

سانتی گراد و در تاریکی نگهداری شوند. حفظ دما در مدت زمان نگهداری محصول الزامی است. ۲. با افزایش دفعات ذوب کردن مجدد مواد، از حساسیت کیت کاسته می شود. برای کارایی هر چه بهتر کیت، از ذوب و یخ زدگی چندین باره محلول ها (بیش از ۳ مرتبه) خودداری شود. ۳. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج بر روی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای مذکور پایدار هستند. ۴. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابه جایی درب معرف ها بپرهیزید.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱. نوع نمونه: ۵ سی سی نمونه پاپ اسمیر
۲. شرایط نمونه گیری: نمونه برداری با رعایت پروتکل های تهیه نمونه عفونی و با استفاده از سوآب های مخصوص نمونه گیری انجام شود. نمونه ها تا انتقال به آزمایشگاه باید در محفظه بسته انتقال یابد.
۳. نگهداری حمل و نقل نمونه: نمونه سوآب تهیه شده داخل ظرف محیط نگهدارنده درب بسته دارای مجوز IVD می باشد. این ظروف می توانند به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲-۸ سانتیگراد و برای مدت یک هفته نمونه ها باید در ۲۰-۰C- سانتیگراد تا رسیدن به آزمایشگاه نگهداری شوند.

جدول ۱: مواد موجود در کیت

برچسب	۲۴ تستی	۴۸ تستی	۹۶ تستی
HRPPM-1 (PPM-1)	240 µl/V	480 µl/V	960 µl/V
HRPPM-2 (PPM-2)	240 µl/V	480 µl/V	960 µl/V
HRPPM-3 (PPM-3)	240 µl/V	480 µl/V	960 µl/V
HRPPM-4 (PPM-4)	240 µl/V	480 µl/V	960 µl/V
LRPPM-5 (PPM-5)	240 µl/V	480 µl/V	960 µl/V
LRPPM-6 (PPM-6)	240 µl/V	480 µl/V	960 µl/V
LRPPM-7 (PPM-7)	240 µl/V	480 µl/V	960 µl/V
LRPPM-8 (PPM-8)	240 µl/V	480 µl/V	960 µl/V
HLHPV-Master	2×960 µl/V	4 × 2 ml/V	8 × 2 ml/V
Negative Control (NC)	100 µl/V	200 µl/V	500 µl/V
Positive Control (PC)	100 µl/V	200 µl/V	500 µl/V

احتیاطات و هشدارها:

۱. کیت فقط برای تشخیص آزمایشگاهی کاربرد دارد. از نتایج این کیت به تنهایی جهت تشخیص تأیید یا رد عفونت نباید استفاده نمود.

Kit for identifying high-risk and low-risk genotypes of human papillomavirus using Multiplex Real-time PCR method

عنوان محصول:

کیت شناسایی ۳۵ ژنوتیپ پرخطر و کم خطر پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) در نمونه های پاپ اسمیر سرویکس بر مبنای روش Real time PCR با استفاده از پروب های رنگی مختلف TaqMan

معرفی محصول:

به عنوان عامل اصلی سرطان دهانه رحم، تشخیص به موقع ویروس HPV در مراحل اولیه باعث جلوگیری از پیشرفت بیماری میگردد. این کیت تشخیص کیفی شناسایی ۳۵ تایپ ویروس پاپیلوما انسانی شامل ۱۴ تایپ پرخطر (۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶ و ۶۸) و ۶ تایپ احتمالاً پرخطر (۲۶، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۰، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۴۶، ۴۹، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶ و ۶۸) می باشد.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست:

۱. انواع دستگاه های آزمایشگاهی شامل:
 ۱. یخچال و فریزر ۲۰- درجه آزمایشگاهی
 ۲. هود زیستی کلاس II یا PCR Work station
 ۳. سمپلرهای متغیر
 ۴. میکروسانتریفیوژ
 ۵. میکسر رومیزی
 ۶. دستگاه ارزیابی و کالبر Real-time PCR با حداقل چهار کانال FAM (سبز)، HEX/VIC/JOE (قرمز) و Quasar/CY5 (زرد) ۶۷۰ (قرمز) و نارنجی (ROX/Texas Red)

۲. موارد مصرفی شامل:

۱. کیت استخراج DNA ویروسی
۲. نوک سمپلر (استریل فیلتر دار ترجیح داده می شود)
۳. میکروتیوب عاری از RNase و DNase

نگهداری کیت:

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای ۲۰- درجه

روش انجام آزمایش:

آماده سازی قبل از واکنش Real-time PCR:

با استفاده از کیت های استخراج ژنوم ویروسی نسبت به استخراج DNA ویروس مانند Roje, Rosch، از نمونه پاپ اسمیر سرویکس اقدام شود. لازم به ذکر است این محصول در بردارنده کیت استخراج DNA نیست ولی با بیشتر کیت های تخلیص اسید نوکلئیک ویروسی سازگار می باشد.

آماده سازی واکنش Real-time PCR:

اسید نوکلئیک مستقیماً در واکنش qPCR مورد استفاده قرار می گیرد. ابتدا در محل مناسب و استریل، محتویات کیت را از داخل بسته بندی خارج کرده و اجازه دهید تا در دمای اتاق ذوب شوند. سپس مطابق با مراحل زیر بر روی یخ انجام می شود:

۱. در کلیه آزمایشات برای هر بیمار ۸ میکروتیوب همراه با میکروتیوب های کنترل مثبت و منفی و NTC نام گذاری نمائید.

۲. ۱۰ میکرولیتر از HLHPV-Master به میکروتیوب هایی که برای آن نام گذاری شده است اضافه کنید.
۳. ۱۰ میکرولیتر از هر کدام از ویال های ۸-PPM الی ۱-PPM به تمامی میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.

۴. ۵-۱۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل و کنترل منفی را به میکروتیوب NTC و کنترل منفی اضافه کنید.

۵. ۵ میکرولیتر از کنترل مثبت در یک فضای دور از محوطه آماده سازی سایر مخلوطهای واکنش به تیوب واکنش کنترل مثبت اضافه کنید.

۶. ۵-۱۰ میکرولیتر از DNA نمونه بیماران را به میکروتیوب هایی که برای آن نام گذاری شده است اضافه کنید.

۷. میکروتیوب های واکنش را در دستگاه Real time PCR قرار دهید و پس از انجام تنظیمات و انتخاب کانال خوانش، فایل را ذخیره کرده و دستگاه را با برنامه دمائی و زمانی جداول ۲ و ۳ راه اندازی کنید. پس از انجام تنظیمات و انتخاب کانال خوانش، فایل را ذخیره کرده و دستگاه را با برنامه دمائی و زمانی زیر راه اندازی کنید.

جدول ۲: برنامه اول دمایی واکنش

مراحل	دما	زمان	تعداد سیکل
Initial Denaturation	95°	5min	1
Denaturation	95°	15sec	40
Annealing/ Extension	60**	6sec	40
(FAM/HEX/Texas Red/CY5)			

۲. پیش از استفاده از کیت، ویال ها رو از لحاظ نشتی یا آسیب بررسی کنید.

۳. کیت را هنگام نگهداری و حین حمل و نقل به حالت ایستاده قرار دهید و از تماس تمام معرف ها با نور مستقیم جلوگیری شود.

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

۵. تمامی وسایل که در آزمایشگاه PCR مورد استفاده قرار می گیرند باید قبل و بعد از انجام تست با هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ و الکل ۷۰٪ ضد عفونی شوند و از جابه جایی این وسایل بین بخش های مختلف پرهیز کنید. در واقع هر بخش باید وسایل، مواد و مخصوصاً سمپلر مختص به خود را داشته باشد. در زمان انجام تست از نوک سمپلر فیلتر دار استفاده شود.

۶. کیت حاوی کنترل مثبت می باشد برای جلوگیری از ایجاد آلودگی به دیگر اجزای کیت، بهتر است آنرا از دیگر اجزای کیت جدا و در یک جعبه دیگر قرار دهید و در مواقع استفاده احتیاط کنید.

آماده سازی معرف ها:

نکات مهم در انجام تست:

۱. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.

۲. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.

۳. فرایند پیپتینگ از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. پیپتینگ ناکافی باعث تغییر غلظت مناسب مسترمیکس و پرایمر و پروب ها خواهد شد.

۴. در هر بار انجام آزمایش کنترل مثبت کیت باید استفاده شود تا کارائی واکنش مورد ارزیابی قرار گیرد.

۵. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، تیوب ها از نظر وجود حباب بررسی شوند.

در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به تیوب از محیط خارج شوند.

۶. هر نوع نمونه یا ماده کنترلی که حاوی رنگ باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش بر روی آنها ممکن است منجر به نتایج کاذب شود.

جدول ۳: برنامه دوم دمایی واکنش

مراحل	دما	زمان	تعداد سیکل
Initial Denaturation	95°	5min	1
Denaturation	95°	15sec	5
Initial Denaturation	60°	60sec	5
Denaturation	95°	15sec	40
Annealing/ Extension	60°*	60sec	40
(FAM)/HEX /Texas Red/CY5			

* مرحله ای که خوانش انجام شود.

*این برنامه دمایی برای بهینه کردن و افزایش حساسیت تست در دستگاه های مختلف تنظیم شده است و اگر با برنامه جدول اول جواب مدنظر خود را دریافت نکردید برای بهینه کردن تست روی دستگاه خودتان این برنامه را استفاده کنید.

آنالیز داده ها و گزارش آنها:

مشخصات تیوب های واکنش و نوع خوانش فلورسنت در هر تیوب را در جدول ۴ مشاهده می کنید. نتایج با استفاده از نرم افزار دستگاه PCR Time Real، بر اساس دستورالعمل های دستگاه تفسیر می شوند.

جدول ۴: مشخصات تیوب های واکنش و نوع خوانش تارگت های کیت

Targets	FAM	HEX/JOE	Texas Red/Rox	CY5
PPM-1	HPV-16	HPV-1C	HPV-45	HPV-39
PPM-2	HPV-35	HPV-68	HPV-6/11	HPV-56
PPM-3	HPV-31	HPV-66	HPV-33	HPV-18
PPM-4	HPV-58	HPV-59	HPV-51	HPV-52
PPM-5	HPV-53	HPV-84	HPV-90	HPV-61/71
PPM-6	HPV-40/70	HPV-82	-----	HPV-62/73
PPM-7	HPV-54	HPV-44	HPV-43	HPV-81
PPM-8	HPV-26	HPV-67/91	HPV-69	HPV-42

تفسیر:

اعتبار نتایج به طور مستقیم به نتایج کنترل های کیفی وابسته است. برای تضمین صحت داده ها، سیگنال Ct کمتر یا مساوی ۴۰ در کانال HEX (کنترل داخلی) باید در تمامی نمونه ها مشاهده شود. عدم وجود این سیگنال باعث می شود که نتیجه آزمایش نامعتبر تلقی گردد. علاوه بر این، کنترل های مثبت، منفی و NTC باید معتبر باشند تا نتایج آزمایش قابل اعتماد باشد. در صورت مشاهده سیگنال غیرمنتظره، مانند سیگنال مثبت در کنترل منفی یا NTC، احتمال آلودگی وجود دارد و آزمایش باید تکرار شود.

پس از تایید اعتبار کنترل ها، نتایج مربوط به ژنوتیپ خاص گزارش می شوند. اگر در هر کانال

مربوط به ژنوتیپ ۱۶ و ۱۸ منحنی سیگموئیدی و Ct کمتر یا مساوی ۴۰ مشاهده شود، نمونه به عنوان مثبت ژنوتیپ ۱۶ و ۱۸ شناخته می شود. ولی تا Ct کمتر از ۳۵ نشان دهنده مثبت ژنوتیپ های دیگر این کیت می باشد. در این حالت، پیشنهاد می شود تفسیر نهایی با در نظر بررسی بالینی کامل تر و در صورت لزوم تکرار آزمایش یا انجام آزمایش های تکمیلی صورت پذیرد. اگر Ct بالاتر از ۴۰ یا هیچ سیگنالی مشاهده نشود، نتیجه آزمایش به عنوان منفی برای آن ژنوتیپ گزارش می شود.

تصویری از کنترل مثبت آزمایش (تصویر ۱) در تیوب های مختلف مشاهده می کنید.

تمامی کنترل های آزمایش (جدول شماره ۵) باید پیش از تفسیر نتایج بیمار، بررسی شوند. اگر کنترل ها مورد تأیید نیستند، نباید نتایج آزمایش بیمارارن تفسیر گردد.

خصوصیات اجرایی کیت:

۱- حساسیت آنالیتیکال و بالینی (Sensitivity):
حساسیت آنالیتیکال کیت (LOD) برای ژنوتیپ های مختلف پاپیلوما ویروس انسانی به ترتیب برای تایپ های ۱۶ و ۱۸ کپی بر میلی لیتر و برای تایپ های دیگر ۴۰۰ کپی بر میلی لیتر می باشد. صحت بالینی کیت شناسایی و غربالگری ژنوتیپ های پرخطر پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) به روش Real-time PCR شرکت ۹۹٫۳٪ بدست آمد.

۲- اختصاصیت آنالیتیکال و بالینی (Specificity):

بررسی اختصاصیت، تمامی توالی های مورد بررسی در این کیت چک شده و با هیچ کدام از عوامل بیماری زایی واکنش متقاطع (Cross reactivity) دیده نشد. در نهایت آزمایش اختصاصیت بر روی نمونه های بالینی چک شده اند و هیچ جواب مثبتی مشاهده نشده است و اختصاصیت ۱۰۰٪ حاصل شد.

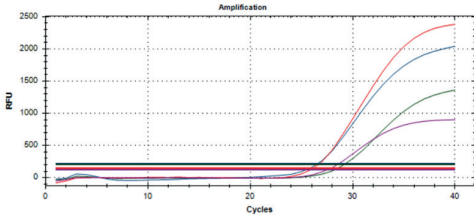
۳- دقت (Precision):

تکرارپذیری و تجدید پذیری تست در نمونه های منفی، نمونه های مثبت قوی و نمونه های مثبت ضعیف، در آزمایش های مختلف برای ۳ لات نامبر مختلف از کیت بررسی و تمامی جواب های مشاهده شده در ارزیابی ها مطابق با نتایج قابل انتظار بود.

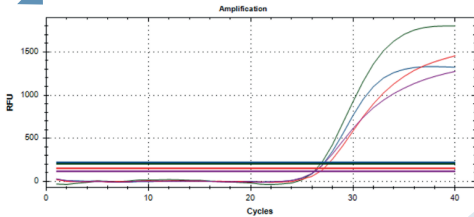
۴- مداخله گر ها (Interference):

جهت تعیین درصد تداخل کیت شناسایی و

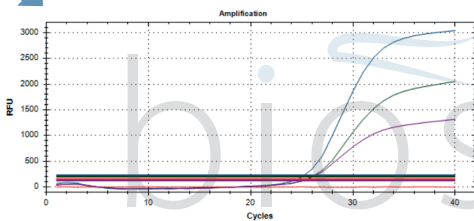
T4



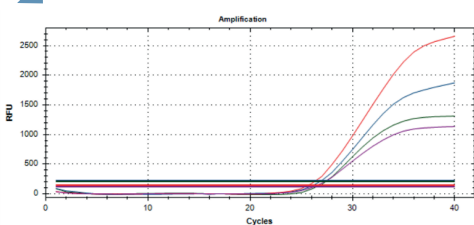
T5



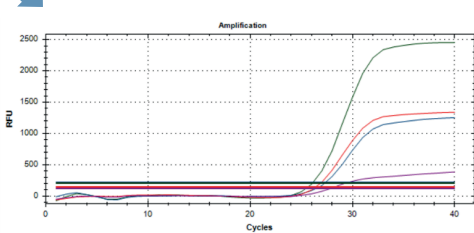
T6



T7



T8



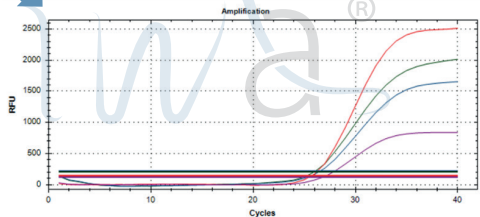
غریبالگری ژنوتیپ های پرخطر پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) انجام و مشخص گردید که مداخله گره های گلیبول قرمز (۲٪ حجمی حجمی)، لکوسیت ها $10^6 \times$ سلول/ میلی لیتر، موکوس ۰٫۵-۵ درصد وزنی/ حجمی، اسید گاستریک ۵ درصد، تأثیری بر نتایج آزمایش ندارد.

۵- پایداری (Stability):

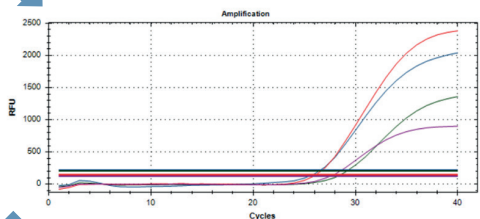
پایداری کیت شناسایی و غریبالگری ژنوتیپ های پرخطر پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) به روش Real-time PCR شرکت روی نمونه های پاپ اسمیر سرویکس تهیه شده از نمونه های بیمار مثبت DNA HPV در سه غلظت مختلف بدست آمد. نتایج ادعا می کند که پایداری قبل و بعد از باز شدن معرف های کیت در صورت نگهداری در دمای منفی ۲۰ درجه، ۶ ماه است. همچنین شاخص های اجرایی معرف های این کیت تا ۳ بار ذوب شدن دارای عملکرد پایداری می باشد و تعداد زیاد ذوب کردن محلول ها، می تواند از حساسیت کیت بکاهد.

تصویر ۱: نمایی از نتایج کنترل مثبت در ۸ تیوب واکنش در ۴ کانال مختلف

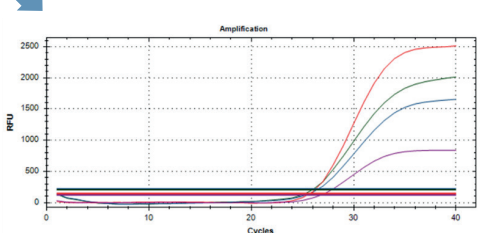
T1



T2



T3



جدول ۵: تفسیر نتایج کیت

فازها	مورد انتظار و معیار	نتیجه و تفسیر
کنترل NTC	عدم حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی و گذر از خط آستانه (Threshold line) در کانال FAM Texas Red, HEX و Cy5 یا $CT \leq 38$	معتبر
کنترل منفی	عدم حضور منحنی سیگموئیدی در هر ۳ کانال FAM, Texas Red, Cy5 و حضور منحنی سیگموئیدی و گذر از خط آستانه (Threshold line) در کانال HEX	معتبر
کنترل مثبت	حضور منحنی سیگموئیدی در هر ۴ کانال FAM, Texas Red, Cy5 و حضور منحنی سیگموئیدی و گذر از خط آستانه (Threshold line) در کانال HEX	معتبر
۱-PPM	حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی و گذر از خط آستانه(Threshold line) کانال FAM نشان دهنده مثبت بودن نمونه از لحاظ تایپ ۱۶. در کانال HEX نشان دهنده مثبت بودن نمونه از لحاظ تایپ ۱۷. در کانال Texas Red نشان دهنده تایپ ۱۵. در کانال Cy5 نشاندهنده تایپ ۱۳.	معتبر و گزارش جواب بیمار
۲-PPM	حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی و گذر از خط آستانه(Threshold line) در کانال FAM نشان دهنده تایپ ۱۵. در کانال HEX نشان دهنده تایپ ۱۶. در کانال Texas Red نشان دهنده تایپ ۱۷. در کانال Cy5 نشان دهنده تایپ ۱۵.	معتبر و گزارش جواب بیمار
۳-PPM	حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی و گذر از خط آستانه(Threshold line) در کانال FAM نشان دهنده تایپ ۱۷. در کانال HEX نشان دهنده تایپ ۱۶. در کانال Texas Red نشان دهنده تایپ ۱۳. در کانال Cy5 نشان دهنده تایپ ۱۸.	معتبر و گزارش جواب بیمار
۴-PPM	حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی و گذر از خط آستانه(Threshold line) در کانال FAM نشان دهنده تایپ ۱۸. در کانال HEX نشان دهنده تایپ ۱۶. در کانال Texas Red نشان دهنده تایپ ۱۳. در کانال Cy5 نشان دهنده تایپ ۱۵.	معتبر و گزارش جواب بیمار
۵-PPM	حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی و گذر از خط آستانه(Threshold line) در کانال FAM نشان دهنده تایپ ۱۵. در کانال HEX نشان دهنده تایپ ۱۶. در کانال Texas Red نشان دهنده تایپ ۱۷. در کانال Cy5 نشان دهنده تایپ ۱۵.	معتبر و گزارش جواب بیمار

۶-PPM	حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی و گذر از خط آستانه(Threshold line) در کانال FAM نشان دهنده تایپ ۱۷/۱۶. در کانال HEX نشان دهنده تایپ ۱۸. در کانال Cy5 نشان دهنده تایپ ۱۳/۱۲.	معتبر و گزارش جواب بیمار
۷-PPM	حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی و گذر از خط آستانه(Threshold line) در کانال FAM نشان دهنده تایپ ۱۵. در کانال HEX نشان دهنده تایپ ۱۶. در کانال Texas Red نشان دهنده تایپ ۱۳. در کانال Cy5 نشان دهنده تایپ ۱۸.	معتبر و گزارش جواب بیمار
۸-PPM	حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی و گذر از خط آستانه(Threshold line) در کانال FAM نشان دهنده تایپ ۱۶. در کانال HEX نشان دهنده تایپ ۱۷/۱۶. در کانال Texas Red نشان دهنده تایپ ۱۶. در کانال Cy5 نشان دهنده تایپ ۱۲.	معتبر و گزارش جواب بیمار

در غیاب کنترل داخلی، افزایش فلورسنت در هر یک از میکروتیوب ها به جز میکروتیوب NTC، اتفاق افتد نتایج نباید گزارش شوند. در صورت افزایش فلورسنت در میکروتیوب NTC، می بایست آزمایش تکرار شود و احتمال وجود آلودگی وجود دارد. در صورت افزایش فلورسنت در میکروتیوب نرمال به جز کنترل داخلی، می بایست آزمایش تکرار شود و احتمال بروز آلودگی وجود دارد.

منابع و مراجع:

1. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.
2. CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline. 2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.
3. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation, <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>
4. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests. 6th ed. (pp. 7-435). Elsevier Inc.

جدول نمادها:

REF	Catalog number	شماره رفرنس
LOT	Batch code	سری ساخت
IVD	In vitro diagnostic medical device	فراورده تشخیصی و بالینی
DATE	Date of manufacture	تاریخ تولید
EXP	Expiry date	تاریخ انقضا
TEMP	Temperature limitation	دمای نگهداری
READ	Read instructions before use	مطالعه بروشور
TEST	Sufficient for n tests	محتویات برای n تست کافیست
CAUTION	Caution consult accompanying documents	توجه به مدارک همراه
MANUFACTURER	Manufacturer	آدرس شرکت
KEEP AWAY FROM SUNLIGHT	Keep away from sunlight	در جای تاریک نگهداری شود