**	کشور سازنده:
تاریخ انقضا: **1402/10/01**	IRC/پروانه ساخت/مجوز ورود/کد بهداشتی:
محل نمونه برداری: **خط تولید**	شماره سری ساخت:
تاریخ نمونه برداری: **1400/10/01**	تعداد / مقدار /وزن نمونه: **25 بسته**
نوع بسته بندی: **POUCH**	علت ارسال نمونه: **صدور مجوز**

ردیف	آزمایشات انجام شده	نتایج آزمایش	حدود قابل قبول	واحد	روش انجام	مرجع / sop

نتایج به دست آمده از آزمایش کیت مورد نظر در حیطه قابل قبول بود. فایل نتایج در بخش اسناد و مدارك بارگزاري گرديده است.

ازمون های زیر خط دار نامنطبق می باشند.
آزمون های ستاره دار تجدید شده می باشند.
آزمون ها با علامت #، آزمون های برون سپاری شده می باشند.
این برگه آنالیز بدون بارکد و کد HIX پذیرش نمونه، فاقد اعتبار می باشد.
نتایج فوق فقط در مورد نمونه های مورد آزمون صدق می کند.

آقاي دكتر علي انيسيان

رئیس آزمایشگاه

مرکز آموزشی ابن سینا
آزمایشگاه
Laboratory
Ebne-Sina Educational Center

تاریخ: ۱۴۰۰/۱۰/۱۴
شماره: ۸۶۲۳۲۵
پیوست: ــــ

آزمایشگاه مرکز آموزشی ابن سینا

نتایج تست کیت آنزیمی سنجش آلودگی میکروارگانیسمی محیط (لومین تست) شرکت بهار زیست آزما پژوه

حیطه کاربرد: تشخیص بار میکروبی سطوح

روش آزمون: میزان بار میکروبی با مقدار **ATP** سنجیده می شود.

تست‌ها بر اساس گواهینامه **AOAC** به شماره ۱۰۱۸۰۳ انجام شده است.

این کیت در حضور غلظت های مختلف **ATP** خالص و **ATP** در حضور غذا و باقی مانده های میکروبی تست شد و نتایج زیر به دست امد:

۱- نتایج تکرارپذیر بود (جداول ۱، ۲ و ۳)

۲- این کیت می تواند **ATP** را در غلظت های فمتومولار تشخیص دهد. بنابراین حساسیت کیت 10^{-14} مولار (فمتومولار) به دست آمد. (جدول ۱)

۳- در مورد باقی مانده غذایی نیز نتایج بسیار خوبی به دست آمد. و نشان داده شد که می تواند **ATP** را در رقت های ۱ به ۱۰۰۰ غذاها تشخیص دهد (جداول ۲ و ۳).

٤- عملکرد کیت در حضور **GTP**، **CTP**، **UTP** و **TTP** و... بررسی شد و نتایج نشان داد که کیت به صورت اختصاصی بر روی **ATP** عملکرد دارد (جدول ٤).

۵- کیت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت یک ماه پایدار بود و تغییر معناداری در فعالیت کیت مشاهده نشد (نمودار ۱).

٦- در آزمایش مقایسه‌ای دیگر با نمونه کیت خارجی هایژینا، عملکرد کیت در حضور غلظت های باکتری ۰/۵، ۱ و ۲ مک فارلن بررسی شد و تفاوت معناداری با نمونه خارجی مشاهده نشد (جدول ۵).

۷- عملکرد کیت در حضور سه مهارکننده بوتانوئیک اسید، اتانول و آرسنات بررسی شد و تغییر معناداری در فعالیت کیت مشاهده نشد (جدول ٦).

۸- همچنین داده ها نشان دادند که این کیت می‌تواند **ATP** را هم در باکتری های گرم منفی و مثبت و هم مخمر تشخیص دهد.

گرم مثبت (سابتیلیس)

گرم منفی (آئروجینوزا)

مخمر (ساکارومایسس سرویسیا)

آزمایشگاه مرکز آموزشی ابن سینا
Laboratory
Ebn-Sina Educational Center

۰۲۱-۴۴۰۵۹۶۱۰-۱۱۴
۰۹۳۵۰۷۱۱۱۵۵
laboratoryama@gmail.com
تهران، میدان دوم صادقیه، فردوس شرق،
خیابان ولیعصر، خیابان اعتمادیان، پ۲۹

تاریخ: ۱۴۰۰/۱۰/۱۴
شماره: ۸۶۲۳۲۸
پیوست: ـــــ

آزمایشگاه مرکز آموزشی ابن سینا

داده‌های کنترل کیفی لومین تست

- آزمون در حضور ATP خالص با غلظت مشخص

محلول **ATP** در رقت های مختلف ساخته شد و عملکرد کیت با اندازه گیری میزان **RLU** با دستگاه لومیناتور اندازه‌گیری شد. نتایج طبق جدول زیر است.

جدول ۱- اندازه‌گیری **RLU** مربوط به اضافه کردن **ATP** خالص به کیت و خواندن عدد در دستگاه لومیناتور

RLU در غلظت فمتومولار ATP							تکرار
۲۰۰	۱۰۰	۲۵	۱۰	۵	۱	۰	
۳۰۰	۱۸۳	٤۱	۱۲	۸	۳	۰	۱
۵۵۲	۱۹۹	۵۲	۱٦	۷	۱	۱	۲
٤۷۸	۲۳۵	۳۱	۲۰	٦	۱	۱	۳
۵۵٦	۲۲۵	٤۲	۲۳	۸	۲	۰	٤
٤۸۹	۲۹۳	٤۹	۲٤	۷	۲	۱	۵
۵۱۲	۲۱۹	۵۱	۲۰	۷	۲	۱	٦
٤۱۲	۲۰۱	۵۸	۲۲	۸	۱	۰	۷
٤۲۳	۲۰۵	۳۷	۳۰	۸	۱	۱	۸
٤۰۰	۲۱۷	۵۰	۲۸	۷	۲	۰	۹
۵۲٦	۱۹۳	٤۱	۲۲	٦	۲	۱	۱۰
٤٦۹	۲۱۷	٤۵	۲۲	۷	۲	۱	متوسط RLU

۰۲۱-۴۴۰۵۹۶۱۰-۱۱۴
۰۹۳۵۰۷۱۱۱۵۵
laboratoryama@gmail.com
تهران، میدان دوم صادقیه، فردوس شرق، خیابان ولیعصر، خیابان اعتمادیان، پ۲۹

تاریخ: ۱۴۰۰/۱۰/۱۴
شماره: ۸۶۲۳۲۵
پیوست: —

آزمایشگاه دراتز آموزشی ابن سینا

- آزمون کیت با مواد غذایی خیس

کیت در حضور مواد غذایی شامل آب استیک گوشت و آب پرتغال مورد آزمون قرار گرفت. از آب استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد. نتایج به شرح زیر است:

جدول ۲- اندازه‌گیری متوسط RLU کیت برای ماتریکس غذاهای خیس. تمام اندازه‌گیری‌ها در دستگاه لومیناتور انجام شده است. آب استریل به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شده است.

	رقت ماتریکس غذایی	تکرار										متوسط	انحراف معیار	درصد CV
		۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰			
استیک گوشت	آب استریل	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۰۰	-
	-٥	۱	۱	۱	۱	۲	۱	۱	٥	۲	۱	۱	۰/۰۰	-
	-۳	٤٤	٤۰	٤۲	۲۹	۱۹	۲۲	۲۳	۲٥	۲۷	۳۳	۲٥	۳/۰۲	٤۰/۰
	-۲	۲۸۸	٥۰٦	۷۳٤	٥۷۷	٦٥۱	٤۲۹	٥٥۱	٦۰۳	٥۱۰	٤٥۳	٥۳۰	۱۱۸	۲۲/۳
	-۱/۷٥	۱۳۲۹	۱۳٤۹	۱۲۹۸	۱٥۷۳	۱۲٦٤	۱۸٥٥	۱٦۱۲	۱۲۷٦	۱۹۹۸	۱۰۱۰	۱٤٥٦	۲۸٤	۱۹/٥
	-۱/٥	۱٦٥۱	۱۷۲۱	۲۲۳۱	۱۸۷٤	۱۹۹۳	۲۹۷٤	۲٥٥۳	۱۹۳۲	۲۲٤۹	۲٥٦۳	۲۱۷٤	٤۰۰	۱۸/٤
آب پرتغال صاف شده	آب استریل	۲	۱	۲	۳	۳	۲	۲	۲	۳	۳	۲	۰/٦٤	۲۷/۸
	-٥	۸	۱۱	٦	۱۰	۱۱	۱۹	۱٥	۱۱	۱٥	۱۱	۱۲	۳/٥٥	۳۰/۳
	-٤/٥	۲٦	۳۱	۳۰	۳۹	۲۹	٤۱	۲۸	۲۱	۳٥	۱۹	۳۰	٦/۷	۲۲/٤
	-٤	۱۹	٤۱	۱۸	٤۸	۱۸	۱۹	٤۲	۲۱	۲٦	۱۱	۲٦	۱۲/۰	٤٥/٦
	-۳/٥	٦۹	۷۱	۱۲۸	۱۸۰	۱۲۱	۱۲۲	۱٦۱	٦۱	۷۲	٦۹	۱۰٥	٤۰/۷	۳۸/٦
	-۳	۲۰۰	۱۸۲	۲۳۳	۱۹۱	۱۱۹	۲۱۹	۱٦۲	۱٤۹	۲۲۹	۱۹۹	۱۸۸	۳٤/٥	۱۸/۳

۰۲۱-۴۴۰۵۹۶۱۰-۱۱۴
۰۹۳۵۰۷۱۱۱۵۵
laboratoryama@gmail.com
تهران، میدان دوم صادقیه، فردوس شرق، خیابان ولیعصر، خیابان اعتمادیان، پ۲۹

تاریخ: ۱۴۰۰/۱۰/۱۴
شماره: ۸۶۲۳۲۵
پیوست: ــــ

آزمایشگاه مرکز آموزشی ابن سینا

- آزمون کیت با مواد غذایی خشک

کیت در حضور مواد غذایی شامل استیک گوشت خشک و آب پرتغال صاف شده مورد آزمون قرار گرفت. از آب استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد. نتایج به شرح زیر است:

جدول ۳- اندازه‌گیری متوسط **RLU** کیت برای ماتریکس غذاهای خشک. تمام اندازه‌گیری‌ها در دستگاه لومیناتور انجام شده است. آب استریل به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شده است.

	رقت ماتریکس غذایی	تکرار										متوسط	انحراف استاندارد	درصد CV
		۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰			
استیک گوشت	آب استریل	۳	۲	٤	۲	۲	۲	٤	۳	۱	۱	۲	۱/۰۱	٤۲/٤
	-٥	٤	۳	٤	۲	٤	۳	٤	۲	٤	۲	۳	۰/۸۷	۲۷/۲
	-۳	۷	۱۱	۱۲	۲۲	۱٥	۲۲	۲٤	۱۰	۱۱	۱٦	۱٥	٥/٥٦	۳۷/۱
	-۲	٦۷	۱۰۹	۸۱	٦۹	۱۰٦	۱۹۰	۱۳۷	۹۹	۱٦۷	۱٦۷	۱۱۹	٤۱/٥	۳٤/۸
	-۱/۷٥	۲٥٦	۲٤٤	۲۲۰	۲٤٥	۱٦۷	۲۲۱	۲۳٤	۱٦۷	۲۱۹	۲۲۲	۲۱۹	۲۸/۸	۱۳/۱
	-۱/٥	۳۲۹	۳٦٤	۱۹٥	۲۲۲	۲۷۱	٤۱۰	۱٥٦	۲٦۱	۱۸۳	۲۲۰	۲٦۱	۷۸/۸	۳۰/۲
آب پرتغال صاف شده	آب استریل	۲	۱	۳	۱	۳	۱	۲	۲	۳	۳	۲	۰/۸۳	۳۹/٥
	-٥	۸	۷	٦	۸	۷	۹	٤	٦	۸	۸	۷	۱/۳۷	۱۹/۳
	-٤/٥	۱٤	۹	۱٤	۹	۱۱	۱٥	۸	۱۰	۹	۱٥	۱۱	۲/٦٥	۲۳/۲
	-٤	۱۰	۸	۸	٦	۱۹	۲۲	۱۱	۱۰	۱۸	۱۱	۱۲	٥/۱۱	٤۱/٦
	-۳/٥	٥۱	۲٦	۳۹	٤۹	٤۳	٥۱	٤٥	۲۱	۱۸	۱۷	۳٦	۱۳/۳	۳٦/۹
	-۳	۱۲۹	٦۲	۷۱	٥۹	٤۹	۲۰۱	۱۲۱	٥۲	۱۸۷	۷۲	۱۰٦	٥۸/٦	٥٥/۲

۰۲۱-۴۴۰۵۹۶۱۰-۱۱۴
۰۹۳٥۰۷۱۱۱٥٥
laboratoryama@gmail.com
تهران، میدان دوم صادقیه، فردوس شرق، خیابان ولیعصر، خیابان اعتمادیان، پ۲۹

تاریخ: ۱۴۰۰/۱۰/۱۴
شماره: ۸۶۲۳۲۵
پیوست: —

آزمایشگاه مرکز آموزشی ابن سینا

- آزمون آنالیت های خالص (بررسی اختصاصیت کیت)

جدول ٤- متوسط RLU سیزده آنالیت خالص به علاوه کنترل منفی (آب بدون آنالیت) در غلظت ۲۵۰۰ فمتومولار ترکیب مورد نظر و صفر ATP و ۲۵۰۰ فمتومولار ترکیب و ۲۵ فمتومولار ATP (۵ بار تکرار داشته‌ایم)

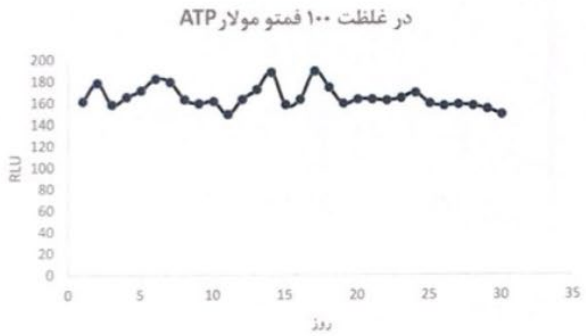
مخفف	اسم	RLU در غلظت صفر ATP و غلظت ۲۵۰۰ فمتومولار ترکیب	RLU در غلظت ۲۵۰۰ فمتومولار ترکیب و ۲۵ فمتومولار ATP
NA	آب بدون آنالیت	۳	۳۱
ATP	Adenosine ٥-triphosphate sodium salt hydrate	۲٤۹۸	۲۷۹۸
dATP	۲□-deoxyadenosine ٥-triphosphate sodium salt	٤۸	۸۲
UTP	Uridine ٥-triphosphate trisodium salt	۲	۳۳
GTP	Guanosine ٥□-triphosphate sodium salt	۱	٤۱
TTP	Thymidine ٥-triphosphate sodium salt	۲	٤٥
dUtp	۲□-deoxyuridine ٥-triphosphate sodium salt	۱	٤۱
CTP	Cytidine ٥-triphosphate	۱	۳۹
dGTP	۲□-deoxyGuanosine ٥-triphosphate sodium salt	۲	۳۷
ITP	Inosine ٥-triphosphate sodium salt	۲	٤۳
dIMP	۲□-deoxyinosine ٥-monophosphate sodium salt	۱	٤۹
dCTP	۲□-deoxycytidine ٥-triphosphate sodium salt	۲	٤۱
ADP	Adenosine diphosphate (bacterial origin)	٤۱	٥٥
AMP	Adenosine monophosphate	۱	۳۱

۰۲۱-۴۴۰۵۹۶۱۰-۱۱۴
۰۹۳۵۰۷۱۱۱۵۵
laboratoryama@gmail.com
تهران، میدان دوم صادقیه، فردوس شرق، خیابان ولیعصر، خیابان اعتمادیان، پ۲۹

مرکز آموزشی ابن سینا آزمایشگاه Laboratory Ebne-Sina Educational Center

- آزمون پایداری دمایی

۳۰ عدد کیت لومین تست در دمای اتاق قرار داده شد و هر روز یک کیت با **ATP** با غلظت ۱۰۰ فمتومولار سنجش شد.



نمودار ۱- نمودار پایداری: بررسی فعالیت کیت در غلظت ۱۰۰ فمتومولار **ATP** در بازه ۳۰ روزه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

- آزمون مقایسه با کیت تجاری خارجی

کیت لومین تست با کیت هایژینا ساخت کشور انگلستان آزمون موازی انجام شد. با استاندارد مک فارلن در غلظت های ۰/۵ و ۱و ۲ هر دو کیت مورد آزمون قرار گرفته شد. نتایج به شرح زیر است.

۰۲۱-۴۴۰۵۹۶۱۰-۱۱۴
۰۹۳۵۰۷۱۱۱۵۵
laboratoryama@gmail.com
تهران، میدان دوم صادقیه، فردوس شرق،
خیابان ولیعصر، خیابان اعتمادیان، پ۲۹

تاریخ: ۱۴۰۰/۱۰/۱۴
شماره: ۱۶۲۳۲۵
پیوست: —

آزمایشگاه مرکز آموزشی ابن سینا

جدول ۵- مقایسه عملکرد کیت ساخته شده توسط شرکت با کیت شرکت هایژینا در غلظت های مختلف باکتری

غلظت باکتری	۰/۵ مک فارلن ($۱,۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU/ml)	۱ مک فارلن (۳×۱۰^{۸} CFU/ml)	۲ مک فارلن (۶×۱۰^{۸} CFU/ml)
هایژینا (mean RLU)	۹۲۲۱	۹۶۱۲	۹۷۹۸
لومین تست (mean RLU)	۹۱۱۱	۹۵۹۸	۹۸۵۲

- بررسی مهارکننده‌های آنزیم به عنوان ماده موثره کیت

در حضور مهار کننده های آنزیم، کیت لومین تست مورد آزمون عملکردی قرار گرفته شد. نتایج زیر حاصل شد. کیت در برابر مهار کننده پاسخ قابل قبولی می دهد.

جدول ۶- بررسی فعالیت کیت در حضور مهارکننده های آنزیم لوسیفراز

نام مهار کننده	بدون مهار کننده	Butanoic acid	Ethanol	Arsenate
فعالیت (در غلظت ۱۰۰ فمتومولار)	۱۲۶	۱۳۱	۱۲۸	۱۳۹

آقای دکتر علی انیسیان
رئیس آزمایشگاه

آزمایشگاه
Laboratory
Ebne-Sina Educational Center

۰۲۱-۴۴۰۵۹۶۱۰-۱۱۴
۰۹۳۵۰۷۱۱۱۵۵
laboratoryama@gmail.com
تهران، میدان دوم صادقیه، فردوس شرق، خیابان ولیعصر، خیابان اعتمادیان، پ۲۹