

HPV High Risk Type NAT Reagents DNA Kits

(Real time PCR: PCR Fluorescence Probing)

for detection and genotyping of Human Papillomavirus
(16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68)

راهنمای کاربری
ویرایش: 01

قبل از شروع به استفاده از کیت، حتما دفترچه راهنما را به دقت مطالعه کنید.

نام محصول: HPV High Risk Type NAT Reagents DNA Kits

مدل کیت: 24 tests

حیطه کاربرد: سنجش مولکولی، جهت شناسایی نوعی از ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) که دارای ریسک بالای ایجاد سرطان میباشند.



25 Reaction

Manual: Version: NMG-01

<https://novinmedco.com/>

En-A-Dr-Y

تهران، میدان جمهوری، برج شهاب 1، طبقه 5، واحد 156 شماره تماس 02166381160

مقدمه:

عفونت دستگاه تناسلی با ویروس پاپیلوما انسانی (HPV) یکی از شایع ترین بیماری های مقاربتی (STD) در سراسر جهان است (20٪ - 46٪ در کشورهای مختلف در زنان جوان فعال از نظر جنسی). سرطان دهانه رحم دومین سرطان شایع زنان در سراسر جهان می باشد. مجموعه ای از یافته های بالینی، اپیدمیولوژیک، مولکولی و تجربی رابطه سرطان گردنه رحم و نئوپلاستیک دهانه رحم را با برخی از ژنوتیپ های HPV منتقله از راه جنسی را در سراسر جهان ثابت کرده است. بر اساس فراوانی تشخیص ژنوتیپ های HPV از درجات مختلف (تغییر شکل سلولی) نئوپلاستیک سلول های اپیتلیال دهانه رحم (CIN Grades I - III)، ژنوتیپ های HPV به انواع پرخطر (16، 18، 31، 33، 35، 39، 51، 52، 56، 58، 59، 66، 68، 45)، انواع HPV با خطر متوسط (73، 53، 26، 67، 82) و انواع کم خطر (6، 11، 42، 44، 70، 81، 72، 43، 54، 40، 91، 61) تقسیم می شود.

روش های مختلفی برای تشخیص عفونت بالینی یا تحت بالینی HPV شامل معاینه بالینی بیمار، غربالگری سیتولوژیک با پاپ اسمیر و ایمونوسیتوشیمی وجود دارد اما این روش ها دارای معایبی همچون غیر استاندارد بودن تشخیص بر اساس ذهن و حساسیت ناکافی در پیش بینی تشخیص هستند. دقیق ترین راه تشخیص HPV، تشخیص مستقیم DNA ویروس پاپیلوما انسانی توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز است. اکنون مشخص شده است که 99٪ موارد سرطان دهانه رحم به دلیل عفونت با دوازده ژنوتیپ ویروس پاپیلوما انسانی (HPV) است که توسط PCR قابل شناسایی می باشد.

شناسایی این ژنوتیپ های پرخطر و خطر متوسط در مدیریت کارسینوم دهانه رحم، به عنوان یک شاخص مهم در پیش آگهی فرد مبتلا می باشد. نتایج حاصل از ترکیب پاپ اسمیر (تست غربالگری غیر قطعی) و تست HPV DNA می تواند به شناسایی فرد مبتلا با انواع پرخطر و خطر متوسط ویروس پاپیلوما انسانی جهت تشخیص زودهنگام بیماری کمک کند. روش های مبتنی بر PCR جهت تشخیص و تعیین ژنوتیپ های HPV، با نمونه های بالینی مانند سواب یا خراش های دهانه رحم، شستشوی دهانه رحم (سیتولوژی بر پایه لیکوئید)، بیوپسی های منجمد و بافت های پارافین شده با بافت در داخل فرمالین قابل انجام است.

اساس روش انجام کار:

روش انجام کیت **HPV High Risk Type NAT Reagents DNA Kits** مبتنی بر دو فرآیند اصلی 1- جداسازی DNA از نمونه ها هر کیت تجاری استخراج DNA، در صورت تاییدیه های لازم و با کیفیت قابل قبول) و 2- تکثیر مالتیپلکس به روش ریل تایم پی سی ار (Taq man Probe) در 4 لوله برای هر نمونه می باشد. کیت فوق 14 ژنوتایپ با خطر بالای انکوژنیک ویروس پاپیلوما انسانی را بر اساس شدت فلورسانس ساطع شده در حین فرایند انجام تست در زمان واقعی شناسایی می کند. از آنجایی که ویروس پاپیلوما انسانی یک عامل درون سلولی می باشد، برای جلوگیری از نتایج منفی کاذب، نیاز به دقت در اجرای فرایند بالادستی (استخراج) می باشد. برای تایید فرایند استخراج و جلوگیری از موارد ذکر شده، کیت حاوی کنترل داخلی (ژن انسانی) است که امکان کنترل حضور



25 Reaction

Manual: Version: NMG-01

<https://novinmedco.com/>

En-A-Dr-Y

DNA در نمونه را فراهم می کند. اگر سوآب به درستی تهیه نشود (مقدار زیاد مخاط یا مقدار ناکافی سلول های اپیتلیال) کنترل داخلی در فرایند PCR تشخیص داده نمی شود. و نمونه گیری مجدد (در صورت تایید کنترل مثبت و مشاهده نمودارهای سیگنالی در ریل تایم) توصیه می گردد.

کیت نوین تشخیص با برند نوین مانا به طراحی و تولید کیت تشخیص ژنوتایپ های پاپیلوما ویروسی در ناحیه اختصاصی E6-E7 به صورت Multiplex پرداخته است بدین منظور جهت استفاده از کیت مذکور به موارد ذیل لطفا توجه فرمایید.

کانال های فلورسانس استفاده شده در کیت: FAM- HEX/JOE- ROX- Cy5

Fluorescence channel	FAM	HEX/JOE	ROX	Cy5
Reaction Mix	Amplification product			
PCR-Mix HPV 1	HPV genotype 16	HPV genotype 18	HPV genotype 52	HPV genotype 56
PCR-Mix HPV 2	HPV genotype 58	HPV genotype 66	HPV genotype 31	housekeeping gene (IC)
PCR-Mix HPV 3	HPV genotype 33	HPV genotype 35	HPV genotype 68	HPV genotype 51
PCR-Mix HPV 4	HPV genotype 39	HPV genotype 45	HPV genotype 59	housekeeping gene (IC)

تجهیزات مورد نیاز برای انجام تست

- دستگاه ریل تایم PCR
- میکروتیوب به صورت استریپ 8 تایی-4 تایی
- میز کار ملکولی
- سمپلر و سرسمپلر های استریل
- رک میکروتیوب
- هود کلاس II لامینار

شرایط نگهداری

- شرایط نگهداری کیت در دمای فریزر میباشد (20°C- الی 10°C-)
- ماندگاری کیت در دمای یخچال (4°C) حدودا 1 هفته میباشد
- لطفا پس از فرایند مخلوط کردن پرایمر میکس با مسترمیکس حداکثر تا یک ماه محتویات را استفاده کنید و در هر بار استفاده در دمای 20°C- قرار دهید.
- در صورت مخلوط نکردن پرایمر میکس با مسترمیکس میتوان به تعداد بالاتری محتویات را فریز و دفریز کرد. ترجیحا در هر بار استفاده محتویات مستر میکس و پرایمر میکس را مخلوط کنید و مابقی را در دمای 20°C- نگهداری کنید.(به طور کلی از انجماد و ذوب مکرر معرف ها خوداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و پایداری کیت میشود)
- تمامی محلول ها بی موجود در کیت دور از گرمانور، و رطوبت قرار گیرد.

محتویات کیت:



Contents of the kit	
Primer mix 1-4	125µl(4tube)
HPV-Mastermix/14	1 ml (1tube)
HPV-Positive control	200 µl
HPV-Negative Control	200 µl



25 Reaction

Manual: Version: NMG-01

<https://novinmedco.com/>

En-A-Dr-Y

دستوالعمل فرایند انجام تست :

حجم کل واکنش 20 میکرولیتر میباشد (5 میکرولیتر نمونه (DNA) + 15 ماکرولیتر پرایمر میکس و مسترمیکس)

- کیت شامل 4 میکروتیوب پرایمر میکس و 1 میکروتیوب مستر میکس میباشد. ابتدا 250 لاندا از مسترمیکس به هر میکروتیوب پرایمر میکس اضافه میکنیم (قبل از اضافه کردن مسترمیکس به پرایمر ها لطفاً به مقدار لازم مسترمیکس را ورتکس نمایید و سپس تقسیم کنید). و یا به ازای هر نمونه قبل از فرایند، محاسبه و به اندازه مورد نیاز مسترمیکس و پرایمر میکس ها را مخلوط میکنیم (شرایط بهینه با ماندگاری بالا).
- بعد از اضافه کردن مسترمیکس به پرایمر ها (میکروتیوب های 1-4 Primer mix) برای همگن شدن به ارامی ورتکس یا شیک نمایید و یک میکروپیوژ کوتاه انجام داده و به مقدار 15 لاندا به ازای هر بیمار به داخل استریپ بریزید (با توجه به اینکه 4 پرایمر میکس دارید باید به ازای هر فرد یک استریپ قرار داده و از هر پرایمر میکس (1-4) به مقدار 15 لاندا به استریپ - میکروتیوب (0.1 یا 0.2 بستگی به دستگاه ریل تایم دارد) اضافه کنید).
- سپس 5 میکرولیتر نمونه DNA را به هر چاهک استریپ (به ازای هر فرد) که حاوی پرایمر میکس مشخص از 1 تا 4 میباشد اضافه کرده و درب استریپ را ببندید. بعد از آن با انگشتان دست ضربه زده و در نهایت اسپین نمایید که تمام محتویات از درب جدا شده و در انتهای استریپ- میکروتیوب قرار گیرد، سپس در داخل دستگاه ریل تایم طبق لیست کار خود قرار دهید.
- برای کنترل مثبت در واکنش، اینبار به جای سمپل یا همان نمونه DNA، به مقدار 5 ماکرولیتر کنترل مثبت، به هر 4 ویال استریپ اضافه کنید.
- برای کنترل منفی در واکنش، اینبار به جای سمپل یا همان نمونه DNA، به مقدار 5 ماکرولیتر کنترل منفی، به هر 4 ویال استریپ اضافه کنید

HPV Genotyping Reaction Mix 1(Tube1)	
Master mix(250 µl)	10 µl
HPV-Primer Mix-1 (125 µl)	5 µl
Sample (DNA)	5µl
HPV Genotyping Reaction Mix 2 (Tube2)	
Master mix(250 µl)	10 µl
HPV-Primer Mix-2 (125 µl)	5 µl
Sample (DNA)	5µl
HPV Genotyping Reaction Mix 3 (Tube3)	
Master mix(250 µl)	10 µl
HPV-Primer Mix-3 (125 µl)	5 µl
Sample (DNA)	5µl
HPV Genotyping Reaction Mix 4 (Tube4)	
Master mix(250 µl)	10 µl
HPV-Primer Mix-4 (125 µl)	5 µl
Sample (DNA)	5µl



25 Reaction

Manual: Version: NMG-01

<https://novinmedco.com/>

En-A-Dr-Y

برنامه دمایی کیت جهت تکثیر در دستگاه Real time PCR:

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial activation	95°C	10 min	1
Amplification cycles	95°C	25 sec	
	60°C	35 sec*	40-45
HOLD	4°C	2 min	

*Reading of real time PCR instrument (خوانش هر 4 رنگ فلورسانس در دستگاه ریل تایم)

آنالیز داده ها و نمودارهای بدست آمده:

پس از تکمیل واکنش ها، نتیجه به طور خودکار ذخیره می شود. مقادیر شروع، پایان و حد آستانه (Threshold) نمودارهای بدست آمده را مطابق با تجزیه و تحلیل دستگاه تنظیم کنید (کاربران می توانند مقادیر را با توجه به وضعیت واقعی Threshold تنظیم کنند، منحنی تکثیر کنترل منفی را به صورت مسطح یا کمتر از حد Threshold در نظر بگیرید). اگر منحنی های فلورسانس در هر چاهک از خط آستانه (Threshold) عبور کند، و از نظر شماتیکی منحنی کاملاً سیگنالی باشد، تایپ HPV مثبت در نظر گرفته می شود و بسته به نوع رنگ تابش شده، نوع آن تعیین می گردد.

کنترل کیفی نتایج بدست آمده:

نتیجه آزمایش در صورتی معتبر تلقی می شود که تمام شرایط جدول زیر برای کنترل های آزمایش برآورده شود در غیر این صورت، نتیجه آزمایش نامعتبر تلقی می شود و نیاز به آزمایش مجدد دارد.

	HPV (14 genotyping)-Positive control	HPV (14 genotyping)-Negative control
Ct value	<39 at channel FAM, HEX/VIC, ROX, CY5	No Ct at channel FAM, HEX/VIC, ROX, CY5

بررسی نمودارهای مثبت: (محدوده قابل قبول Ct برای تعیین تایپ)

Ct قابل قبول برای تشخیص نوع پاپیلومای انسانی کمتر از 39، و Ct قابل قبول برای کنترل داخلی کیت (IC) (housekeeping gene) 40 میباشد.

Conclusion	Ct value of Sample	Ct value of housekeeping gene (IC)
Positive	<39	<40
Others *	<39	>40 or No Ct
Negative (30 types)	غیر سیگنالی >39	<40
Invalid**	>39	>40 or No Ct



25 Reaction

Manual: Version: NMG-01

<https://novinmedco.com/>

En-A-Dr-Y

- * در بعضی از موارد نمونه بیمار از نظر تایپ HPV مثبت میشود ولی بدلیل کم سلول بودن نمونه، Ct کنترل داخلی منفی یا بیشتر از 40 میگردد که در این مواقع نمونه مثبت در نظر گرفته میشود ولی گزارش داده نمیشود و جهت اطمینان از نتیجه بدست آمده؛ استخراج مجدد همراه یا تغلیظ کردن نمونه اولیه (1.5 سی سی نمونه داخل میکروتیوب ریخته و دور rpm 14000 پلت گرفته شود و استخراج مجدد انجام میگیرد)، تست HPV genotyping تکرار میگردد.
- ** در بعضی از موارد Ct اینترنال کنترل و تایپ HPV هر دو بالای حد قابل قبول میباشد (حتی اگر نمودار HPV سیگنالی باشد) لذا در این موارد یافته بدست آمده قابل قبول نیست و باید تست از ابتدا (استخراج DNA) تکرار گردد. (در تمامی RUN های کاری گذاشتن کنترل مثبت و منفی اجباری میباشد که توسط مسئول بخش تایید گردد)

*** Sample distribution for plate type instruments: CFX/iQ5™ (Bio Rad); Mx3005P™ (Agilent), ABI® 7500 Real Time PCR (Applied Bio systems). For rotor type instruments like Rotor-Gene™ 3000/6000/Q (Corbett Research, Qiagen) 0,1 ml strip tubes & caps are recommended.

تفسیر تحلیل کیفی به شرح زیر است:

- DNA ژنوتیپ های HPV 16,58,33,39 در صورتی تشخیص داده می شود که مقدار Ct تعیین شده در کانال FAM از مقدار Ct مرزی تجاوز نکند. علاوه بر این، منحنی فلورسانس نمونه باید از خط آستانه در ناحیه رشد نمایی معمولی فلورسانس عبور کند.
- DNA ژنوتیپ های HPV 18,66,35,45 در صورتی تشخیص داده می شود که مقدار Ct تعیین شده در کانال HEX/JOE از مقدار Ct مرزی تجاوز نکند. علاوه بر این، منحنی فلورسانس نمونه باید از خط آستانه در ناحیه رشد نمایی معمولی فلورسانس عبور کند.
- DNA ژنوتیپ های HPV 52,31,68,59 در صورتی تشخیص داده می شود که مقدار Ct تعیین شده در کانال ROX از مقدار Ct مرزی تجاوز نکند. علاوه بر این، منحنی فلورسانس نمونه باید از خط آستانه در ناحیه رشد نمایی معمولی فلورسانس عبور کند.
- DNA ژنوتیپ های HPV 56,51 در صورتی تشخیص داده می شود که مقدار Ct تعیین شده در کانال CY5 از مقدار Ct مرزی تجاوز نکند. علاوه بر این، منحنی فلورسانس نمونه باید از خط آستانه در ناحیه رشد نمایی معمولی فلورسانس عبور کند.

اختصاصیت آنالیتیکال (Cross Reactivity: مثبت کاذب):

تمامی پرایمر ها و پروب های بکار برده شده در کیت از تکنیک مقایسه توالی در با تمامی توالی های منتشر شده در بانک های ژنی بررسی شده است. بررسی های داده های حاصل از انجام اختصاصیت نشان داد هیچ واکنش متقاطع با هیچ یک از اورگانیزم ها و میکرواورگانیزم های احتمالی از ناحیه تناسلی وجود ندارد. و از نظر فیلوژنی فاصله بسیار دوری با ژنوم انسان دارد.

میکرواورگانیزم های مورد آزمایش شامل موارد زیر میباشد:

Neisseria gonorrhoeae, chlamydia trachomatis, mycoplasma spp, Ureaplasma, HSV1/2, Hepatitis B

نمونه های مثبت بیمارانی میباشد که با کیت STD دارای تاییدیه اروپا و آمریکا گذاشته شده و تایید گردیده است.

همچنین با توجه به فلور نرمال یا گاهی پاتوژنهای دستگاه تناسلی و واژینال به غیر از موارد بالا، نمونه Candida albicans و Streptococcus agalactiae و Streptococcus group D ابتدا توسط کشت جدا سازی و استخراج انجام گرفت و سپس Real time PCR HPV Genotyping گذاشته شد. که نتایج نشان داد هیچ نموداری از نظر تشابه ژنتیکی مشاهده نمیشود.



25 Reaction

Manual: Version: NMG-01

<https://novinmedco.com/>

En-A-Dr-Y

حساسیت آنالیتیکال (منفی کاذب):

حساسیت کیت با استفاده از نمونه هایی تعیین غلظت شده برای هر 14 ژنوتایپ پر خطر ویروس پاپیلومای انسانی محاسبه شد. نتایج نشان داد توانایی کیت برای تشخیص حداقل 50 کپی از ژنوم ویروس در یک میلیتر مناسب میباشد و اگر تعداد کپی نامبر ژنوم ویروسی کمتر از 50 باشد احتمال کاهش حساسیت کیت در نشان دادن نمودار سیگنالی وجود دارد و با ضریب اطمینان کمتری قادر به شناسایی ژنوم میباشد.

هشدارها و توصیه ها:

کاربر باید همیشه به موارد زیر توجه کند:

- از سر سمپلر استریل، داخل هود لامینار کلاس II (ممانعت کننده ورود آئروسول به داخل محفظه) استفاده کنید و برای هر واکنش سر سمپلر خود را تعویض نمایید
- موارد مثبت استخراج شده (نمونه ها، کنترل ها و آمپلیکن ها) را به دور از سایر معرف ها (پرایمر میکس و مسترمیکس) نگهداری کنید و آن را به مخلوط واکنش در یک منطقه جداگانه اضافه کنید.
- قبل از شروع آزمایش، تمام اجزا را به طور کامل در دمای اتاق ذوب کنید. وقتی ذوب شد، اجزا را با هم مخلوط کرده و برای مدت کوتاهی سانتریفیوژ کنید.
- هنگام کار با نمونه ها و معرف ها از دستکش یکبار مصرف، روپوش آزمایشگاهی و محافظ چشم استفاده کنید و پس از آن دست ها را کاملاً بشویید.
- از خوردن، آشامیدن، سیگار کشیدن، استفاده از لوازم آرایشی و استفاده از لنزهای تماسی در محل کار آزمایشگاه خودداری کنید.
- از کیت بعد از تاریخ انقضا استفاده نکنید.
- تمام نمونه ها و معرف های استفاده نشده را مطابق با قوانین وزارت بهداشت دور بیندازید.
- نمونه ها باید به طور بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند و در یک کابینت بیولوژیکی مطابق با شیوه های ایمنی زیستی مناسب نگهداری شوند.
- تمام نشت نمونه ها یا معرف ها را با استفاده از یک ضد عفونی کننده مانند هیپوکلریت سدیم 0.5 درصد یا سایر ضد عفونی کننده های مناسب تمیز و ضد عفونی کنید.
- از تماس نمونه یا معرف با پوست، چشم و غشاهای مخاطی خودداری کنید. در صورت تماس پوست، چشم یا غشاهای مخاطی، فوراً با آب بشویید و فوراً به پزشک مراجعه کنید.
- برگه های اطلاعات ایمنی مواد (MSDS) در صورت درخواست موجود است.
- استفاده از این محصول باید به پرسنلی که در زمینه تکنیک های ملکولی آموزش دیده اند محدود شود.
- فرآیند آزمایشگاهی باید یک جهت باشد، باید از سمت استخراج شروع شود و سپس به سمت PCR (مرحله تکثیر) و تشخیص حرکت کند. نمونه ها، تجهیزات و معرف ها را به سمتی که مرحله قبلی در آن انجام شده است، برنگردانید.



25 Reaction

Manual: Version: NMG-01

<https://novinmedco.com/>

En-A-Dr-Y