

مقدمه :

عفونت تناسلی با ویروس DNA دار پاپیلوما ی انسانی یکی از شایع ترین بیماری های مقاربتی (Sex Transitional Disease) 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 ی 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 سرتاسر جهان است.

ژنوتیپ های HPV بر اساس شناسایی درجات مختلف نئوپلازی درون اپیتلیال دهانه رحم به انواع پرخطر (۱۶، ۱۸، ۳۱ و ۴۵)، با خطر متوسط (۳۹، ۳۳، ۵۱، ۲۵، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۸، ۶۶) و کم خطر (۶، ۱۱، ۴۲، ۴۴) تقسیم می شوند.

چندین روش برای تشخیص عفونت بالینی HPV وجود دارد:

مشاهده، غربالگری سیتولوژیک به روش پاپ اسمیر، میکروسکوپ الکترونی، ایمونوسیتوشیمی 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 با ارزش ترین و دقیق ترین روش تشخیص به شمار می رود.

کاربرد:

کیت HPV RoStin ، مبتنی بر روش Real Time PCR به منظور تعیین ۳۳ ژنوتایپ

ویروس پاپیلوما ی انسانی شامل ۱۴ ژنوتایپ پرخطر 16, 18, 33, 68, 56, 45, 31, 52, 51

58, 39, 59, 66, 35 Intermediate 53, 26, 67, 73, 82 و ۱۴ ژنوتایپ کم خطر

61, 62, 54, 89, 6, 40, 44, 42, 43, 11, 70, 69, 90, 91 در نمونه های بیولوژیکی 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 32 تایپ از ویروس HPV در 8 ویال است که بصورت Multiplex طراحی شده اند.

Florescence channel	FAM	HEX	ROX	CY5
Reaction mix	Amplification product			
FRP1	16	18	33	IC
FRP2	68	56	45	IC
FRP3	31	52	51	58
FRP4	39	59	66	35
FRP5	53	26/67	73	82
FRP6	6	40/44	11	42/43
FRP7	69	70	54	89
FRP8	61	90	62	91

شناسایی کیت HPV RoStin شامل دو بخش یا روش اساسی می باشد:

۱- استخراج DNA از نمونه ها

۲- Multiplex Real Time PCR در 8 ویال به ازای هر نمونه

کیت تشخیص مولکولی ژنوتیپهای پرخطر پاپیلوما ویروس

HPV Genotyping Real Time PCR kit

REF HG25G

برای استفاده تشخیصی در شرایط آزمایشگاهی موارد زیر را رعایت کنید:

- ❖ 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 برآش بهتر است رسوب گیری قبل از استخراج انجام گیرد (رسوب گیری سانتریفیوژ نمونه ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰).
- ❖ 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، روپوش 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 :

HI25G 25T	ویال	FAM/HEX/ROX/CY5
125 λ	۱ ویال	FRP1: 16/18/33/IC
125 λ	۱ ویال	FRP2: 68/56/45/IC
125 λ	۱ ویال	FRP3: 31/52/51/58
125 λ	۱ ویال	FRP4: 39/59/66/35
125 λ	۱ ویال	FRP5: 53/26/67/73/82
125 λ	۱ ویال	FRP6: 6/40.44/11/42.43
125 λ	۱ ویال	FRP7: 69/70/54/89
125 λ	۱ ویال	FRP8: 61/90/62/91
1000 λ	2 ویال	Master mix
250 λ	۱ ویال	کنترل مثبت کیت (PC LA)
250 λ	۱ ویال	کنترل منفی کیت (NC LA)
	۱ عدد	بروشور کیت

- برای جلوگیری از وجود نتایج منفی کاذب کیت HPV RoStin 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 تهیه کیت، آن را در دمای حداقل ۱۶- درجه سانتیگراد نگهداری کنید.
- 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:

تکمیل و بسته بندی:

سلامت پژوهان راستین

تهران، بلوار ابادر، مجتمع اداری ایسان، واحد ۲۰۳

تلف: ۰۲۱-۴۴۰۰۴۵۴۰-۶۰

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.

آماده سازی:

۱. مخلوط کامل ویال مستر میکس و ویال FRP ها

۲. آماده سازی میکروتیوب یا کپ استریپ ها به تعداد لازم

(8 ویال به ازای هر بیمار) (8 ویال به ازای هر کنترل)

۳. طبق جدول زیر میکس های اصلی را آماده سازی کنید

(میکس هر واکنش برای تست باید در همان روز و بصورت Fresh تهیه شود)

Reaction Mix Final volume	تعداد بیمار/هر سری آزمایش	۲: کنترل مثبت + کنترل منفی N	10 λ	FRP 1	5 λ	15 λ (N+2)
Master mix	10 λ	FRP 2	5 λ	15 λ (N+2)		
Master mix	10 λ	FRP 3	5 λ	15 λ (N+2)		
Master mix	10 λ	FRP 4	5 λ	15 λ (N+2)		
Master mix	10 λ	FRP 5	5 λ	15 λ (N+2)		
Master mix	10 λ	FRP 6	5 λ	15 λ (N+2)		
Master mix	10 λ	FRP 7	5 λ	15 λ (N+2)		
Master mix	10 λ	FRP 8	5 λ	15 λ (N+2)		

. ورتکس و اسپین مختصر هر ویال از میکس های تهیه شده

۵. برای هر بیمار 8 ویال (ویال های با حجم ۰.۲ ml یا ۰.۱ ml بسته به نوع دستگاه ریل تایم) آماده کنید و به ترتیب 10 λ از mix و 5 λ از هر FRP به ویال مربوط به آن اضافه کنید.

۶. افزودن 10 λ از DNA استخراج شده به هر ویال

۷. ورتکس و اسپین مختصر ویال ها

۸. حجم نهایی مورد استفاده برای هر واکنش کیت 25 λ می باشد.

۹. برای کنترل مثبت: از ویال PC مقدار 10 λ به هر 8 ویال مربوط به کنترل مثبت اضافه کنید.

۱۰. برای کنترل منفی: از ویال NC مقدار 10 λ به هر 8 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*	
	15 Sec	72	

*خوانش در FAM (سبز)، HEX (زرد)، ROX (نارنجی)، CY5 (قرمز)

آنالیز نتایج:

سیگنالهای تکثیر DNA تایپ های 16,68,31,39,53,6,61,69 در کانال FAM/Green در صورت عبور منحنی های سیگموئیدی فوق از خط آستانه (Threshold line) مثبت تشخیص داده می شوند.

سیگنالهای تکثیر DNA تایپ های 18,56,52,59,26/67,40/44,70,90 در کانال JOE/Yellow/HEX در صورت عبور منحنی های سیگموئیدی فوق از خط آستانه (Threshold line) مثبت تشخیص داده می شوند.

سیگنالهای تکثیر DNA تایپ های 33,45,51,66,73,11,54,62 در کانال ROX/Orange در صورت عبور منحنی های سیگموئیدی فوق از خط آستانه (Threshold line) مثبت تشخیص داده می شوند.

سیگنالهای تکثیر DNA تایپ های 58,35,82,42/43,89,91 و IC در کانال CY5/Red در صورت عبور منحنی های سیگموئیدی فوق از خط آستانه (Threshold line) مثبت تشخیص داده می شوند.

کنترل داخلی

سیگنالهای تکثیر DNA کنترل داخلی یا همان بتاگلوبین در کانال CY5/Red در میکروتیوب هایی که حاوی مستر شماره ۱ و ۲ می باشند تشخیص داده می شوند.

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 هشت مستر کانالهای FAM,HEX,ROX,CY5 و بجز مستر ۱ و ۲ برای کانال CY5. در صورت داشتن منحنی سیگموئیدی مناسب برای مستر ۱ و ۲ در کانال CY5 (کنترل داخلی) که از خط آستانه (Threshold line) عبور کند نمونه به عنوان نمونه منفی تلقی میگردد.

نمونه منفی نا معتبر

در میکس های ۱ و ۲ در کانال CY5 (مربوط به کنترل های داخلی) اگر مقدار CT تعیین نشده و یا از حد مرزی عبور کند و یا منحنی سیگموئیدی مربوط به کنترل های 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 30 ≤ Ct ، می باشد.

❖ در مورد CT های بالاتر از ۳۰ نمونه ها در صورت داشتن تکرار پذیری مثبت تلقی میشوند.

اختصاصیت آنالیتیکال (Cross Reactivity):

اختصاصیت کیت HPV با انتخاب پرایمرها و پروب های خاص تضمین شده است. تشابه احتمالی توالی پرایمر و پروب ها با استفاده از تکنیک مقایسه توالی با تمام توالی های منتشر شده در بانک های ژنی بررسی شده است. بررسی داده های حاصل از انجام Cross Reactivity، بیانگر عدم وجود واکنش متقاطع با میکروارگانیزم ها و ژنوتیپ های مورد آزمایش می باشد. پاتوزن های مورد بررسی شامل موارد ذیل می باشد:

- DNA HPV نسبت به انواع دیگر، به ویژه ژنوتیپ هایی که در کیت قابل شناسایی نمی باشند.
- نایسریا گونوره، کلامیدیا تراکوماتیس ، مایکوپلاسما جنیتالیوم، مایکوپلاسما هومینیس، استرپتوکوک آگالاکتیه، کاندیدا آلبیکنز، اوره پلاسما اورنالیتییکوم
- HIV-I

حساسیت آنالیتیکال:

حساسیت کیت با استفاده از نمونه های کلون شده بخشی از ژنوم ۱۴ ژنوتایپ پرخطر ویروس پاپیلوما ی انسانی که برای تشخیص در این کیت بکار رفته معادل ۴۰ کپی در میلی لیتر (40 Copies/ml) محاسبه شد، یعنی در ۹۹.۹٪ موارد اگر تیترو ویروس بیش از این میزان باشد کیت قادر به تشخیص آن است. در صورت کاهش تیترو ویروس به کمتر از این میزان، کیت با ضریب اطمینان کمتری قادر به شناسایی خواهد بود.