

1. محتویات کیت

CAT.NO	محتویات	HPV GENOTYPING 14 (24RXN)	HPV GENOTYPING 14 (48RXN)	HPV GENOTYPING 14 (96RXN)	رنگ درب تیوب
BD189	HPV Enzyme Mix	1x1200 الی	2x1200 الی	4x1200 الی	آبی
BD190	HPV Mix 1	120 الی	240 الی	480 الی	قهوه ای
BD191	HPV Mix 2	120 الی	240 الی	480 الی	قهوه ای
BD192	HPV Mix 3	120 الی	240 الی	480 الی	قهوه ای
BD193	HPV Mix 4	120 الی	240 الی	480 الی	قهوه ای
BD194	HPV Mix 5	120 الی	240 الی	480 الی	قهوه ای
BD195	HPV Positive Control	100 الی	200 الی	400 الی	قرمز
BD196	HPV Negative Control	100 الی	200 الی	400 الی	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 دیورس (L) و یک منطقه کنترل طولانی ترجمه نشده در ژنوم این ویروس وجود دارد. چهارده ژنوتیپ HPV برای بیماری دهانه رحم بیماری زا یا پرخطر در نظر گرفته می شوند. مطالعات متعدد ژنوتیپ های 16، 18، 31، 33، 35، 39، 45، 51، 52، 56، 58، 59، 66، و 68 را با پیشرفت بیماری مرتبط دانسته اند. بیماران مبتلا به عفونت مداوم با یکی از این انواع، خطر ابتلا به دیسپلازی شدید یا کارسینوم دهانه رحم را افزایش می یابد. 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 HPV Genotyping 14 Real Time PCR جهت شناسایی سویه های پرخطر این ویروس طراحی شده است.

4. حیطة کاربری

کیت ژنوتایپینگ کیفی DNA پاپیلوما ویروس انسانی (14 ژنوتیپ HPV) با ریسک خطر بالا در نمونه LBC و سوآب سرویکس به روش Real Time PCR

5. اساس روش

اساس روش بکار گرفته شده در کیت BehDx HPV Genotyping 14 Real Time PCR، 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.

پروپ 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 پلیمرز 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.

این کیت برای 14 ژنوتایپ پر خطر 16، 18، 31، 33، 35، 39، 45، 51، 52، 56، 58، 59، 66، و 68 دارای مجوز وزارت بهداشت و درمان می باشد.

6. نکات مهم: لطفا 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 (liquid based)

9. دستگاه های سازگار

- Qiagen Rotor–Gene Q MDx Splex 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 و منفی 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 ضد عفونی و اتوکلاو شوند.
- از تماس نمونه با 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:

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

2-11. کنترل داخلی

کیت BehDx HPV Genotyping 14 Real Time PCR شامل ست پرایمر و پروب برای ژن β -Actin به عنوان کنترل داخلی در هر تیوب HPV Mix 1–5 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 5 میکروتیوب را در رک یخ قرار دهید و تیوب ها را به ترتیب از 1 الی 5 نام گذاری کنید.
2. 10 الی 10 از HPV Enzyme Mix را به همه تیوب ها اضافه کنید. سپس 1 الی 5 از HPV Mix 1–5، به ترتیب به میکروتیوب 1 الی 5 واکنش اضافه نمایید.

Number of Reactions	1	15
HPV Enzyme Mix	10 الی	150 الی
HPV Mix 1–5	5 الی	75 الی
Total	15 الی	225 الی

3. میکروتیوب ها را ابتدا ورتکس و سپس برای مدت کوتاهی میکروفیوژ نمایید.
4. به هر تیوب تست 5 الی 5 از DNA استخراج شده یا 5 الی 5 از کنترل ها (کنترل مثبت و یا منفی) را اضافه گردد.
5. میکس نمونه و مستر میکس، و همچنین کنترل و مستر میکس کاملاً همگن و میکروفیوژ گردد.

- پیشنهاد می شود تمام این مراحل بر روی یخ یا بلوک سرد انجام شود.

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

4-11. 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 بجز تایپ 56، CT کمتر از 35 به عنوان مثبت در نظر گرفته شود و CT های بالاتر از 35 به عنوان منفی در نظر گرفته شود. CT های بالاتر از 29 برای ژنوتایپ 56 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 Mix 1	HPV16	HPV 33	HPV 39	IC
HPV Mix 2	HPV 18	HPV 35	HPV 51	IC
HPV Mix 3	HPV 45	HPV 59	HPV 52	IC
HPV Mix 4	HPV 66	HPV 58	HPV 68	IC
HPV Mix 5	HPV 31	HPV 56	HPV 53	IC

15. اثر هوک و مهار رقابتی :

مطالعه اثر هوک و امکان مهار رقابتی برای تمام ژنوتایپ ها در غلظت بالا در این کیت انجام شده است و نتایج نشان می دهند که هیچ کدام از ژنوتایپ ها بر روی ژنوتایپ های دیگر اثر مهاری ندارند.

16. عوامل مداخله گر :

اثر عوامل مداخله گر داخلی و خارجی شامل خون، لکوسیت، موکوس، اسید استیک، کرم های آنتی بیوتیک، کرم های ضد قارح و مواد روان کننده بر روی کیت بررسی شده است و نشان داده شده است که حضور موارد بالا در نمونه های LBC نمی تواند باعث تداخل در نتایج این گردد.

17. carry over contamination :

جهت جلوگیری از ایجاد آلودگی می بایست مراحل استخراج، آماده سازی میکس ها و اضافه کردن نمونه در محیط های مجزا انجام شود. در صورت رعایت این موارد امکان انتقال آلودگی بسیار کاهش می یابد.

مفهوم	نماد	مفهوم	نماد
محدودیت دفعی		کاربرد تشخیصی	
تعداد تست		اطلاعات کارخانه	
تاریخ انقضا		تاریخ تولید	
مخاطرات زیستی		از تابش نور دور نگه داشته شود	
حاوی دستورالعمل استفاده از محصول		احتیاط	
کد کالا		شماره سری ساخت	

Reaction Mix	Florescence Channel				Results
	FAM	HEX	CY5	ROX(IC)	
HPV Mix1	+	-	-	+/-	تایپ 16 مثبت است
	-	+	-	+/-	تایپ 33 مثبت است
	-	-	+	+/-	تایپ 39 مثبت است
HPV Mix2	+	-	-	+/-	تایپ 18 مثبت است
	-	+	-	+/-	تایپ 35 مثبت است
	-	-	+	+/-	تایپ 51 مثبت است
HPV Mix3	+	-	-	+/-	تایپ 45 مثبت است
	-	+	-	+/-	تایپ 59 مثبت است
	-	-	+	+/-	تایپ 52 مثبت است
HPV Mix4	+	-	-	+/-	تایپ 66 مثبت است
	-	+	-	+/-	تایپ 58 مثبت است
	-	-	+	+/-	تایپ 68 مثبت است
HPV Mix5	+	-	-	+/-	تایپ 31 مثبت است
	-	+	-	+/-	تایپ 56 مثبت است
	-	-	+	+/-	تایپ 53 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.

13. حساسیت و اختصاصیت :

1-13. حساسیت و اختصاصیت تحلیلی:

- اختصاصیت تحلیلی کیت BehDx HPV Genotyping 14 Real Time PCR به صورت in vitro و in silico در مقابل پاتوژن ها و فلورنرمال دستگاه تناسلی بررسی شده است و هیچ گونه واکنشی با این عوامل گزارش نشده است.
- حساسیت تحلیلی یا LOD کیت BehDx HPV Genotyping 14 Real Time PCR برای تمام سویه ها بررسی شده است و نتایج آن جدول زیر آمده است.

ژنوتایپ	LOD (copies/ul)
16	10
18	10
31	25
33	10
35	50
39	10
45	25
51	50
52	25
56	10
58	25
59	10
66	10
68	25
53	25

2-13. حساسیت و اختصاصیت بالینی:

بر اساس مطالعه انجام شده، حساسیت و اختصاصیت بالینی کیت BehDx HPV Genotyping 14 Real Time PCR به ترتیب 100 و 98 درصد تعیین شده است.

14. دقت و تکرارپذیری :

مطالعات تکرار پذیری این کیت به صورت درون سنجی و برون سنجی بررسی شده است و در هر دو حالت میزان CV% برای عدد CT تمام ژنوتایپ ها کمتر از 5 درصد گزارش شده است.