

1. محتویات کیت

CAT.NO	محتویات	HPV PL13 (24RXN)	HPV PL13 (48RXN)	HPV PL13 (96RXN)	رنگ درب تیوب
BD189	HPV Enzyme Mix	1x720 µl	2x720 µl	4x720 µl	آبی
BD446	HPV Mix 6	120 µl	240 µl	480 µl	قهوه ای
BD447	HPV Mix 7	120 µl	240 µl	480 µl	قهوه ای
BD448	HPV Mix 8	120 µl	240 µl	480 µl	قهوه ای
BD449	HPV PL13 Positive Control	100 µl	200 µl	400 µl	قرمز
BD196	HPV Negative Control	100 µl	200 µl	400 µl	سبز

2. شرایط پایداری و نگهداری

- حمل کیت بایستی در شرایط دمای °C 20- و در حداقل زمان ممکن صورت گیرد.
- پس از دریافت کیت محتویات بایستی مطابق شرایط درج شده بر روی جعبه کیت نگه داری شوند.
- در صورت نگه داری کیت در دمای نامناسب در حین حمل از آن استفاده نشود.
- در صورت سالم نبودن بسته بندی کیت و یا عدم تطابق شکل ظاهری مواد مصرفی با توضیحات از آن استفاده نشود.
- کیت را در دمای ثابت نگه داری نموده و از نور خورشید محافظت کنید.
- از تکرار متعدد چرخه انجماد / ذوب پرهیزید.
- در صورت باز نشدن مواد مصرفی و نگه داری در دمای توصیه شده این محصول تا پایان تاریخ انقضای مندرج بر روی جعبه کیت پایدار خواهد ماند.

3. معرفی

سرطان دهانه رحم یکی از شایع ترین سرطان های زنان در جهان است. HPV عامل ایجاد کننده بیش از 90 درصد از سرطان های دهانه رحم است. HPV یک DNA ویروس رایج مقاربتی است که از بیش از 100 ژنوتیپ تشکیل شده است. ژنوم ویروس HPV شامل یک DNA حلقوی دو رشته ای با طول تقریبی 7900 جفت باز است. شش ژن اولیه (E)، دو ژن دیررس (L) و یک منطقه کنترل طولانی ترجمه نشده در ژنوم این ویروس وجود دارد.

چهارده ژنوتیپ HPV برای بیماری سرطان دهانه رحم بیماری را یا پرخطر در نظر گرفته می شوند. در بیماران مبتلا به عفونت مداوم با یکی از این انواع، خطر ابتلا به دیسپلازی شدید یا کارسینوم دهانه رحم را افزایش می یابد.

در حالی که برخی دیگر از ژنوتایپ ها همانند 53، 73، 70، 67، 26 و 82 به عنوان ژنوتایپ هایی دسته بنده می شوند که "احتمالاً" پر خطر هستند. در مقابل برخی دیگر از ژنوتایپ ها با عنوان کم خطر دسته بندی می شوند که این ژنوتایپ ها منجر به سرطان نمی شوند و صرفاً ممکن است ایجاد زگیل های پوستی بکنند. دو ژنوتایپ 6 و 11 فراوان ترین ژنوتایپ های کم خطر هستند اما ژنوتایپ هایی نظیر 44، 54، 62، 81 و 89 نیز از این دسته قرار می گیرند.

عفونت های HPV بسیار شایع هستند و اکثر زنان عفونت های HPV را در عرض 6 تا 12 ماه از بین می برند. تشخیص DNA ویروسی HPV به معنای وجود دیسپلازی دهانه رحم یا سرطان دهانه رحم نیست. با این حال، یک رویکرد موثر برای تشخیص بیماری دهانه رحم و شروع روند های درمان و پیشگیری از سرطان است.

کیت BehDx PL13 Real Time PCR Kit جهت شناسایی سویه های کم خطر و احتمالاً پر خطرین ویروس طراحی شده است.

4. حیطة کاربری

کیت شناسایی کیفی DNA پاپیلوما ویروس انسانی (ژنوتیپ های احتمالاً خطرناک و کم خطر) در نمونه LBC و سوآب سرویکس به روش Real Time PCR جهت کاربردهای تحقیقاتی ارائه شده است.

5. اساس روش

اساس روش بکار گرفته شده در کیت BehDx HPV PL13 Real Time PCR kit، واکنش زنجیره ای پلیمریزاسیون (qPCR) و به دنبال آن، تشخیص به وسیله هیبریداسیون فلوئورسنت می باشد.

در واکنش PCR، قطعه مورد نظر در شرایط فراهم شده، به وسیله آنزیم DNA Polymerase تکثیر می شود. اختصاصیت این روش با ساختار پرایمرها و پروب های فلوئورسنت قابل تضمین می باشد.

پروب های بکار گرفته شده در روش هیبریداسیون، دارای رنگ فلوئورسنت و خاموش کننده فلوئورسنت (Quencher) می باشند. پروب ها به جایگاه خود در DNA متصل می شوند، و در چرخه بعد، به وسیله پلیمراز تخریب می شوند. در این مرحله، رنگ فلوئورسنت از تأثیر خاموش-کننده (Quencher) خارج شده و منجر به افزایش میزان فلوئورسنت وابسته به تکثیر می شود. میزان فلوئورسنت آزاد شده به وسیله دستگاه Real-Time PCR در چند کانال به طور همزمان قابل شناسایی می باشد.

میکس واکنش شامل پرایمرها و پروب ها برای تکثیر و تشخیص همزمان قطعات مورد نظر در ژنوم ویروس و ژن β -actin انسانی به عنوان کنترل داخلی (IC) می باشد.

کنترل داخلی می تواند نشان دهنده نحوه صحیح انتقال و نگهداری مواد مورد استفاده در تست، کارایی استخراج نوکلئیک اسید و مراحل PCR و همچنین عدم وجود مهارکننده های PCR در نمونه باشد. نتایج تست به نحوی که در جدول قسمت 12 (تفسیر نتایج) آمده، قابل تفسیر است.

6. نکات مهم: لطفاً قبل از استفاده مطالعه شود.

- قبل از شروع فرآیند تمامی ریجنت ها بایستی در دمای محیط قرار گیرند تا ذوب شوند.
- زمان ذوب شدن ریجنت ها بیش از 30 دقیقه نباشد تا از تخریب مواد جلوگیری شود.
- پس از ذوب ریجنت ها، همگن و میکروفیوژ شوند.
- کلیه مراحل بایستی بر روی بلوک سرد انجام گیرد.
- از میکروتیوب های DNase & RNase free و تیپ های فیلتردار DNase & RNase free استفاده شود.

7. تجهیزات و مواد لازم که در کیت فراهم نشده است

- دستگاه های Real-Time PCR سازگار (به بخش 9 دستگاه های سازگار مراجعه شود)
- کیت ها و یا دستگاه های استخراج DNA مناسب (به بخش 11-1 استخراج DNA مراجعه شود)
- دستگاه سانتریفیوژ و میکرواسپین
- میکروتیوب PCR و تیپ های فیلتر دار DNase & RNase free
- دستکش بدون پودر یک بار مصرف

8. نمونه های قابل استفاده

DNA ویروسی استخراج شده از:

- نمونه های سایتوبراش در محیط مایع

9. دستگاه های سازگار

- Qiagen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM
- Tianlong Gentier Real-Time system

توجه: این کیت برای استفاده در دستگاه های بدون نیاز به ROX طراحی گردیده است.

توجه: در دستگاه هایی که نیازمند ROX به عنوان رنگ غیر فعال (Passive Dye) هستند، این قسمت از تنظیمات بایستی در حالت خاموش قرار گیرد.

10. نکات ایمنی: قبل از استفاده با دقت مطالعه شود

- از جابه جایی و یا ترکیب ریجنت های کیت با Lot Number مختلف جدا خودداری فرمایید.

- برای جلوگیری از انتقال آلودگی به محلول مستر میکس، بلافاصله پس از دریافت کیت، تیوب های کنترل مثبت، منفی و تیوب کنترل داخلی را در فریزر مجزا از تیوب حاوی مستر میکس قرار دهید.
- از کیت و یا اجزای کیت بعد از گذشت تاریخ انقضا استفاده نشود.
- این محصول توسط افراد متخصص و آموزش دیده در زمینه تست های مولکولی قابل استفاده می باشد، هنگام کار از گان آزمایشگاهی و دستکش یکبار مصرف استفاده کنید.
- در هنگام استفاده از ریجنت های کیت توصیه می شود از دستکش های بدون پودر استفاده شود.
- تمامی نمونه ها می توانند باعث انتقال آلودگی شوند و بایستی در حمل و استفاده از آن ها دقت شود. از تماس مستقیم با نمونه ها خودداری شود. لوازم و موادی که با نمونه ها در ارتباط بوده بایستی به درستی ضدعفونی و اتوکلاو شوند.
- از تماس نمونه یا ریجنت ها با پوست، چشم و غشاهای مخاطی خودداری کنید. در صورت تماس با پوست، چشم یا غشاهای مخاطی، فوراً با آب بشویید و سریعاً به پزشک مراجعه کنید.
- تمامی محتویات کیت پس از استفاده جزو دسته ی زباله های زیستی خطرناک می باشد و باید به درستی دفع شود.

11. فرآیند (دستورالعمل استفاده)

1-11. استخراج DNA

برای جداسازی DNA استفاده از کیت های زیر توصیه می شود:

1. BehPrep G-Plus DNA Extraction Kit (Cat Number: BP101)
 2. BehPrep Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Cat Number: BPVD050)
- استخراج DNA توسط کیت و دستگاه های استخراج با کیفیت و خلوص کافی نیز مورد تایید است.
- استخراج دستگاهی زیر نیز توصیه می شود:

BehMag Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Cat Number: BM202).3

2-11. کنترل داخلی

کیت BehDx HPV PL13 Real Time PCR شامل ست پرایمر و پروب برای ژن β -Actin به عنوان کنترل داخلی در هر تیوب 6-8 HPV Mix است. که به منظور کنترل احتمال وجود مهارکننده های PCR و نظارت بر روش جداسازی DNA ویروسی مورد استفاده قرار می گیرد.

3-11. آماده سازی مستر میکس

1. برای تهیه مستر میکس ابتدا به ازای هر نمونه 3 میکروتیوب را در رک یخ قرار دهید و تیوب ها را به ترتیب از 1 الی 3 نام گذاری کنید.
2. 10 μ l از HPV Enzyme Mix را به همه تیوب ها اضافه کنید. سپس 10 μ l از HPV Mix 6-8، به ترتیب به میکروتیوب 6 الی 8 واکنش اضافه نمایید.

Number of Reactions	1	15
HPV Enzyme Mix	10 µl	150 µl
HPV Mix 6-8	5 µl	75 µl
Total	15 µl	225 µl

3. میکروتیوب ها را ابتدا ورتکس و سپس برای مدت کوتاهی میکروفیوژ نمایید.

4. به هر تیوب تست 5µl از DNA استخراج شده یا 5 µl از کنترل ها (کنترل مثبت و یا منفی) را اضافه گردد.

5. میکس نمونه و مسترمیکس، و همچنین کنترل و مستر میکس **کاملا همگن** و میکروفیوژ گردد.

• تمام این مراحل بایستی بر روی یخ یا بلوک سرد انجام شود.

Reaction setup	
Master Mix	15 µl
Sample or Control	5 µl
Total	20 µl

11-4. برنامه دمایی

تیوب ها را در دستگاه قرار داده و مطابق برنامه زیر تست را انجام دهید.

program	Temperature [°C]	Hold [hh:mm:ss]	Cycles	Analysis Mode
Activation	95	00:03:00	1	None
Amplification	95	00:00:10	5	None
	62	00:00:30		
	72	00:00:15		
	95	00:00:10	40	Quantification
	62*	00:00:30		
	72	00:00:15		

* خوانش در دمای 62° C انجام می گیرد و کانال های FAM , HEX , ROX و CY5 بایستی روشن شوند.

12. تفسیر نتایج

نمودارهای مثبت بایستی به صورت کاملاً سیگموئیدی باشد و نمودارهایی که شکل سیگموئیدی ندارند می بایستی به عنوان منفی در نظر گرفته شوند و خط آستانه (threshold) بر اساس نمونه مثبت و یا کنترل مثبت تعیین شود. برای تمام ژنوتایپ ها CT کمتر از 35 به عنوان مثبت در نظر گرفته شود و CT های بالاتر از 35 به عنوان منفی در نظر گرفته شود.

میکس ها بر اساس جدول زیر جهت تشخیص سویه های HPV طراحی شده اند.

Reaction Mix	Florescence Channel			
	FAM	HEX	CY5	ROX
HPV Mix6	HPV73	HPV 26/67	HPV 70/82	IC
HPV Mix7	HPV 11	HPV 54	HPV 81/89	IC
HPV Mix8	HPV 6	HPV 44	HPV 42/62	IC

نتایج بدست آمده بر اساس جدول زیر تفسیر شود.

Reaction Mix	Florescence Channel				Results
	FAM	HEX	CY5	ROX(IC)	
HPV Mix 6	+	-	-	+/-	تایپ 73 مثبت است
	-	+	-	+/-	تایپ 26 یا 67 مثبت است
	-	-	+	+/-	تایپ 70 یا 82 مثبت است
HPV Mix 7	+	-	-	+/-	تایپ 11 مثبت است
	-	+	-	+/-	تایپ 54 مثبت است
	-	-	+	+/-	تایپ 81 یا 89 مثبت است
HPV Mix 8	+	-	-	+/-	تایپ 6 مثبت است
	-	+	-	+/-	تایپ 44 مثبت است
	-	-	+	+/-	تایپ 42 یا 62 مثبت است

- در صورتی که نمودار کنترل داخلی در هیچ یک از میکس ها مشاهده نشد؛ بایستی تست از مرحله استخراج تکرار شود.
- در صورتی که در هر یک از میکس ها ،نمودار تکثیر اعم از کنترل داخلی مشاهده نشد ؛ بایستی تست از مرحله PCR برای میکس مورد نظر تکرار گردد.

نماد	مفهوم	نماد	مفهوم
	کاربرد تحقیقاتی		محدودیت دمایی
	اطلاعات کارخانه		تعداد تست
	تاریخ تولید		تاریخ انقضا
	از تابش نور دور نگه داشته شود		خطرات زیستی
	احتیاط		جای دستورالعمل استفاده از محصول
	شماره سری ساخت		کد UK