

مقدمه :

عفونت تناسلی با ویروس **DNA** دار پاپیلوما انسانی یکی از شایع ترین بیماری های مقاربتی (**STD**) با علت ویروسی در سراسر جهان است که در ۲۰٪ الی ۴۶٪ زنان جوان فعال جنسی در کشورهای مختلف دیده می شود. سالانه تقریباً ۱۴ میلیون مورد ویروس پاپیلوما انسانی (**HPV**) جدید تشخیص داده شده و به آمار مبتلایان اضافه می گردد.

این ویروس می تواند زمینه ساز ابتلا به سرطان دهانه رحم شود که دومین سرطان شایع در بین زنان سراسر جهان است.

ژنوتیپ های **HPV** بر اساس شناسایی درجات مختلف نئوپلازی درون اپیتلیال دهانه رحم به انواع پرخطر و انواع با خطر متوسط و کم خطر تقسیم می شوند. چندین روش برای تشخیص عفونت بالینی **HPV** وجود دارد: مشاهده، غربالگری سیتولوژیک به روش پاپ اسمیر، میکروسکوپ الکترونی، ایمونو هیستوشیمی و روش های مولکولی.

از میان این روش ها تنها روش مولکولی دارای حساسیت لازم و کافی می باشد .

تشخیص مستقیم **DNA** ویروس پاپیلوما از طریق **PCR** در نمونه های بالینی مانند سواب دهانه رحم، شستشوی دهانه رحم، بیوپسی های یخ زده و بافت های پارافینه یا بافتهای تثبیت شده با فرمالین، نمونه ادرار و نمونه مردان با ارزش ترین و دقیق ترین روش تشخیص به شمار می رود.

کاربرد:

کیت **HPV R&M** مبتنی بر روش **Real Time PCR** به منظور تعیین 24 ژنوتایپ **HPV**، ۱۴ ژنوتایپ پرخطر ویروس پاپیلوما انسانی (۱۶، ۱۸، ۳۳، ۳۹، ۵۹، ۶۶، ۳۱، ۵۲، ۵۱، ۵۸، ۶۸، ۵۶، ۴۵، ۳۵) و 4 ژنوتایپ **Intermediate** (۳۳، ۲۶، ۶۷، ۷۳) و ۶ ژنوتایپ کم خطر (۴۰، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۱۱) در نمونه های بیولوژیکی ذکر شده است.

اساس روش:

کیت فوق بر اساس بررسی شدت فلورسانس ساطع شده در حین واکنش **Real Time PCR** و جهت تشخیص در شرایط آزمایشگاهی طراحی شده است.

برای جلوگیری از بوجود آمدن اتصالات غیر اختصاصی پرایمر و پروب ها در کیت فوق از آنزیم **Hot Start Tag DNA Polymerase** استفاده شده است که در حالت عادی غیر فعال بوده و با قرار گرفتن در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه فعال می گردد (مرحله اول برنامه ی دمایی کیت).

توالی هدف شناسایی این کیت ژن های **E6 – E7** مربوط به ۲۴ تایپ از ویروس **HPV** در ۷ ویال است که بصورت **Multiplex** طراحی شده اند.

شناسایی کیت **HPV R&M** شامل دو بخش یا روش اساسی می باشد:

۱- استخراج **DNA** از نمونه ها

۲- **Multiplex Real Time PCR** در 7 ویال برای هر نمونه

Florescent channels	FAM	HEX	ROX
Reaction mix			
HA FRP1	16	18	33
HA FRP2	68	56	45
HA FRP3	31	52	51
HA FRP4	39	59	66
HA FRP5	35	58	IC
HA FRP6	53	26/67	73
HA FRP7	6	40/42/43/44	11

هشدارها:

- نمونه هایی که بصورت چشمی کدر و دارای سلول های زیادی هستند نیازی به مرحله ی رسوب گیری قبل از استخراج ندارند اما در مورد نمونه های دارای سلول کم و شفاف یا نمونه ی مردان و ادرار و نمونه های بدون براش بهتر است رسوب گیری قبل از استخراج انجام گیرد.
- لطفاً به هیچ عنوان مستر میکس ها و **FRP** ها را جهت نگهداری و سهولت کار با هم میکس نکنید.

- ❖ مواد مثبت استخراج شده (نمونه ها و کنترل ها) را به دور از سایر معرف ها نگهداری کنید.
- ❖ قبل از شروع آزمایش، تمامی محلولها را به طور کامل در دمای اتاق ذوب کنید.
- ❖ هنگام کار با نمونه ها و معرف ها از دستکش یکبار مصرف، روبوش آزمایشگاهی و محافظ چشم استفاده کنید.
- ❖ تمام نمونه ها و معرف های استفاده نشده را مطابق با دستورالعمل های دفع پسماند دفع کنید.
- ❖ نمونه ها باید به طور بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند.
- ❖ با استفاده از یک ضد عفونی کننده مانند هیپوکلریت سدیم ۰.۵ درصد، تمام نمونه ها یا معرف های ریخته شده را تمیز و ضد عفونی کنید.
- ❖ از تماس نمونه یا معرف با پوست، چشم و غشاهای مخاطی خودداری کنید، در صورت تماس فوراً با آب بشویید و به پزشک مراجعه کنید

محتویات کیت :

HA100G 		FAM/HEX/ROX
500 λ	۱ ویال	FRP1: 16/18/33
500 λ	۱ ویال	FRP2: 68/56/45
500 λ	۱ ویال	FRP3: 31/52/51
500 λ	۱ ویال	FRP4: 39/59/66
500 λ	۱ ویال	FRP5: 35/58/IC
500 λ	۱ ویال	FRP6: 53/26.67/73
500 λ	۱ ویال	FRP7: 6/40.42.43.44/11
1000 λ	7 ویال	Master mix
500 λ	۱ ویال	کنترل مثبت کیت (PC)
500 λ	۱ ویال	کنترل منفی کیت (NC)
	۱ عدد	بروشور کیت

برای جلوگیری از وجود نتایج منفی کاذب کیت **HPV R&M** حاوی کنترل داخلی (ژن بتا گلوبین انسانی) است که در صورت عدم صحت نمونه گیری (ناکافی بودن سلولهای اپیتلیال یا زیاد بودن مقدار مخاط روی سواب) کنترل داخلی تشخیص داده نخواهد شد.

وسایل و مواد مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

- ۱- وسایل و مواد مورد نیاز برای استخراج
- ۲- وسایل و مواد مورد نیاز برای **Real Time PCR**

شرایط نگهداری :

- بلافاصله پس از تحویل گرفتن کیت آن را در فریزر و دمای ۱۶- قرار دهید.
- تمامی محلولهای موجود در کیت می بایست دور از نور، گرما یا رطوبت نگهداری شوند.
- از انجماد و ذوب مکرر معرف ها اجتناب شود، زیرا ممکن است حساسیت و پایداری کیت را کاهش دهد.

پایداری کیت:

کیت فوق تا تاریخ انقضای درج شده بر روی برجسب کیت پایدار است.

جداسازی DNA:

از هر کیت تجاری استخراج **DNA**، در صورت داشتن تأییدیه های لازم با توجه به انواع نمونه ها می توان استفاده کرد.

برای استفاده از کیت لازم است مراحل ذیل با دقت و ترتیب ذکر شده انجام گیرد:

۱. ورتکس و اسپین مختصر ویال های مستر میکس
۲. آماده سازی میکروتیوب یا کپ استریپ ها به تعداد لازم

(۷ ویال به ازای هر بیمار) (۷ ویال به ازای هر کنترل)

۳. طبق جدول زیر میکس‌های اصلی را آماده سازی کنید:

Reaction Mix Final volume	N: تعداد بیماران هر سری آزمایش	۲: کنترل مثبت + کنترل منفی		
15 λ (N+2)	5 λ	HA FRP1	10 λ	Master mix
15 λ (N+2)	5 λ	HA FRP2	10 λ	Master mix
15 λ (N+2)	5 λ	HA FRP3	10 λ	Master mix
15 λ (N+2)	5 λ	HA FRP4	10 λ	Master mix
15 λ (N+2)	5 λ	HA FRP5	10 λ	Master mix
15 λ (N+2)	5 λ	HA FRP6	10 λ	Master mix
15 λ (N+2)	5 λ	HA FRP7	10 λ	Master mix

- نتایج نامعتبر

در صورت عدم تقاطع منحنی سیگموئیدی با خط آستانه (Threshold line) نتایج در تمامی کانالها نامعتبر بوده و از مرحله استخراج باید تکرار انجام گیرد.

- نمونه منفی معتبر

عدم تعیین CT در هر هفت مستر کانالهای FAM, HEX, ROX در صورت داشتن منحنی سیگموئیدی مناسب برای مستر ۵ در کانال ROX (کنترل داخلی) که از خط آستانه (Threshold line) عبور کند نمونه به عنوان نمونه منفی تلقی میگردد.

- نمونه منفی نامعتبر

در میکس 5 در کانال ROX (مربوط به کنترل‌های داخلی) اگر مقدار CT تعیین نشده و یا از حد مرزی عبور کند و یا منحنی سیگموئیدی مربوط به کنترل‌های داخلی با خط آستانه (Threshold line) محل تقاطعی نداشته باشد نتیجه نامعتبر بوده و باید از مرحله استخراج DNA تکرار شود.

- کنترل مثبت

باید در تمامی کانالها منحنی سیگموئیدی مناسب داشته و از خط آستانه عبور کند.

- کنترل منفی

هیچ گونه نموداری در هیچ کدام از کانالها نباید داشته باشد.

❖ با توجه به عدم خوانش کیت در ۵ سیکل اولیه، Ct قابل قبول کیت

HPV HR RoSTin، Ct≤30 می‌باشد.

❖ در مورد CT های بالاتر از ۳۰ نمونه‌ها در صورت داشتن تکرار پذیری

مثبت تلقی میشوند.

اختصاصیت آنالیتیکال (Cross Reactivity):

اختصاصیت کیت HPV RoSTin با انتخاب پرایمرها و پروب‌های خاص تضمین شده تشابه احتمالی توالی پرایمر و پروب‌ها با استفاده از تکنیک مقایسه توالی با تمام توالی‌های منتشر شده در بانک‌های ژنی بررسی شده است.

بررسی‌های داده‌های حاصل از انجام Cross Reactivity، بیانگر عدم وجود واکنش متقاطع با میکروارگانسیم‌ها و ژنوتیپ‌های مورد آزمایش می‌باشد. پاتوژن‌های مورد بررسی شامل موارد ذیل می‌باشد:

- DNA HPV نسبت به انواع دیگر، به ویژه ژنوتیپ‌هایی که در کیت قنابل

شناسایی نمی‌باشند.

- نایسریا گونوره، کلامیدیا تراکوماتیس، مایکوپلاسما جنیتالیوم، مایکوپلاسما

هومینیس، استرپتوکوک آگالاکتیه، کاندیدا آلبیکنز، اوره پلاسما اورثالیتیکوم

- HIV-1

حساسیت آنالیتیکال:

حساسیت کیت با استفاده از نمونه‌های کلون شده بخشی از ژنوم ۱۴ ژنوتایپ پرخطر ویروس پاپیلوماوی انسانی که برای تشخیص در این کیت بکار رفته معادل ۴۰ کپی در میلی لیتر (40 Copies/ml) محاسبه شد، یعنی در ۱۰۰٪ موارد اگر تیر ویروس بیش از این میزان باشد کیت قادر به تشخیص آن است. در صورت کاهش تیر ویروس به کمتر از این میزان، کیت با ضریب اطمینان کمتری قادر به شناسایی خواهد بود.

آدرس محل تولید	
تاریخ تولید	
شماره کاتالوگ	REF
تعداد تست مورد استفاده	
شماره رسته تولید	LOT
حداقل و حداکثر دمای نگهداری	
تاریخ انقضاء	
دستورالعمل استفاده	
محصول آزمایشگاهی	IVD

تکمیل و بسته بندی:

سلامت پژوهان راستین

تهران، بلوار اباد، مجتمع اداری آیسان، واحد ۲۰۳

تلفن: ۰۲۱-۴۴۰۰۴۵۴-۶

۴. ورتکس و اسپین مختصر هر ویال از میکس‌های تهیه شده

۵. برای هر بیمار ۷ ویال (ویال‌های با حجم ۰.۲ ml یا ۰.۱ ml بسته به نوع دستگاه ریل تایم) آماده کنید و به ترتیب ۱۰ λ از master mix و ۵ λ از FRP به ویال مربوط به آن اضافه کنید.

۶. افزودن ۱۰ λ از DNA استخراج شده به هر ویال

۷. ورتکس و اسپین مختصر ویال‌ها

۸. حجم نهایی مورد استفاده برای هر واکنش کیت ۲۵ λ می‌باشد.

۹. برای کنترل مثبت: از ویال PCHR مقدار ۱۰ λ به هر ۷ ویال مربوط به کنترل مثبت اضافه کنید.

۱۰. برای کنترل منفی: از ویال NCHR مقدار ۱۰ λ به هر ۷ ویال مربوط به کنترل منفی اضافه کنید.

برنامه دمایی کیت			
تکرار	زمان	دما (°C)	مرحله
1	10 min	95	1
5	5 Sec	95	2
	30 Sec	60	
	15 Sec	72	
40	5 Sec	95	3
	30 Sec	60* Fluorescent Detection	
	15 Sec	72	

*خوانش در FAM (سبز)، HEX (زرد)، ROX (نارنجی)،

آنالیز نتایج:

- سیگنالهای تکثیر DN تایپ‌های ۱۶،۶۸،۳۱،۳۹،۳۵،۵۳،۶ در کانال FAM/Green در صورت عبور منحنی‌های سیگموئیدی فوق از خط آستانه (Threshold line) مثبت تشخیص داده می‌شوند.

- سیگنالهای تکثیر DNA تایپ‌های ۱۸،۵۶،۵۲،۵۹،۵۸،۲۶،۶۷،۴۰،۴۲،۴۳،۴۴ در کانال JOE/Yellow/HEX در صورت عبور منحنی‌های سیگموئیدی فوق از خط آستانه (Threshold line) مثبت تشخیص داده می‌شوند.

- سیگنالهای تکثیر DNA تایپ‌های IC ۷۳، ۱۱، ۶۶، ۵۱، ۴۵، ۳۳ در کانال ROX/Orange در صورت عبور منحنی‌های سیگموئیدی فوق از خط آستانه (Threshold line) مثبت تشخیص داده می‌شوند.

- کنترل داخلی

کیت تشخیص مولکولی ژنوتیپهای پرخطر پاپیلوما ویروس

HPV 24 Genotyping Real Time PCR kit

REF HA100G