

راهنمای کیت HPV HR RQ4

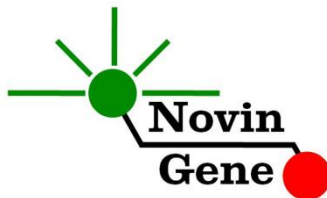
جهت تشخیص ۱۴ تایپ پرخطر و ۲ تایپ کم خطر ویروس
پاپیلومای انسانی به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-37-00

ویرایش ۱/۱

بهار ۱۳۹۹



فهرست مندرجات

۱. مقدمه..... ۲
۲. محتویات کیت..... ۳
۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت..... ۳
۴. سایر موارد مورد نیاز..... ۴
۵. نکات قابل توجه..... ۴
۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن..... ۵
۷. استخراج DNA..... ۵
۸. کنترل داخلی..... ۶
۹. دستور کار PCR..... ۶
۱۰. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۷
۱۱. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۸
۱۲. آنالیز نتایج Rotor-Gene..... ۸
۱۳. میزان حساسیت..... ۱۴

کیت HPV HR RQ4 جهت کار با دستگاه Rotor-Gene و به منظور تشخیص ۱۴ تایپ پرخطر (۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶ و ۶۸) و ۲ تایپ کم خطر (۶ و ۱۱) ویروس پاپیلومای انسانی می‌باشد. این کیت مخصوص مصارف تحقیقاتی است.

۱. مقدمه

ویروس پاپیلومای انسانی (Human Papilloma Virus, HPV)، متعلق به خانواده پاپیلوماویریده (Papillomaviridae) است. این ویروس فاقد غشا بوده و ژنوم آن متشکل از DNA دو رشته ای به طول حدود هشت هزار جفت باز می‌باشد. بیش از ۱۵۰ تایپ انواع ویروس HPV تا کنون شناسایی شده است. عفونت مخاط دستگاه تناسلی با این ویروس به عنوان اصلی ترین عامل ابتلا به سرطان رحم در نظر گرفته میشود. بر اساس مطالعات انجام شده، ویروسهای این خانواده به سه دسته پرخطر (High-Risk)، کم خطر (Low-Risk) و بی خطر (No-Risk) تقسیم می‌شوند. در حال حاضر ۱۴ تایپ ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶ و ۶۸ به عنوان پرخطر و ۶ تایپ ۶، ۱۱، ۴۲، ۴۳ و ۴۴ به عنوان کم خطر دسته بندی می‌شوند.

کیت حاضر امکان بررسی نمونه جهت تشخیص ۱۴ تایپ پرخطر شامل تایپ‌های ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶ و ۶۸ و ۲ تایپ کم خطر شامل تایپ‌های ۶ و ۱۱ ویروس پاپیلومای انسانی را به روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. در این روش با استفاده از پروب‌های فلورسنت می‌توان محصول واکنش را بررسی نمود بدون این که پس از پایان آن نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. بنابراین امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene طراحی شده است. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می باشد که علاوه بر کنترل کیفیت استخراج نمونه، از گزارش منفی کاذب حاصل از مهار واکنش نیز پیشگیری می کند.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک لوح فشرده و مواد زیر می باشد:

حجم	محتوا	برچسب
۴۸۰ میکرولیتر	میکس آماده برای PCR*	HPV HR1 Mix
۴۸۰ میکرولیتر	میکس آماده برای PCR*	HPV HR2 Mix
۴۸۰ میکرولیتر	میکس آماده برای PCR*	HPV HR3 Mix
۴۸۰ میکرولیتر	میکس آماده برای PCR*	HPV HR4 Mix
۱۰۰ میکرولیتر	شاهد مثبت	Pos Ctrl
۱۰۰ میکرولیتر	شاهد منفی	Neg Ctrl
۲۰۰ میکرولیتر	آب مخصوص PCR	Water

* ۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

۴. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA
- تیوب ۱/۷ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۵. نکات قابل توجه

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- **هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.**
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.
- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.

- هنگام استفاده، مواد کیت را روی یخ خرد شده نگه دارید تا کاملاً ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگه داری کنید. از استفاده از یخ های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک آلومینیوم از پیش سرد شده گذاشته، و از گذاشتن آنها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش با این کیت، می تواند پاپ اسمیر باشد یا سایر نمونه های مشابه که حاوی میزان کافی از سلولهای مخاطی دهانه یا گردن رحم است. نمونه را میتوان برای مدت کمتر از ۸ ساعت در یخچال و برای زمان های طولانی تر در فریزر یا دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. نمونه در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیترو ویروس در آن ثابت می ماند.

۷. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه روش ها و کیت های مختلفی در دسترس می باشند. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می کنیم:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat# 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۸. کنترل داخلی

برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار واکنش و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، این کیت حاوی کنترل داخلی می‌باشد. به این منظور پرایمرها و پروب مخصوص یک ژن انسانی به HR1 Mix افزوده شده است که در صورت عملکرد مناسب باید به تولید فلورسانس با تابش نارنجی (ROX) و CT بین ۲۰ تا ۳۰ منجر شود. برای توضیحات بیشتر به بخش آنالیز رجوع کنید.

۹. دستورکار PCR

کیت محتوی ۴ نوع میکس متفاوت می‌باشد که هر میکس ۴ تایپ ویروس پاپیلوما را تشخیص می‌دهد. بنابراین هر نمونه باید با تمامی ۴ میکس کیت آزمایش شود تا امکان تشخیص ۱۶ تایپ مورد نظر ویروس پاپیلوما فراهم شود.

ابتدا تمامی لوله‌ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

چهار سری لوله مخصوص PCR، هر سری برای یکی از میکس‌های PCR روی بلوک سرد بگذارید. در هر سری علاوه بر یک لوله برای هر یک از نمونه‌ها، ۳ لوله نیز برای شاهد‌های مثبت و منفی، و نمونه آب یا NTC در نظر بگیرید. به عنوان مثال برای آزمایش ۵ نمونه، به ۲۰ لوله برای نمونه‌ها و ۱۲ لوله برای شاهد‌ها نیاز داریم که مجموعاً ۳۲ لوله خواهد بود که به صورت ۴ سری ۸ تایی مرتب شده‌اند.

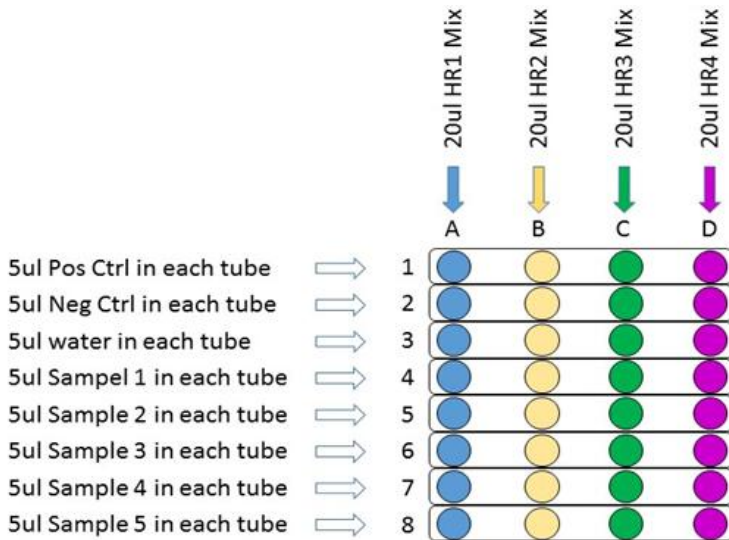
به هر یک از لوله‌های سری اول ۲۰ میکرولیتر از **HPV HR1 Mix** اضافه کنید.

به هر یک از لوله‌های سری دوم ۲۰ میکرولیتر از **HPV HR2 Mix** اضافه کنید.

به هر یک از لوله‌های سری سوم ۲۰ میکرولیتر از **HPV HR3 Mix** اضافه کنید.

به هر یک از لوله‌های سری چهارم ۲۰ میکرولیتر از **HPV HR4 Mix** اضافه کنید.

سپس ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده، **شاهد** یا آب به هر لوله اضافه کنید. به این منظور یک لوله در هر سری را برای هر نمونه یا **شاهد** در نظر بگیرید.



درپوش لوله‌ها را ببندید. سپس آن‌ها را مطابق شماره‌ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۰. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق بزنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

در لوح فشرده همراه کیت در فولدر HPV HR RQ4 روی فایل HPV HR RQ4 0.2 strip و یا HPV HR RQ4 strip (با توجه به نوع لوله استفاده شده) دوبار کلیک کنید تا برنامه باز شود.

در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در پوشه مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود.

در پنجره نمونه‌ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای تمامی نمونه‌ها unknown را انتخاب کنید.

۱۱. تنظیم سایر دستگاه‌ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه‌های Real-Time PCR استفاده می‌کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

اندازه‌گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ‌های FAM و VIC و ROX و Cy5 تنظیم شود. توجه داشته باشید که HPV HR Mix فاقد ROX به عنوان نرمال کننده است. لذا گزینه استفاده از این رنگ به عنوان نرمال کننده (normalizer) باید غیرفعال باشد.

۱۲. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Quantitation, Analysis را انتخاب کرده و روی Green کلیک کنید. در پنجره autofind threshold دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. مراحل بالا را برای کانالهای Yellow، Orange و Red تکرار کرده و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. برای تفسیر نتایج ابتدا به جدول زیر توجه کنید. این جدول نشان می‌دهد که هر یک از میکس‌های ۱ تا ۴، در هر یک از کانالهای فلورسانس کدام تایپ را تشخیص می‌دهند.

	Green	Yellow	Orange	Red
HR1 Mix	16	6/11	Albumin	33
HR2 Mix	18	39	59	56
HR3 Mix	31	52	66	58
HR4 Mix	35	51	68	45

با توجه به جدول بالا نتایج را اینگونه می‌توان تفسیر نمود:

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می‌شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی و CT کمتر از ۴۰ باشد. در

غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود. همچنین CT بالاتر از ۴۰ نیز مثبت محسوب نمی شود.

همچنین، کنترل داخلی نمونه همیشه باید مثبت باشد یعنی نمونه باید با میکس ۱ در کانال نارنجی همواره مثبت و دارای CT بین ۲۰ تا ۳۰ باشد. در غیر اینصورت یعنی چنانچه نمونه با میکس ۱ در کانال نارنجی منفی باشد یا CT آن بالاتر از ۳۰ باشد، جواب نامعتبر است و آزمایش باید تکرار شود.

نتیجه منفی: در صورتیکه نمونه فقط در **کانال نارنجی** و با میکس ۱ مثبت باشد و با بقیه میکس ها در تمامی کانالها منفی باشد، نمونه **منفی** می باشد.

نتیجه مثبت: در صورتیکه نمونه در کانال نارنجی با میکس ۱ با CT حدود ۲۰ تا ۳۰ مثبت باشد، آنگاه:

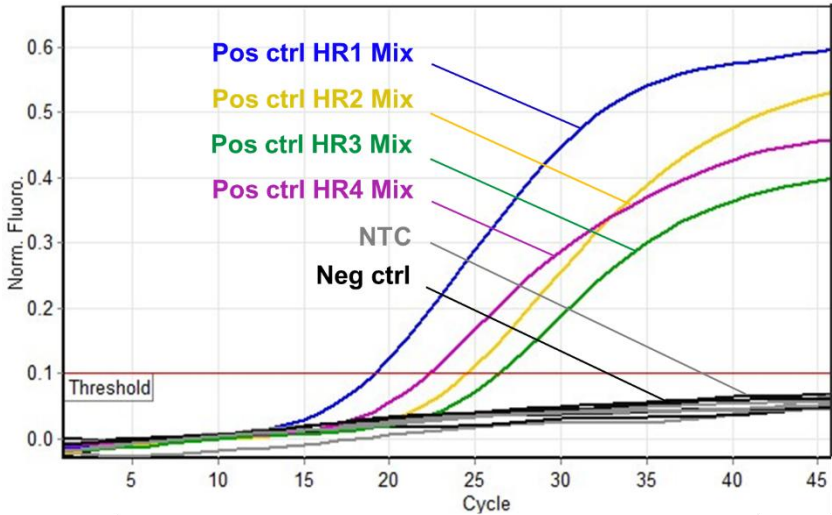
- در صورتی که نمونه در **کانال سبز** و با میکس ۱ مثبت باشد، برای **HPV16** مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال زرد** و با میکس ۱ با CT کمتر از ۳۵ مثبت باشد، برای **HPV6** یا **HPV11** مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال قرمز** و با میکس ۱ مثبت باشد، برای **HPV33** مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال سبز** و با میکس ۲ مثبت باشد، برای **HPV18** مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال زرد** و با میکس ۲ مثبت باشد، برای **HPV39** مثبت می باشد.

- در صورتی که نمونه در **کانال نارنجی** و با میکس ۲ مثبت باشد، برای **HPV59** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال قرمز** و با میکس ۲ مثبت باشد، برای **HPV56** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال سبز** و با میکس ۳ مثبت باشد، برای **HPV31** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال زرد** و با میکس ۳ مثبت باشد، برای **HPV52** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال نارنجی** و با میکس ۳ مثبت باشد، برای **HPV66** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال قرمز** و با میکس ۳ مثبت باشد، برای **HPV58** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال سبز** و با میکس ۴ مثبت باشد، برای **HPV35** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال زرد** و با میکس ۴ مثبت باشد، برای **HPV51** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال نارنجی** و با میکس ۴ مثبت باشد، برای **HPV68** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال قرمز** و با میکس ۴ مثبت باشد، برای **HPV45** مثبت می‌باشد.

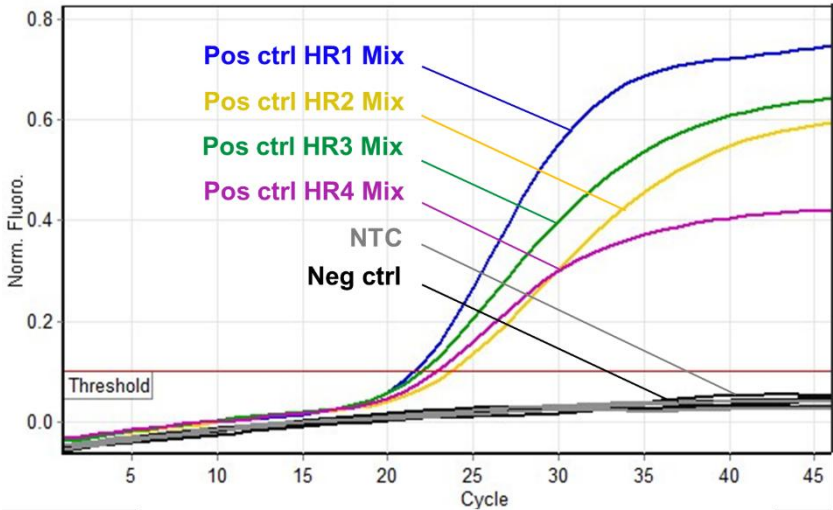
توضیحات بالا به صورت خلاصه در جدول صفحه بعد نشان داده شده اند:

	Green	Yellow	Orange	Red	Result
HR1 Mix	+	-	IC	-	Pos: HPV16
HR1 Mix	-	+ CT<35	IC	-	Pos: HPV6 or 11
HR1 Mix	-	-	IC	+	Pos: HPV33
HR2 Mix	+	-	-	-	Pos: HPV18
HR2 Mix	-	+	-	-	Pos HPV39
HR2 Mix	-	-	+	-	Pos: HPV59
HR2 Mix	-	-	-	+	Pos: HPV56
HR3 Mix	+	-	-	-	Pos: HPV31
HR3 Mix	-	+	-	-	Pos: HPV52
HR3 Mix	-	-	+	-	Pos: HPV66
HR3 Mix	-	-	-	+	Pos: HPV58
HR4 Mix	+	-	-	-	Pos: HPV35
HR4 Mix	-	+	-	-	Pos: HPV51
HR4 Mix	-	-	+	-	Pos: HPV68
HR4 Mix	-	-	-	+	Pos: HPV45

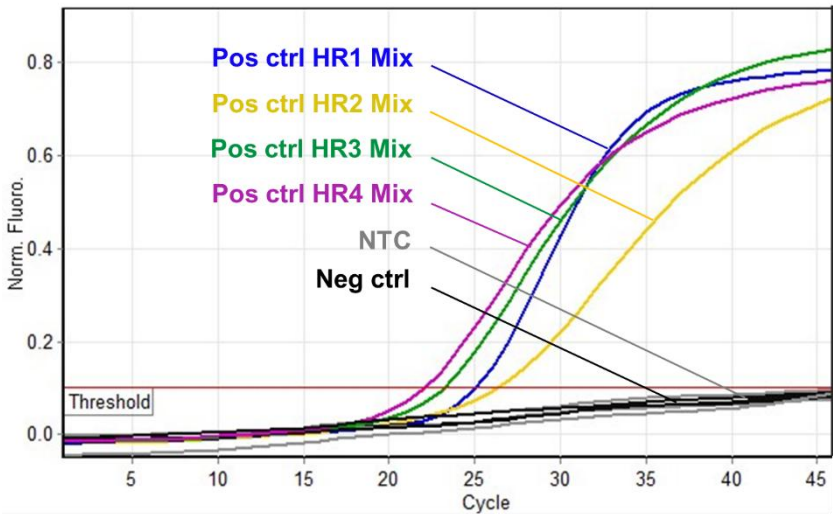
برای مشاهده گراف مورد انتظار شاهد‌ها و کنترل داخلی تصاویر ۱ تا ۴ را ملاحظه فرمایید.



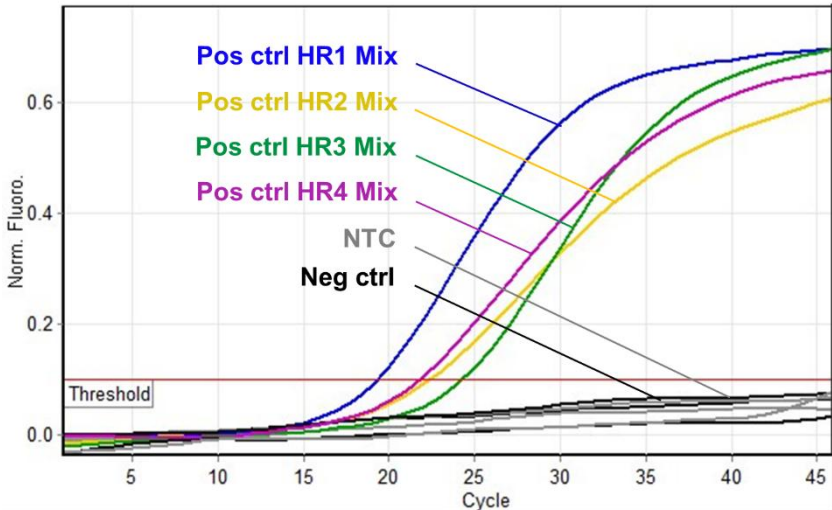
شکل ۱. منحنی شاهد‌ها در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. منحنی شاهدها در کانال زرد دستگاه روتورژن



شکل ۳. منحنی شاهدها در کانال نارنجی دستگاه روتورژن



شکل ۴. منحنی شاهدها در کانال قرمز دستگاه روتورژن

۱۳. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم پاپیلوما ویروس انسانی تایپ ۱۶ بررسی شده و معادل ۵۰ کپی در میکرولیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیترو ویروس در نمونه بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیترو نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

HPV HR RQ4 Kit Manual

**For Real-Time PCR Detection of
14 High Risk and 2 Low Risk Human Papilloma
Virus (HPV) Types**

For use with Rotor-Gene
Research use only

NG-WI-ASL-37-00
Version 1.1
Spring 2020

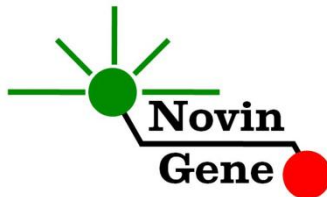


Table of Contents:

1. Introduction.....	2
2. Kit Contents.....	2
3. Storage and Stability.....	3
4. Additionally Required Materials.....	3
5. General Precautions.....	3
6. Specimen, storage and transport	4
7. DNA isolation.....	4
8. Internal control (IC).....	4
9. PCR Protocol.....	5
10. Programming Rotor-Gene	6
11. Programming Other Machines	6
12. Data Analysis: Rotor-Gene.....	6
13. Sensitivity.....	12

HPV HR RQ4 kit is intended for use with Rotor-Gene machine and for the detecting DNA of 14 High Risk Types (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68) and 2 Low Risk Types (6 and 11) of Human Papilloma virus. This kit is for research use only.

1. Introduction

Human Papilloma Virus (HPV) is a Non-enveloped double stranded DNA virus from papillomaviridae family. There are about 150 different types of HPV. HPV infection is considered the main cause of cervical cancer and has been linked to more than 99% of all cases. According to data linking HPV infection to cervical cancer, HPV types have been divided into three groups of High-Risk, Low-Risk and No-Risk. Currently 14 types of 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68 are considered High-Risk and 6 types considered Low-Risk including 6, 11, 42, 43, 44 and 53.

HPV HR RQ4 kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection of HPV DNA including 14 High Risk Types of 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68 and 2 Low Risk Types of 6 and 11 with RotorGene machine. In this method, application of fluorescent dye labeled probes allows detection of amplified product without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product.

This kit also incorporates an *Internal Control* (IC) to evaluate DNA extraction quality or PCR inhibition.

2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with Rotor-Gene templates and following reagents:

Label	Content	Quantity
HPV HR1 Mix	PCR Master mix*	480 µl
HPV HR2 Mix	PCR Master mix*	480 µl
HPV HR3 Mix	PCR Master mix*	480 µl
HPV HR4 Mix	PCR Master mix*	480 µl
Pos Ctrl	Positive Control	100 µl
Neg Ctrl	Negative Control	100 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits.

3. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws more than few times to prevent reduced sensitivity.

4. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Table top microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Adjustable pipettors and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

5. General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- **Treat all samples as potentially infectious.**

- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the master-mix is aliquoted into tubes and c) Reaction preparation area for addition of extracted DNA to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components on ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Do not place 0.2ml PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

6. Specimen, Storage and Transport

Pap-smear or collection of cervicovaginal cells can be used for DNA extraction. Sample should be shipped at +4°C and upon receipt should be stored at +4°C for few hours or aliquoted and stored at -20°C for up to few weeks.

7. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend the following:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

8. Internal Control (IC)

To examine DNA extraction quality as well as the presence of PCR inhibitors and to prevent false negative results, primers and probe for an *Internal Control* (a housekeeping gene) is included in

HPV HR1 Mix. With a proper sample, successful DNA extraction and PCR, Internal control should generate a CT of 20-30. Refer to analysis section for more details.

9. PCR Protocol

This kit contains 4 different PCR mixes, each for detection of 4 of HPV types. Therefore, each sample should be examined with all 4 mixes.

First, thaw the reagents on ice completely followed by a brief mixing and a quick spin. Place 4 series of tubes on cold block. Each series should include one tube for each sample plus three for positive control, negative control and no template control (NTC).

For example for examining 5 samples, 20 tubes for samples and 12 tubes for controls are required. There for a total of 32 tubes arranged in 4 series of 8 tubes each.

Pipette 20µl of HPV HR1 Mix to each of PCR tubes in the first series.

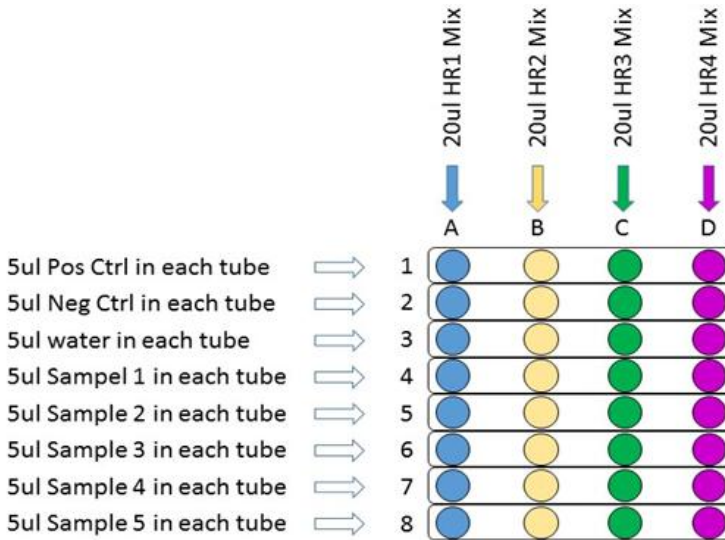
Pipette 20µl of HPV HR2 Mix to each of PCR tubes in the second series.

Pipette 20µl of HPV HR3 Mix to each of PCR tubes in the third series.

Pipette 20µl of HPV HR4 Mix to each of PCR tubes in the forth series.

Then add 5ul of extracted DNA, Pos Ctrl, Neg ctrl or water to each tube.

consider the first tube in each series for the first sample, second tube in each series for the second sample and continue respectively for the remaining samples or for the controls.



Cap the tubes and visually inspect to make sure all are capped securely. Place tubes in the machine.

Note: If using RotorGene attach the locking ring.

10. Programming Rotor-Gene

Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!

CD provided in the kit. Open the HPV HR RQ4 folder then double click on HPV HR RQ4 0.2 or HPV HR RQ4 strip template depending on used tubes. Program starts. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window, click start again and save program on desired location.

11. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1 cycle
2	95°C x 15 sec	45 cycles
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM, VIC, ROX and Cy5 dyes.

Please note that, HPV HR Mixes does not contain ROX dye as normalizer!

12. Data Analysis: Rotor-Gene

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on analysis menu and then under Quantitation tab double click on cycling A. Green. Close the pop up window for Automatic Threshold and set the threshold at 0.1.

Repeat the above for Cycling A. Yellow and Orange and Red. To interpret the results, please, note the following table. It shows each of the 4 mixes, detects which of the HPV in each channel.

	Green	Yellow	Orange	Red
HR1 Mix	16	6/11	Albumin	33
HR2 Mix	18	39	59	56
HR3 Mix	31	52	66	58
HR4 Mix	35	51	68	45

According to the above table, results can be interpreted as below:

Note that a sample is considered Positive only if it has a log phase and sigmoid graph with a CT less than 40. In the absence of log phase and a sigmoid graph and with a CT of above 40, sample can not be considered as Positive.

Please note that, for a valid result, each sample should be positive in Orange channel with CT of 20-30. When a sample is Negative in Orange channel or has a CT above 30, results are not valid and test should be repeated.

Negative Result: A sample is **Negative** if it is **only** positive with **HR1 Mix** in **Orange** channel and remains negative for all other mixes-channels combinations.

Positive Result: If a sample is positive with HR1 Mix in **Orange** channel with CT of 20-30, then:

- It is **Positive for HPV16** if it is positive in **Green** channel with **HR1 Mix**.
- It is **Positive for HPV6 or 11** if it is positive with CT<35 in **Yellow** channel with **HR1 Mix**.
- It is **Positive for HPV33** if it is positive in **Red** channel with **HR1 Mix**.
- It is **Positive for HPV18** if it is positive in **Green** channel with **HR2 Mix**.
- It is **Positive for HPV39** if it is positive in **Yellow** channel with **HR2 Mix**.
- It is **Positive for HPV59** if it is positive in **Orange** channel with **HR2 Mix**.
- It is **Positive for HPV56** if it is positive in **Red** channel with **HR2 Mix**.
- It is **Positive for HPV31** if it is positive in **Green** channel with **HR3 Mix**.

- It is **Positive for HPV52** if it is positive in **Yellow** channel with **HR3 Mix**.
- It is **Positive for HPV66** if it is positive in **Orange** channel with **HR3 Mix**.
- It is **Positive for HPV58** if it is positive in **Red** channel with **HR3 Mix**.
- It is **Positive for HPV35** if it is positive in **Green** channel with **HR4 Mix**.
- It is **Positive for HPV51** if it is positive in **Yellow** channel with **HR4 Mix**.
- It is **Positive for HPV68** if it is positive in **Orange** channel with **HR4 Mix**.
- It is **Positive for HPV45** if it is positive in **Red** channel with **HR4 Mix**.

Above results are summarized in following table:

	Green	Yellow	Orange	Red	Result
HR1 Mix	+	-	IC	-	Pos: HPV16
HR1 Mix	-	+ CT<35	IC	-	Pos: HPV6 or 11
HR1 Mix	-	-	IC	+	Pos: HPV33
HR2 Mix	+	-	-	-	Pos: HPV18
HR2 Mix	-	+	-	-	Pos HPV39
HR2 Mix	-	-	+	-	Pos: HPV59
HR2 Mix	-	-	-	+	Pos: HPV56
HR3 Mix	+	-	-	-	Pos: HPV31
HR3 Mix	-	+	-	-	Pos: HPV52
HR3 Mix	-	-	+	-	Pos: HPV66
HR3 Mix	-	-	-	+	Pos: HPV58
HR4 Mix	+	-	-	-	Pos: HPV35
HR4 Mix	-	+	-	-	Pos: HPV51
HR4 Mix	-	-	+	-	Pos: HPV68
HR4 Mix	-	-	-	+	Pos: HPV45

Figures 1, 2, 3 and 4 represent typical graphs for Rotor-Gene machine.

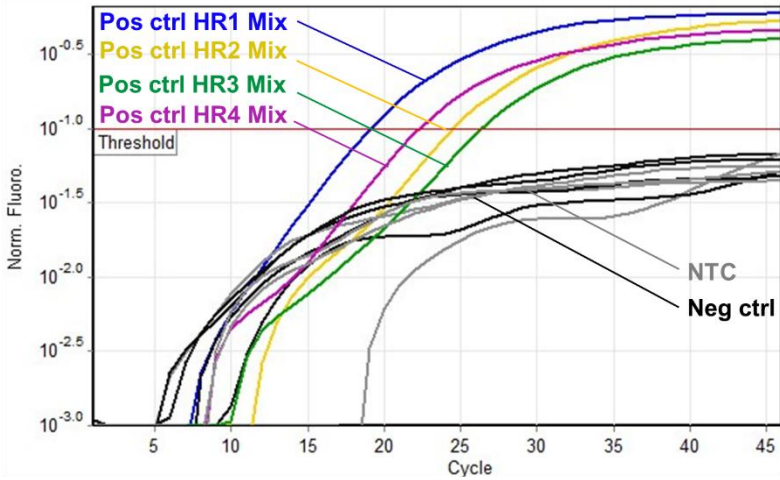


Fig 1. Typical HPV HR graph in Green channel for Rotor-Gene

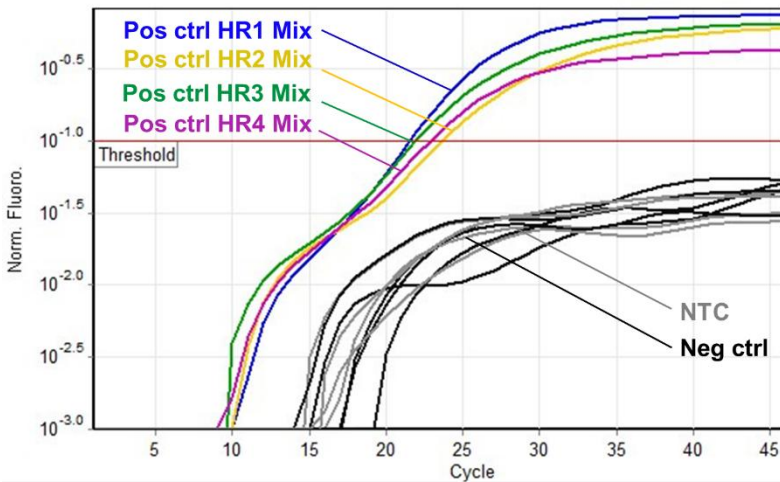


Fig 2. Typical HPV HR graph in Yellow channel for Rotor-Gene

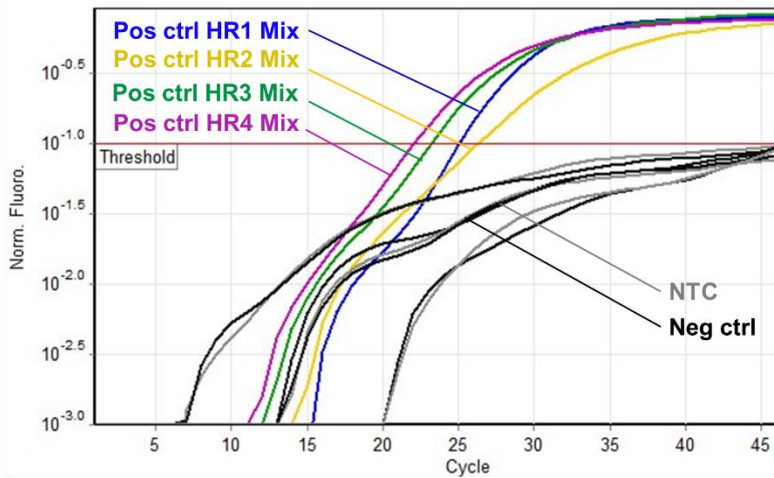


Fig 3. Typical HPV HR graph in Orange channel for Rotor-Gene

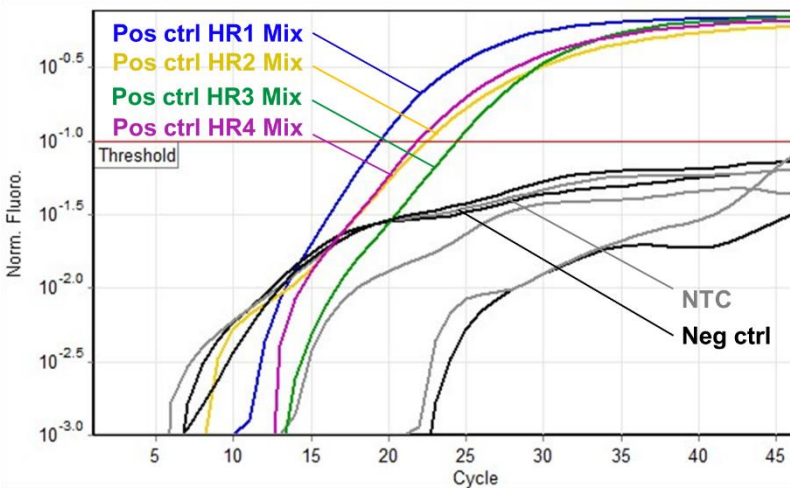


Fig 4. Typical HPV HR graph in Red channel for Rotor-Gene

13. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the cloned HPV 16 target and the detection limit was determined as 50 copy/ μ l.

