



**Instruction for Use**

## **Human Papillomavirus (HPV) Detection RT-PCR Kit**

**Model: HPV2**

**باروش**

**Real-Time PCR**

**Cat-No: BONHPV2-24**



**Doc. #: IFU-HPV2-01 Doc. Version: 10 Revision Date: 1403-07-14**

## فهرست مطالب

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| شماره رفرانس.....                          | ۲  |
| شرح کیت.....                               | ۳  |
| اصول.....                                  | ۳  |
| دامنه کاربرد.....                          | ۴  |
| محتویات کیت.....                           | ۵  |
| نگهداری انتقال کیت.....                    | ۵  |
| هشدارها و محدودیت‌ها.....                  | ۸  |
| نمونه‌گیری و نگهداری.....                  | ۸  |
| عوامل تداخلی.....                          | ۹  |
| آماده سازی و اضافه کردن الگو.....          | ۱۱ |
| برنامه ریزی دمایی.....                     | ۱۲ |
| تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌ها.....   | ۱۳ |
| آنالیز نتایج.....                          | ۱۶ |
| نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف..... | ۱۷ |
| ارزیابی آنالیتیکال.....                    | ۲۰ |
| ارزیابی کلینیکال.....                      | ۲۱ |
| پشتیبانی فنی.....                          | ۲۱ |
| نشانه‌ها.....                              | ۲۲ |
| اطلاعات تماس.....                          | ۲۲ |

## شماره رفرانس

- BONHPV2-24

## شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به صورت Real-Time ساخته شده است. این محصول برای تشخیص در شرایط آزمایشگاهی تهیه شده و برای تشخیص ۱۴ نوع رایج ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) با ریسک بالا (شامل انواع ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶ و ۶۸) و ۲ نوع رایج HPV با ریسک پایین (شامل انواع ۶ و ۱۱) در نمونه‌های سواب دهانه رحم (Cervical)، آلت تناسلی (Penis)، واژن (Vagina) طراحی شده است و نشانه‌ای برای تشخیص عفونت توسط این پاتوژن است.

در کیت حاضر، شناسایی ژنوتایپ‌های پرخطر و کم خطر HPV با توجه به تشخیص وجود آنکوژن‌های ویروسی E6 و E7 صورت می‌گیرد که مسئول تغییر شکل سلولی هستند. در بیشتر نمونه‌های سرطان سرویکس، ژنوم HPV به DNA کروموزومی وارد می‌شود که منجر به از بین رفتن ژن E2 ویروسی می‌شود. با توجه به این که E2 یک مهارکننده رونویسی ژن‌های E6 و E7 است، فقدان E2 منجر به تنظیم افزایش یافته یا به عبارتی افزایش بیان ژن‌های E6 و E7 می‌شود. بیان پروتئین‌های E6 و E7 تنظیم سیکل سلولی طبیعی را از راه واکنش با ژن‌های P53 و رتینوبلاستوما یا Rb مختل می‌کند و بدین طریق سیکل سلولی را طولانی کرده، آپوپتوز را مهار می‌کند و سلول‌ها را آماده دگرگونی یا ترانسفورمیشن به سوی بدخیمی می‌کند.

نتایج تشخیصی به دست آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

## اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم ویروس می‌باشد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیرشده از طریق رنگ‌های فلوروسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلوروسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به باز کردن مجدد لوله‌های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

## دامنه کاربرد

تشخیص DNA ویروس پاپیلومای انسانی با ریسک بالا (شامل انواع ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶ و ۶۸) و ۲ نوع رایج HPV با ریسک پایین (شامل انواع ۶ و ۱۱) در نمونه‌های سواب دهانه رحم (Cervical)، آلت تناسلی (Penis)، واژن (Vagina)

## اطلاعات پاتوژن

عفونت HPV (Human Papillomavirus) یا ویروس به عنوان عامل سرطان دهانه رحم در زنان شناخته می‌شود. HPV یک ویروس حاوی ماده ژنتیکی از جنس DNA دو رشته‌ای به طول ۸۰۰۰ جفت باز است.

ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) یک ویروس DNA منتقل شده از راه جنسی است که سبب عفونت در سلول‌های اپیتلیال انسان می‌شود. بیش از ۲۰۰ ژنوتیپ HPV یافت شده است که با توجه به میزان خطرناک بودن آن‌ها در ایجاد سرطان، در گروه‌های پرخطر (HR) یا کم‌خطر (LR) طبقه‌بندی می‌شوند. DNA ویروسی HPV را می‌توان به عنوان ویرون‌های اپیزومی در سیتوپلاسم یافت یا اینکه به صورت ادغام شده در کروموزوم میزبان پیدا کرد. عفونت مداوم با برخی از ژنوتیپ‌های HPV منجر به ایجاد سرطان دهانه رحم می‌شود.

HPV های پرخطر که HPV های انکوژنیک نیز نامیده می‌شوند باعث ایجاد سرطان شده و شامل تایپ‌های ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹ و ۶۸ می‌باشد. برخی از HPV های با فراوانی کمتر نیز وجود دارند که احتمالاً برای انسان سرطان‌زا هستند و شامل HPV های نوع ۲۶، ۵۳، ۶۶، ۷۰، ۷۳ و ۸۲ هستند که در گروه HPV های پرخطر یا احتمالاً در معرض خطر طبقه‌بندی می‌شوند. HPV های کم‌خطر مانند ۶ و ۱۱ می‌توانند باعث ایجاد زگیل تناسلی و تغییرات درجه پایین در سلول‌ها شوند، اما به ندرت باعث سرطان می‌شوند. اما، عفونت‌های خطرناک HPV احتمال بالایی برای ایجاد سرطان‌های رحم دارند که اثبات شده است. تقریباً ۹۹/۷ درصد از سرطان‌های دهانه رحم ناشی از عفونت HPV پرخطر است.

سرطان دهانه رحم دومین سرطان بدخیم شایع در بین زنان در سراسر جهان است. عفونت HPV پرخطر می‌تواند تغییرات سیتولوژیکی و بافت‌شناسی را ایجاد کند که با غربالگری پاپ (Pap Screening)، کولپوسکوپی (Colposcopy) یا بیوپسی (Biopsy) قابل تشخیص

است. با این وجود، زنانی که آزمایش پاپ اسمیر منفی یا HR HPV DNA منفی را داشته‌اند، باز هم احتمال ابتلا به ضایعات پیش سرطانی دهانه رحم را دارند.

## محتویات کیت

| Title            | 24 Tests        |
|------------------|-----------------|
|                  | Volume per Vial |
| HPVMaster A1     | 360 µl/tube × 1 |
| HPVMaster A2     | 360 µl/tube × 1 |
| Positive Control | 100 µl/tube × 1 |

جدول ۱. محتویات کیت

## نگهداری انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری گردد، همچنین به منظور انتقال و جابه‌جایی کیت از یونولیت با درب و یخ خشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هیچ‌گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل بر روی بسته‌های یخ‌زده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان طور که روی برچسب بسته‌بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخه‌های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و در نتیجه عدم کارایی کیت می‌شود.
- ✓ از قرار دادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
- ✓ معرف‌ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله‌ها را به طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به طور یکنواخت مخلوط شده‌اند.

## مواد و تجهیزات مورد نیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود؛

۱. کیت استخراج DNA
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه‌های مختلف و نوک سمپلر فیلتردار
۳. سانتیفریوژ رومیزی
۴. بلوک خنک‌کننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
۶. گان و دستکش
۷. دستگاه Rotor-Gene , MIC, Azur با ۴ کانال فلوروسنت رنگ Green و Yellow و Orange و Red و یا انتخاب فلورفورهای FAM و HEX و Texas Red (ROX) و CY5
۸. نرم‌افزار Rotor-Gene Q نسخه ۱/۷/۹۴ ، نرم‌افزار Rotor-Gene 6000 نسخه ۱/۷/۶۵ ، ۱/۷/۸۷ ، ۱/۷/۹۴ و نرم‌افزار Rotor-Gene 3000 نسخه ۶/۰/۲۳ و یا بالاتر.
۹. استریپ و کپ 0.1 ml برای استفاده در روتور ۷۲ چاهکی و یا لوله‌های 0.2 ml PCR برای روتورهای ۳۶ چاهکی

## نکات احتیاط عمومی

۱. لطفاً دستورالعمل را با دقت بخوانید و قبل از استفاده محصول با تمام اجزای کیت آشنا شوید و در حین کار دستورالعمل را دقیقاً دنبال کنید.
- ✓ لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرآیند را با آنها جلو ببرید.
- ✓ از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضا استفاده نکنید.
- ✓ در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.
۲. از سرسمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free استفاده نمایید.
۳. نگهداری و تخلیص نمونه‌های گرفته‌شده، کنترل‌ها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده سازی مسترمیکس صورت پذیرد.
۴. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.

۵. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد را به خوبی پیپتاژ نمایید و به طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به طور کامل توصیه می‌شود.
۶. تمام مراحل مربوط به تهیه مسترمیکس باید بر روی یخ یا جعبه‌های سرد (Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به مسترمیکس بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.
۷. هنگام کار با مواد شیمیایی، روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یکبار مصرف، و عینک‌های محافظ داشته باشید.
۸. کیت حاوی کنترل مثبت است. برای جلوگیری از آلودگی که ممکن است باعث ایجاد مثبت کاذب شود، کنترل مثبت را از سایر مواد موجود در کیت کاملاً جدا کنید.
۹. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.
۱۰. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.
۱۱. از تیپ‌های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ‌های فیلتردار برای جلوگیری از ورود آلودگی RNA و DNA استفاده کنید.
۱۲. لطفاً لوله‌های PCR را با دو دستکش یکبارمصرف بسته‌بندی کرده و به درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR را پس از تکثیر باز نکنید.
۱۳. از استفاده‌ی مجدد مواد یکبار مصرف پرهیزید.
۱۴. مواد موجود در کیت که بلااستفاده شدند، کیت استفاده‌شده و زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.
۱۵. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اسپری اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ تمیز کنید.

## هشدارها و محدودیت‌ها

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول<sup>۱</sup> GLP توسط کارکنان آموزش دیده دارای پوشش حرفه‌ای و محافظ<sup>۲</sup> (PPE) انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 انجام شود (استفاده از دستورالعمل: Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Specimen Associated).
۲. پیشنهاد می‌شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همین طور بعد از کار لامپ UV زده شود.
۳. پیشنهاد می‌شود محل استخراج اسید نوکلئیک، آماده‌سازی مخلوط واکنش از فضای آماده‌سازی و اضافه کردن نمونه و نمونه کنترل مثبت جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید.
۴. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

## کنترل‌ها

۱. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک (DNA) حاصل از استخراج نمونه استفاده شود.
۲. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب به جای نمونه استفاده شود.
۳. کنترل مثبت (PTC): از کنترل مثبت کیت به جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

## نمونه‌گیری و نگهداری

۱. برای تشخیص ویروس می‌توان از سواب دهانه رحم (Cervical)، آلت تناسل (Penis)، واژن (Vagina) و LCB استفاده کرد.
۲. نمونه مناسب می‌تواند پاپ اسمیر یا هر نمونه مشابهی که حاوی میزان کافی از سلول‌های مخاطی دهانه یا گردن رحم باشد.

---

<sup>۱</sup> Good Laboratory Practice

<sup>۲</sup> Personal Protective Equipment

## نگهداری نمونه‌های گرفته‌شده

نمونه می‌تواند کمتر از ۸ ساعت در یخچال با محدوده دما از ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای نگهداری طولانی مدت آن، باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده و نگهداری شود.

## تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

## کنترل داخلی (Internal Control)

کنترل داخلی این کیت به صورت اندوژن (Endogen) می‌باشد که به کاربر این امکان را می‌دهد فرآیند تخلیص و احتمال وجود مواد مهارکننده PCR را بررسی کند.

## عوامل تداخلی

EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه‌های سیلیس (1μl)، خون (11μl)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و بافر لیز عملکرد آزمایش را مهار می‌کنند. وجود مهارکننده در واکنش با وجود حضور ژن کنترل داخلی (β-گلوبین) قابل‌ردیابی است.

## خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسید نوکلئیک باید توسط کیت‌های جداسازی موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود.

مواد نمونه باید از سلول‌های نمونه‌برداری شده از دهانه و ترشح دستگاه ادراری تناسلی استخراج شده باشد. کیت استخراج DNA در این کیت گنجانده نشده است.

۱) برای نمونه‌های رحم، از وسیله مخصوص برای تراشیدن سلول‌های ضایعات دهانه استفاده کنید، نمونه حاصله را داخل ویال جمع‌آوری نمونه استریل، قرار دهید.

۲) نمونه‌های ترشح مجاری ادراری تناسلی، شامل مجرای ادراری مردان، دستگاه تناسلی زنان و ترشح مجرای ادراری است.

الف) برای مجرای ادراری مردان، یک سواب کوچک را در کانال مجرای ادرار به ابعاد ۲ تا ۴ سانتی متر قرار دهید، جهت جمع‌آوری ترشح، سواب را به آرامی در جهت عقربه‌های ساعت ۳ تا ۵ بار بچرخانید، سپس نمونه را در یک ویال استریل جمع‌آوری نمایید.

ب) برای دستگاه تناسلی زنان، از یک سواب استریل آغشته به سالین برای حذف ترشحات اضافی خارج از دهانه رحم استفاده کنید و یک برس استریل یا سواب پنبه‌ای را وارد کانال درون دهانه رحم کنید، به آرامی ۳ تا ۵ بار سواب را در جهت عقربه‌های ساعت بچرخانید تا ترشح دهانه رحم را جمع‌آوری کنید و سپس نمونه را در یک ویال استریل قرار دهید.

ج) برای مجرای ادراری زنان، از یک سواب برای شستن مجرای ادرار استفاده کنید و یک سواب استریل را دو سانتی متر در کانال مجرای ادرار قرار دهید، جهت جمع‌آوری ترشح، سواب را به آرامی در جهت عقربه‌های ساعت ۳ تا ۵ بار بچرخانید، سپس نمونه را در ویال جمع‌آوری نمونه استریل قرار دهید.

۳) نمونه‌ها باید با کیسه یخ زیر صفر درجه سانتی‌گراد منتقل شده و استخراج شوند تا بلافاصله DNA به دست آید. اگر DNA استخراج شده بلافاصله مورد استفاده قرار نگیرد، باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شود.

## آماده سازی و اضافه کردن الکو

به منظور انجام تست، به صورت جداگانه از میکس‌های آماده HPV که شامل دو مسترمیکس می‌باشد به میزان 15 µl به ازای هر واکنش به تیوب‌های واکنش اضافه نمایید. در مرحله بعد، ابتدا نمونه کنترل منفی را برای بررسی NTC به تیوب مورد نظر اضافه نموده، برای این کار، 5 میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز موجود در کیت را به تیوب کنترل منفی بی‌افزایید. پس از انتقال به منطقه کار با اسیدنوکلیک (استیشن آلوده)، به میزان 5 میکرولیتر از کنترل مثبت و 5 میکرولیتر از نمونه‌های بیمار را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید. سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید.

| Reaction Setup     | Volume |
|--------------------|--------|
| Mastermix A1 OR A2 | 15 µl  |
| Sample or Control  | 5 µl   |
| Final Volume       | 20 µl  |

جدول ۲. آماده سازی واکنش

## برنامه ریزی دمایی

دستورالعمل برای دستگاه‌های MIC و Rotor-Gene توصیف شده است. دیگر دستگاه‌های Real-Time PCR دارای کانال‌های Red (CY5), Orange (ROX or Texas Red), Green (FAM) و Yellow (HEX) نیز مناسب برای استفاده از این کیت هستند. پس از تنظیم کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه‌اندازی کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول صفحه بعد آورده شده است (جدول ۳)

|                                                                                                 | Temperature | Hold   | Cycle |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------|-------|
| Pre-Denaturation                                                                                | 95 °C       | 3 min  | 1     |
| Denaturation                                                                                    | 95 °C       | 10 sec | 45    |
| Annealing and Acquisition on Channel Green(FAM), Orange (Texas Red), Red (Cy5) and Yellow (HEX) | 55°C        | 30 sec |       |
| Extension                                                                                       | 72°C        | 20 sec |       |

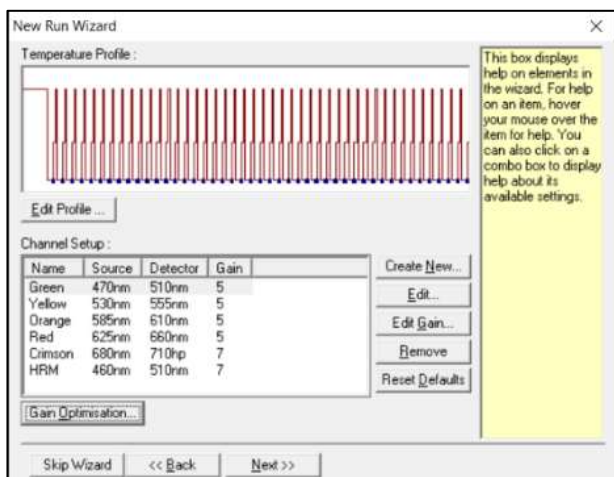
جدول ۳: برنامه دمایی دستگاه

علاوه بر این، لازم به ذکر است که کانال Yellow کیت در صورت عدم وجود رنگ یا فلوروفور HEX در دستگاه Real-Time PCR مورد استفاده، قابلیت ستاپ و تنظیم با فلوروفورهای VIC یا Joe نیز دارا است که می‌توانید برای پشتیبانی فنی و اطلاعات بیشتر با تلفن‌های شرکت تماس حاصل فرمایید.

## تعریف طیف سنجی فلورسنت در دستگاه‌ها

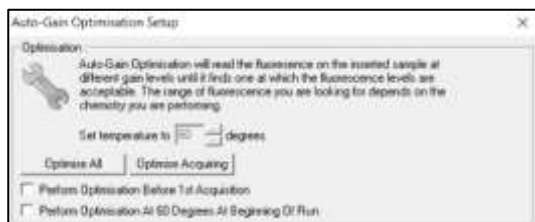
### دستگاه Rotor-Gene

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه‌ی Gain Optimization را انتخاب کنید (شکل ۱).



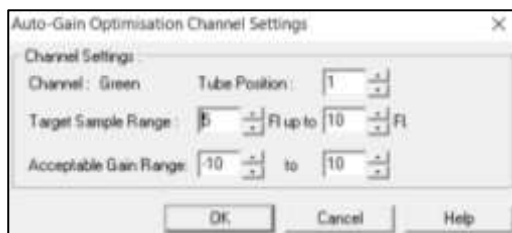
شکل ۱. تنظیمات دستگاه Rotor-gene

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimise Acquiring برای هر ۴ کانال سبز، زرد، نارنجی و قرمز، بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



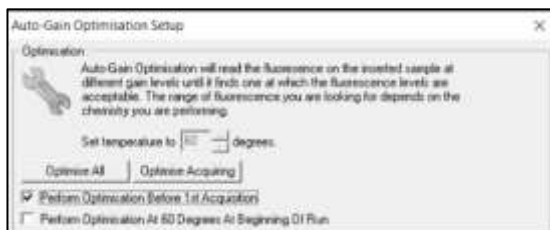
شکل ۲. تنظیمات دستگاه Rotor-gene

همچنین Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب حاوی HPVMaster A1 به همراه Positive Control کیت، انجام شود، بنابراین عدد نوشته شده در کادر Tube Position باید صحیح نوشته شده باشد. (شکل ۳)



شکل ۳. تنظیمات دستگاه Rotor-gene

پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی Perform Optimization Before 1st Acquisition را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۴)



شکل ۴. تنظیمات دستگاه Rotor-gene

## دستگاه MIC

بدین منظور در دستگاه MIC با انتخاب گزینه‌ی Run Profile پروفایل دمایی کیت را وارد کرده و در بخش cycling سنجش فلورسنت را در هر ۴ کانال فعال کنید (شکل ۵)



شکل ۵. تنظیمات دستگاه MIC

از آنجایی که Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب حاوی HPV Master A1 به همراه Positive Control کیت انجام شود، با باز کردن پنجره‌ی تنظیمات Gain برای کانال‌های مختلف، در کادر مربوط به تیوب Gain، گزینه All tube را از حالت پیش فرض به تیوب مورد نظر تغییر دهید (شکل ۶)



شکل ۶. تنظیمات دستگاه MIC

## آنالیز نتایج

۱. آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در ۴ کانال رنگی Green و Yellow و Orange و Red و یا انتخاب فلورفورهای FAM و HEX و TEX و CY5 پس از قرار دادن درصد حذف داده های پرت بر ۵٪، آستانه را در بازه ی مناسب قرار دهید.

۲. برای تفسیر نتایج، مطابق جدول زیر که در ادامه آورده شده است، عمل کنید. خوانش هر یک از میکس های ۱ و ۲ در هر یک از کانال های فلورسانس مشخص می کند کدام تایپ HPV در نمونه وجود دارد (جدول ۴).

|            | Green<br>(FAM) | Yellow<br>(HEX) | Orange<br>(ROX) | Red<br>(CY5) | Result                          |
|------------|----------------|-----------------|-----------------|--------------|---------------------------------|
| HR1<br>Mix | +              | -               | -               | -            | Pos: HPV16                      |
|            | -              | IC              | -               | -            | Beta-globin(IC)                 |
|            | -              | -               | +               | -            | Pos: HPV51 or 56 or 66          |
|            | -              | -               | -               | +            | Pos: HPV18                      |
| HR2<br>Mix | +              | -               | -               | -            | Pos: HPV33 or 58 or 52          |
|            | -              | +               | -               | -            | Pos: HPV6 or 11                 |
|            | -              | -               | +               | -            | Pos: HPV31 or 35 or 39<br>or 68 |
|            | -              | -               | -               | +            | Pos: HPV45 or 59                |

جدول ۴: تفسیر نتایج

بعد از آنالیز باید نتایج را به صورت زیر تفسیر کرد:

۱. نمونه زمانی مثبت می شود که دارای دو شرط زیر باشد.

A. دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی

B. Ct ، کمتر از ۴۰ برای ژنوتیپ های ۱۶ و ۱۸ و Ct، کمتر از ۳۵، برای سایر ژنوتیپ ها

۲. زمانی که منحنی سیگموئیدی نباشد جواب نمونه منفی خواهد بود.
۳. نمونه در میکس ۱ باید در کانال زرد که کنترل داخلی (IC) است، مثبت باشد. هر کدام از این شرایط برقرار نباشد، جواب از اعتبار کافی برخوردار نبوده و باید آزمایش دوباره تکرار شود.

## با توجه به موارد بالا ;

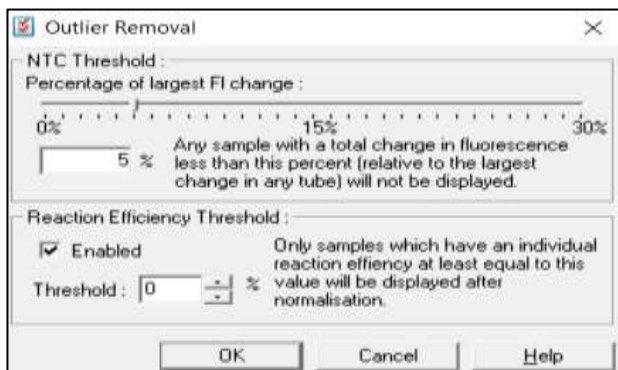
- A. نتیجه منفی یک نمونه مستلزم داشتن میکس ۱ مثبت در کانال زرد و جواب منفی برای بقیه میکس‌ها در کانال‌های دیگر است.
- B. نتیجه مثبت نیز نیازمند مثبت بودن IC با CT حدود ۲۰ تا ۳۰ است و جدول تفسیر نتایج پیش تر آورده شده است.

## نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف

### دستگاه Rotor-Gene

- آنالیز اطلاعات در دستگاه Rotor-gene 6000 و Rotor-gene 3000 باید توسط نرم‌افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.
۱. از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی یک رنگ، به طور مثال Green، دو بار کلیک کنید .
  ۲. با کلیک بر گزینه‌ی Outlier Removal، ترشلد NTC را بر ۵٪ تنظیم کرده و ترشلد افیشنسی واکنش را به شکل زیر فعال کنید.
  ۳. در این پنجره به نام Autofind Threshold دکمه Cancel را زده و در کانال Green آستانه را بر ۰/۰۲ تنظیم نمایید.

۴. مراحل بالا را برای کانال‌های دیگر Orange، Yellow و Red تکرار کرده و آستانه را بر ۰/۰۲ تنظیم کنید.



شکل ۷. تنظیمات دستگاه روتور برای حذف نویزها

#### دستگاه MIC PCR

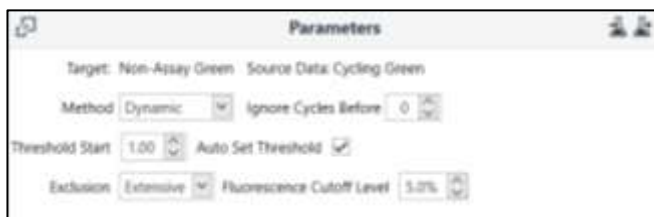
آنالیز اطلاعات در دستگاه Magnetic Induction Cycler (Mic) PCR توسط نرم‌افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.

۱. از منوی Analysis انتخاب کرده و روی یک رنگ، به طور مثال Non-Assay Green، کلیک کنید.

۲. در بخش Parameters به طور پیش فرض حالت Extensive برای Exclusion انتخاب شده است؛ و در بخش Fluorescence Cutoff Level بر ۵٪ تنظیم است. در غیر این صورت، این تنظیمات را وارد کنید.

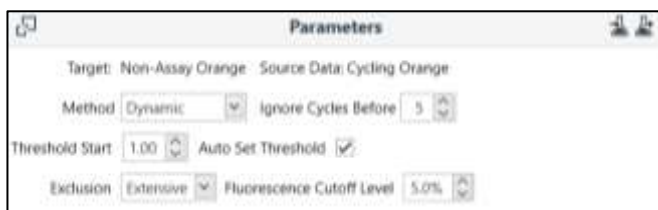
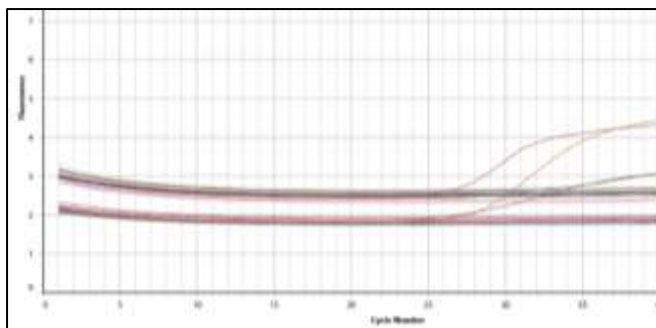
۳. انتخاب Threshold را به صورت اتوماتیک با فعال کردن گزینه‌ی Auto Set Threshold انجام دهید.

۴. مراحل بالا را برای کانال‌های دیگر Orange، Yellow و Red تکرار کنید.



شکل ۸. تنظیمات دستگاه MIC

۵. در صورت وجود نویز ابتدایی در بخش Data (شامل داده‌های خام) کانال Orange به شکل زیر، در بخش Parameters با قرار دادن عدد ۵ در کادر مقابل Ignore Cycles Before، ه



سیکل ابتدایی را نادیده گرفت.

شکل ۹. تنظیمات دستگاه MIC برای حذف نویزها

## ارزیابی آنالیتیکال

### حساسیت آنالیتیکال

با توجه به نتایج حاصله، حد پایین تشخیصی برای این کیت در تایپ‌های مختلف به شرح زیر است:

| Target            | LOD                |
|-------------------|--------------------|
| HPV33 or 58 or 52 | 250 copies per PCR |
| HPV31 or 35       | 300 copies per PCR |
| HPV39 or 68       | 350 copies per PCR |
| HPV45 or 59       | 550 copies per PCR |
| HPV16             | 180 copies per PCR |
| بتاگلوبین         | 50 copies per PCR  |
| HPV51 or 56 or 66 | 500 copies per PCR |
| HPV18             | 250 copies per PCR |

جدول ۵: مقدار LOD برای ژنوتایپ‌های مختلف

### اختصاصیت آنالیتیکال

به جهت بررسی اختصاصیت پرایمرها و پروب‌های محصول برای ویروس HPV، احتمال شناسایی غیراختصاصی دیگر عوامل عفونی مربوطه مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین انتخاب شرایط واکنش دقیق مورد تأیید نیز تضمین شده است. کیت مذکور با هیچ‌کدام از تایپ‌های HPV کم‌خطر واکنش متقاطع ندارد و آن‌ها را شناسایی نمی‌کند. همچنین، این کیت با DNA عوامل زیر، واکنش متقاطع ندارد. این عوامل معمولاً از دستگاه ادراری تناسلی جدا شده و بعضی نیز سبب بیماری می‌شوند:

|           |                                      |                        |
|-----------|--------------------------------------|------------------------|
| Bacterium | chlamydia trachomatis                | ureaplasma urealyticum |
|           | Streptococcus hemolyticus-β          | Enterococcus faecalis  |
|           | Clostridium sporogenes               | syphilis               |
|           | mycoplasma hominis                   | Bacillus pumilus       |
|           | Serratia marcescens subsp marcescens | neisseria gonorrhoeae  |

|           |                                    |                        |
|-----------|------------------------------------|------------------------|
|           | Salmonella enterica subsp enterica | Pseudomonas aeruginosa |
|           | Staphylococcus aureus subsp.aureus | Micrococcus luteus     |
|           | Escherichia coli                   |                        |
| Virus     | herpes simplex virus               |                        |
| Fungus    | Candida albicans                   | monilia albican        |
| Protozoan | trichomonas vaginalis              |                        |

جدول ۶: بررسی اختصاصیت آنالیتیکال

## ارزیابی کلینیکال

### حساسیت و اختصاصیت کلینیکال

برای تعیین حساسیت و اختصاصیت کلینیکال از ۲۰۰ نمونه مثبت و ۲۰۰ نمونه منفی استفاده شد که نتایج در جدول زیر نشان داده شده است:

| Target            | Sensitivity | Specificity |
|-------------------|-------------|-------------|
| HPV33 or 58 or 52 | 93%         | 98%         |
| HPV31 or 35       | 92%         | 98%         |
| HPV39 or 68       | 91%         | 98%         |
| HPV45 or 59       | 90%         | 97%         |
| HPV16             | 96%         | 100%        |
| HPV51 or 56 or 66 | 90%         | 96%         |
| HPV18             | 94.5%       | 100%        |

جدول ۷: ارزیابی کلینیکال

## پشتیبانی فنی

برای پشتیبانی فنی لطفاً با تلفن‌های شرکت تماس حاصل فرمایید .

|                                                                                   |                                 |                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------|
|  | Research Use Only               | برای مصارف پژوهشی |
|  | Catalog Number                  | کد کالا           |
|  | Batch Number                    | شماره بچ تولیدشده |
|  | Temprature Limitation           | محدودیت دمایی     |
|  | Concult Instructon For Use      | مطالعه دستورالعمل |
|  | Content sufficient for <n> tets | تعداد تست         |
|  | Use by                          | تاریخ انقضا       |
|  | Manufacturer                    | آدرس              |

## اطلاعات تماس

### شرکت فناوری بن یاخته- گروه سین مورو

دفتر مرکزی: تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار ۲۴ متری سعادت آباد، خیابان  
حیدرینیا (دوم شرقی)، پلاک ۹، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی: 1997775555    تلفن تماس: 02122082120

پشتیبان فنی: 09936693941 (قره داغی)

Web Site: [www.Senmurv.co](http://www.Senmurv.co)

Email: [info@senmurv.ir](mailto:info@senmurv.ir)