GeneovA

Always one step Ahead

راهنمای کیت تشخیص مولکولی ویروس پاپیلومای انسانی

نام محصول: GA 16Plex HPV Typing RT-PCR

کدمحصول: GA-HPV16.32

معرفی

ویروس پاپیلومای انسانی (HPV: Human Papilloma Virus) ویروس DNA دار بدون پوشش از خانواده پاپیلوما ویروس ها هستند، به دلیل اینکه این ویروس ها گرایش خاصی به سلول های اپیتلیال فلسی دارند باعث ایجاد ضایعات خوش خیم در پوست (زگیل ها) و غشاهای مخاطی (کاندیلوما) می شوند و برخی از تایپ های این ویروس باعث بدخیمی در بافت های اپیتلیالی به ویژه در دهانه رحم و سایر بافتهای دستگاه ادراری - تناسلی و سر و گردن می گردند. به دلیل ایجاد سرطان دهانه رحم به عنوان یکی از سرطان های شایع در خانمها، تشخیص به موقع بیماری در مراحل اولیه باعث جلوگیری از پیشرفت بیماری میگردد. کیت تشخیص کیفی GA 16Plex HPV Typing RT-PCR قادر به شناسایی ۱۶ تایپ پرخطر و رایج از ویروس پاپیلوما (۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۳، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶، ۶۷ و ۶۸) بر اساس شناسایی ژنهای E6 و E7 به روش Taqman Real Time PCR می باشد که می تواند در تشخیص دقیق تر عامل ایجاد کننده عارضه و بیماری کمک کننده باشد.

اساس تست

مخلوط پرایمر و پروب این کیت به صورت مولتی پلکس بوده که نواحی هدف از ژنهای E6 و E7 شانزده ژنوتیپ از ویروس HPV را در دو مخلوط جداگانه شناسایی می کند که در آن صورت توسط مخلوط واکنش موجود در کیت این نواحی تکثیر شده و آزاد سازی سیگنال فلورسنس ایجاد شده توسط دستگاه Real Time PCR مورد سنجش قرار می گیرد.

کنترل داخلی در این کیت شامل یک طراحی پرایمر و پروب اختصاصی برای ژن بتا ۲ میکروگلوبولین بصورت اندوژن می باشد که علاوه بر بررسی مراحل نمونه برداری و استخراج الگو، کیفیت قابل قبول DNA استخراج شده را مشخص می کند تا مانع از ایجاد نتایج منفی کاذب شود.

محتویات کیت

این کیت حاوی موارد مورد نیاز آزمایش به فرمت ۳۲ تستی بوده که به شرح زیر می باشد:

ردیف	محلول	مقادیر	تعداد
۱	GA HPV 16Plex Mastermix T1	۳۲۰ میکرولیتر	۱ ویال؛ تیوب ۱ (T1)
۲	GA HPV 16Plex Mastermix T2	۳۲۰ میکرولیتر	۱ ویال؛ تیوب ۲ (T2)
۳	GA HPV 16Plex Positive Control	۱۰۰ میکرولیتر	۱ ویال
۴	GA HPV 16Plex Negative Control	۱۰۰ میکرولیتر	۱ ویال

شرایط نگهداری

۱. دمای نگهداری این کیت ۵±20- C̊ می باشد.

۲. از فریز و دفریز شدن محلولهای موجود در کیت تا حد امکان خودداری کنید.

۳. مدت زمان استفاده از محتویات این کیت تا ۱ سال بعد از زمان تولید می باشد، تاریخ انقضاء کیت برروی کیت درج شده است.

دستگاههای هماهنگ با کیت

این کیت قابلیت انجام در تمامی دستگاههای Real Time PCR دارای کانال‌های FAM, HEX, ROX (سبز، زرد و نارنجی) را دارد.

مشخصات نمونه

۱. نمونه مورد استفاده در این کیت سوآب نمونه برداری شده از دهانه رحم و ترشحات آن، بلوک پارافینی، ترشحات و ضایعه زگیل در ناحیه تناسلی می باشد.

آماده سازی الگو پیش از آزمایش

الگو مورد نیاز برای انجام این تست، DNA ویروسی بوده که می توان طبق پروتکل استاندارد کیت های معتبر استخراج ژنوم ویروسی عمل کرد. DNA استخراج شده بصورت مستقیم قابل استفاده برای انجام آزمایش می باشد و در غیر اینصورت DNA استخراج شده را در دمای 20- C̊ نگه داری کنید. همچنین تا حد امکان از فریز و دفریز کردن مکرر نمونه DNA خودداری کنید.

آماده سازی مخلوط واکنش

محتویات کیت را از داخل جعبه آن خارج کنید و اجازه دهید تا به دمای اتاق رسیده و کاملا بصورت مایع در آیند. پس از رسیدن محلولها به دمای اتاق، چند ثانیه ویال ها را اسپین کنید و سپس طبق موارد زیر عمل کرده و برای هر نمونه دو تیوب واکنش را آماده کنید:

۱. به هر کدام از تیوب های واکنش اول ۱۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش GA HPV 16Plex Mastermix T1 (حاوی مواد مورد نیاز واکنش، پرایمر و پروب) و ۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز اضافه کنید.

۲. سپس به تیوب های واکنش دوم ۱۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش GA HPV 16Plex Mastermix T2 (حاوی مواد مورد نیاز واکنش، پرایمر و پروب) و ۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز اضافه کنید.

اضافه کردن الگو (DNA) به مخلوط واکنش

۳. پس از آماده سازی مخلوط های واکنش، مخلوط های حاصل را به منطقه تمیز انجام آزمایش منتقل کنید.

تیوب‌های نمونه‌های مجهول: به هر کدام از تیوب های واکنش اول و دوم، ۵ میکرولیتر الگو DNA اضافه کنید.

تیوب کنترل منفی: به هر کدام از تیوب های واکنش کنترل منفی، ۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز اضافه کنید.

سپس درب تیوب‌های ذکر شده را بسته و اسپین کنید (در صورت استفاده از دستگاه‌های Real Time PCR دارای روتور چرخان نیازی به اسپین کردن تیوب ها نمی باشد).

۴. **تیوب کنترل مثبت:** در یک فضای دیگر و دور از محوطه آماده سازی سایر مخلوط‌های واکنش به تیوب واکنش کنترل مثبت، ۵ میکرولیتر از مخلوط کنترل مثبت موجود در کیت اضافه کنید.

مواد مورد نیاز برای هر تست	میزان مورد نیاز برای هر تست
مخلوط واکنش GA HPV 16Plex Mastermix T1 و GA HPV 16Plex Mastermix T2 (FAM ,HEX, ROX)	**۱۰ میکرولیتر**
آب عاری از نوکلئاز	**۵ میکرولیتر**
الگو (DNA، کنترل منفی یا کنترل مثبت)	**۵ میکرولیتر**
حجم نهایی واکنش	**۲۰ میکرولیتر**

انجام واکنش Real Time PCR

۱. نام‌گذاری نمونه‌ها:

تیوب ها را داخل دستگاه Real Time PCR قرار داده و بعد از آن هر کدام از تیوب‌ها(نمونه های مجهول، کنترل مثبت و کنترل منفی) را نام گذاری کنید.

۲. انتخاب کانال سنجش:

- در تیوب اول، کانال سبز یا FAM را برای تشخیص ژنوتایپ های ۵۱، ۵۶، ۶۶، ۶۸، کانال زرد یا HEX برای تشخیص ژنوتیپ ۱۶ و کانال نارنجی یا ROX برای تشخیص ژنوتیپ ۱۸ را در دستگاه Real Time PCR انتخاب کنید
- در تیوب دوم، کانال سبز یا FAM را برای تشخیص ژنوتیپ های ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۲، ۵۸، ۵۹ و ۶۷، کانال زرد یا HEX برای تشخیص ژنوتیپ ۵۳ و کانال نارنجی یا ROX را برای تشخیص کنترل داخلی انتخاب کنید.

۳. برنامه دمایی و زمانی واکنش مورد نظر مطابق با شرایط جدول زیر می باشد:

برنامه دمایی و زمانی استاندارد کیت GA 16Plex HPV Typing RT-PCR				
ترتیب واکنش	مرحله		دما	زمان	تعداد سیکل
۱	Holding		۳۷C̊	۲دقیقه	۱
۲	Holding		۹۵C̊	۵ دقیقه	۱
۳	PCR cycling	Denaturation	۹۵C̊	۵ ثانیه	۴۶ سیکل
۴		Annealing, Extension and fluorescence measurement	۶۰C̊	۲۵ ثانیه	

پس از ایجاد برنامه و تنظیمات جدید ، فایل مورد نظر را ذخیره و شروع انجام واکنش را راه‌اندازی کنید.

تحلیل نتایج

پس از انجام و خاتمه واکنش، نتایج ذخیره شده را مطابق با جدول زیر آنالیز کنید:

مراحل	حالت مورد نظر	رد یا قبول بودن واکنش
مرحله اول بررسی کنترل منفی	بدون گراف تکثیر یا سینگال سیگموئیدی با میزان فلورسنس غیر قابل قبول در هر کدام از کانال ها	قبول- عدم آلودگی مخلوط واکنش
	داشتن سیگنال سیگموئید و Cq بالاتر از ۴۰ در هر کدام از کانال ها	قبول با یک شرط- در این حالت تنها نمونه های بیماران دارای Cq با فاصله حداقلی ۶ سیکل از آلودگی در کانال مربوطه را می‌توان به عنوان نمونه‌های دارای ژنوم ویروس مورد قبول دانست.
	داشتن سیگنال سیگموئید و Cq بالاتر از ۳۵ در هر کدام از کانال ها	قبول با شرط- در این حالت تنها نمونه های دارای Cq با فاصله حداقلی ۶ سیکل از آلودگی در کانال مربوطه را می توان به عنوان نمونه‌های دارای ژنوم ویروس مورد قبول می باشند
	داشتن سیگنال سیگموئید و Cq کمتر از ۳۵ در هر کدام از کانال ها	رد واکنش و تکرار دوباره واکنش بعد از حذف آلودگی- هرکدام از کانال ها با داشتن آلودگی Cq کمتر از ۳۵ قابل تفسیر نمی باشند.
مرحله دوم بررسی کنترل مثبت	داشتن سیگنال سیگموئید و Cq کمتر از ۳۵ در همه کانال ها	قبول- عملکرد صحیح پرایمر و پروب، مخلوط واکنش و عدم تخریب کنترل مثبت یا دیگر اجزای واکنش که نشان از نگهداری صحیح آن دارد.
	داشتن سیگنال سیگموئیداما Cq بالاتر از ۳۵ در هر کدام از کانال ها	رد واکنش- تخریب کنترل مثبت یا یکی دیگر از اجزای واکنش که نشان از عدم نگهداری صحیح آن دارد. در صورت مثبت بودن نمونه های تحت بررسی می توانید از این عیب صرف نظر کنید.
مرحله سوم بررسی نمونه های مجهول	تیوب اول	کانال FAM: درصورت داشتن سیگنال سیگموئیدی و Cq کمتر از ۴۰ ، نمونه از نظر وجود ویروس HPV مثبت و شامل یک یا چند مورد از تایپ های ۵۱، ۵۶، ۶۶ و ۶۸ می باشد.
		کانال HEX: درصورت داشتن سیگنال سیگموئیدی و Cq کمتر از ۴۰ ، نمونه از نظر وجود ویروس HPV مثبت و از نوع تایپ ۱۶ می باشد.
		کانال ROX: در صورت داشتن سیگنال سیگموئیدی و Cq کمتر از ۴۰ ، نمونه از نظر وجود ویروس HPV مثبت و از نوع تایپ ۱۸ می باشد.
	تیوب دوم	کانال FAM: درصورت داشتن سیگنال سیگموئیدی و Cq کمتر از ۴۰ ، نمونه از نظر وجود ویروس HPV مثبت و شامل یک یا چند مورد از تایپ های ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۲، ۵۸، ۵۹ و ۶۷ می‌باشد.
		کانال HEX: در صورت داشتن سیگنال سیگموئیدی و Cq کمتر از ۴۰ ، نمونه از نظر وجود ویروس HPV مثبت واز نوع تایپ ۵۳ می باشد
		کانال ROX: در صورت داشتن سیگنال سیگموئیدی و Cq کمتر از ۳۵ که نشان از نمونه گیری و استخراج ژنومی درست می باشد و در غیر این صورت نمونه گیری و استخراج ژنومی تکرار شود.

حد آستانه مثبت

با توجه به مطالعه مقدار مرجع، Cq مرجع برای ژن های مورد نظر تا مقدار ۴۰ با داشتن شرایط ذکر شده قابل قبول است.

محدودیت‌های روش تشخیص

۱. زمان نمونه گیری و انجام نمونه گیری نامناسب، انتقال نادرست، پردازش نامناسب نمونه، شرایط بد نگهداری کیت، عدم صحیح انجام واکنش توسط کاربر می تواند باعث ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.

۲. آلودگی نمونه به بعضی مواد یا داروهای خاص و یا آلودگی در حین پردازش نمونه می تواند باعث ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.

۳. امکان ایجاد جهش و تغییرات توالی هدف در ویروس HPV می تواند یکی از دلایل ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.

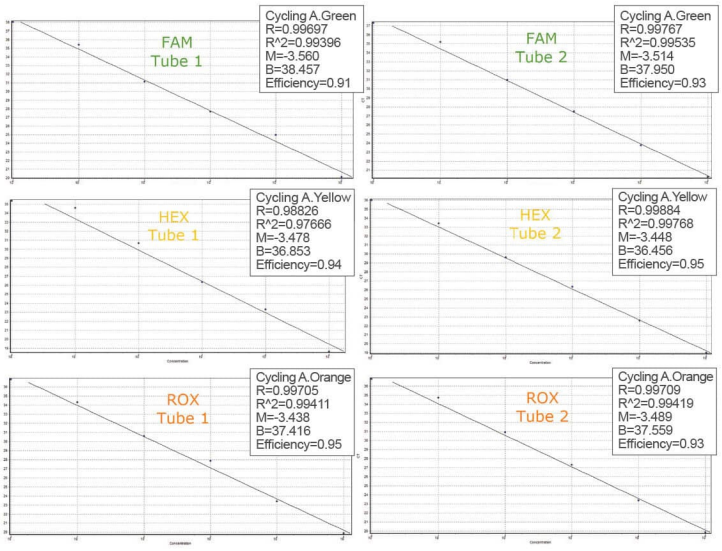
۴. آزمایش باید طبق پروتکل سازنده کیت و در شرایط Good Laboratory Practice انجام شود.

عملکرد و ارزیابی محصول

پرایمر و پروب های این کیت براساس توالی ژنی‌های محافظت شده E6 و E7 اختصاصی ویروس HPV طراحی شده است و توانایی بالایی در شناسایی این توالی از خود نشان داده است. همچنین طراحی انجام شده هیچ واکنش متقاطعی با دیگر توالی های ژنومی انسانی، ویروسی و باکتریایی در تست in silico از خود نشان نداده است.

جدول نمونه ارزیابی بالینی کیت GA 16Plex HPV Typing RT-PCR

نمونه ویروس	نتیجه با کیت های مشابه COBAS HPV TEST INNO-LiPA AB ANALITICA	GA 16Plex HPV Typing RT-PCR
۸۰ نمونه مثبت HPV تیپ ۱۶	۸۰ جواب مثبت	۸۰ جواب مثبت
۲۸ نمونه مثبت HPV تیپ ۱۸	۲۸ جواب مثبت	۲۸ جواب مثبت
۶۰ نمونه مثبت HPV از تیپ های ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۳، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶، ۶۷ و ۶۸	۶۰ جواب مثبت	۶۰ جواب مثبت
۲۰ نمونه منفی از نظر HPV	۲۰ جواب منفی	۲۰ جواب منفی



نمودار استاندارد پرایمر و پروب های کیت GA 16Plex HPV Typing RT-PCR در کانال های جداگانه تیوب اول و دوم

Analytical Sensitivity کیت (LoD) برای ژن ژنوتیپ ۱۶ و ۱۸ برابر با ۵۰۰ کپی در هر واکنش با تکرار ۲۰ تایی است. Sensitivity Diagnostic کیت بالاتر از ۹۵ درصد می باشد و رنج دینامیک و رنج خطی کیت موجود برابر با 10^1 تا 10^9 می باشد. عرض از مبدا واکنش (میزان Cq قابل قبول در کمترین کپی) در سیکل ۴۰ بوده و ضریب همبستگی واکنش (r^2) یا میزان تطابق با منحنی استاندارد در حدود ۰,۹۹ درصد می باشد. همچنین بازده واکنش در کانال های مختلف برابر با ۹۱ تا ۹۵ درصد است.

خطرات و پیشگیری

۱. لطفا پیش از استفاده راهنمای کیت را با دقت مطالعه کنید. پرسنل آزمایشگاه باید آموزش دیده و آشنایی کامل با روند و خطرات دستگاه ها را داشته باشند. تمام وسایل و امکانات باید پیش از استفاده استریل بوده و این وسایل جابه جایی بین بخش های مختلف PCR در آن دیده نشود. در واقع هر بخش باید وسایل و مواد مختص به خود را داشته باشد. به همراه این کیت، لوازم نمونه گیری، نگهداری نمونه و استخراج ژنوم وجود ندارد و در زمان انجام تست توصیه می شود از تیپ های فیلتردار استفاده شود.

۲. این کیت تنها قابلیت استفاده در شرایط آزمایشگاهی را دارد و کاربرد دیگری برای آن متصور نیست. همچنین کنترل کیفی برای هر آزمایش انجام شود.

۳. مدیریت آزمایشگاه طبق دستورالعمل‌های آزمایشگاه های مولکولی انجام گیرد. تمام نمونه ها باید به صورت بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند و باید در یک فصا یا هود با کلاس ایمنی زیستی سطح II نمونه مورد پردازش قرار گیرد. پرسنل تمامی تمهیدات لازم مانند تجهیزات حفاظت شخصی(PPE) که شامل استفاده از دستکش‌های یکبار مصرف، عینک، گان یا روپوش آزمایشگاهی می‌شود را رعایت کند. به همراه این کیت لوازم نمونه گیری، نگهداری نمونه، استخراج ژنوم، سرسمپلر و لوازم محافظتی شخصی مورد نیاز وجود ندارد که لازم است قبل از استفاده تهیه شود.

۴. پرسنل در طی انجام مراحل استخراج یا آماده سازی مخلوط واکنش، دستکش های خود را بین هر مرحله باید مرتب تعویض کند تا از ایجاد آلودگی های کاذب کننده در روند آزمایش جلوگیری کند. مراحل کار باید طبق شرایط استاندارد آزمایشگاه در پیشگیری از ایجاد آلودگی و عفونت انجام گیرد. همچنین شرایط دفع زباله های عفونی این تست به مانند دیگرعوامل بیماری زا می باشد.

۵. شرایط نگهداری این کیت به مدت ۷ روز در دمای یخچال یا در پک های یخی می باشد که برای نگهداری طولانی مدت و حفظ نیمه عمر محصول آن را در دمای ۲۰- °C قرار دهید.

mabnaGene مبنا ژن پارس
مشاوره، راه اندازی، تجهیز و تامین کلیه اقلام بخش مولکولی

تهران، اشرفی اصفهانی، جنب درمانگاه بهراد، ساختمان شماره ۵۴، طبقه دوم واحد ۴، تلفکس : ۹-۴۴۰۰۰۱۵۸

Do not use after the year, month and date mentioned	Manufacturer	Do not re-use
Upper limit of temperature	Keep away from sunlight	Temperature limit
Read Instructions before Use	REF Cataloq number	LOT Batch code
IVD in vitro diagnostic	Σ Sufficient for	Manufactuing date