SENMURV

دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کیفی

Human Papillomavirus (HPV)

با روش

Real-Time PCR

Model : 5.V

STEM CELL TECHNOLOGY
شرکت فناوری بن یاخته

Doc. #:IFU-HPV5-01 Doc. Version: 00 Revision Date: 12-14-2022

فهرست مطالب

شماره رفرانس ۳

شرح کیت ۳

اصول ۳

دامنه کاربرد ۳

نگهداری انتقال کیت ۵

نکات احتیاط عمومی ۶

هشدارها و محدودیت‌ها ۷

نمونه گیری و نگهداری ۸

عوامل تداخلی ۹

آمادهسازی ۹

برنامه ریزی دمایی ۱۰

آنالیز نتایج ۱۴

نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف ۱۵

ارزیابی آنالیتیکال ۱۸

ارزیابی کلینیکال ۲۰

پشتیبانی فنی ۲۱

نشانه‌ها ۲۱

اطلاعات تماس ۲۱

شماره رفرانس

- BONHPV5-24

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به صورت Real-Time ساخته‌شده‌است. این محصول برای تشخیص در شرایط آزمایشگاهی تهیه شده و برای تشخیص ۱۵ نوع رایج ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) با ریسک بالا (شامل انواع ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶، ۶۷ و ۶۸) و ۱۴ نوع رایج HPV با ریسک پایین (شامل انواع ۶، ۱۱، ۴۰، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۵۴، ۶۱، ۶۲، ۷۰، ۷۱، ۷۲، ۷۴ و ۹۱) در نمونه‌های سواب دهانه رحم (Cervical)، آلت تناسلی (Penis)، واژن (Vagina) طراحی شده است و نشانه‌ای برای تشخیص عفونت توسط این پاتوژن است.

نتایج تشخیصی به‌دست‌آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم ویروس می‌باشد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق رنگ‌های فلوروسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلوروسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص دقیق محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به بازکردن مجدد لوله‌های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

دامنه کاربرد

این کیت برای تشخیص ۱۵ ویروس پاپیلومای انسانی با ریسک بالای ارتباط با سرطان و نئوپلازی درجه بالای (CIN 2-3) داخل اپیتلیال دهانه رحم و ۱۴ نوع رایج HPV با ریسک پایین و غیر مرتبط با سرطان و نئوپلازی درجه بالای (CIN 2-3) داخل اپیتلیال دهانه رحم در نمونه‌های سواب دهانه رحم (Cervical)، آلت تناسلی (Penis) و واژن (Vagina) کاربرد دارد.

اطلاعات پاتوژن

عفونت HPV (Human Papillomavirus) یا ویروس به‌عنوان عامل‌سرطان‌دهانه‌رحم درزنان شناخته می‌شود . HPV یک ویروس حاوی‌ماده ژنتیکی از جنس DNA دورشته ای به طول ۸۰۰۰ جفت باز است.

ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) یک ویروس DNA منتقله از راه جنسی است که سبب عفونت در سلول‌های اپیتلیال انسان می‌شود. DNA ویروسیHPV را می‌توان به‌عنوان ویریون‌های اپیزومی در سیتوپلاسم یافت یا اینکه به‌صورت ادغام شده درکروموزوم میزبان پیداکرد. بیش از ۲۰۰ ژنوتیپHPV یافت شده است که باتوجه به میزان خطرناک بودن آنها در ایجاد سرطان و نئوپلازی داخل اپیتلیال دهانه رحم با درجه بالا (CIN 2-3)، در گروه‌های پرخطر (HR) یا کم‌خطر(LR) طبقه‌بندی می‌شوند. سرطان دهانه‌رحم دومین سرطان بدخیم شایع در بین زنان در سراسر جهان است. عفونت‌مداوم با برخی از ژنوتیپ هایHPV منجر به ایجاد سرطان‌دهانه‌رحم می‌شود.

HPV های پرخطر که HPV های انکوژنیک نیز نامیده می‌شوند احتمال بالایی برای ایجاد سرطان‌های-رحم دارند و شامل تایپ‌های ۱۶ ، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۷و ۶۸ است. برخی از HPV های با فراوانی کمتر نیز وجود دارند که احتمالاً برای انسان سرطان‌زا هستند (شامل ۲۶، ۵۳، ۶۶، ۷۰، ۷۳ و ۸۲) و درگروهHPV های پرخطر یا احتمالاً درمعرض‌خطر طبقه‌بندی می‌شوند .HPVهای کم‌خطر مانند ۶، ۱۱، ۴۰، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۵۴، ۶۱، ۶۲، ۷۰، ۷۱، ۷۲، ۷۴ و ۹۱ می‌توانند باعث ایجاد زگیل‌تناسلی و تغییرات درجه‌پایین در سلول‌ها شوند، اما به ندرت باعث‌سرطان می‌شوند. تقریباً ۹۹,۷ درصد از سرطان‌های دهانه‌رحم ناشی از عفونت HPV پرخطر است.

عفونت HR HPV می‌تواند تغییرات سیتولوژیکی و بافت‌شناسی را ایجاد کند که با غربالگری پاپ (Pap Screening)، کولپوسکوپی (Colposcopy) یا بیوپسی (Biopsy) قابل‌تشخیص است. با این‌وجود، زنانی که آزمایش پاپ‌اسمیر منفی یا HR HPV DNA منفی را داشته‌اند، باز هم احتمال بالایی در ابتلا به ضایعات پیش‌سرطانی‌دهانه‌رحم دارند.

محتویات کیت

Title	24 Tests
	Volume per Vial
HR- HPVMaster A1	350 µl/tube × 1
HR- HPVMaster A2	350 µl/tube × 1
HR- HPVMaster A3	350 µl/tube × 1
HR- HPVMaster A4	350 µl/tube × 1
LR- HPVMaster A5	350 µl/tube × 1
HPVMaster B	100 µl
Positive Control	100 µl

نگهداری انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری‌گردد، همچنین به منظور انتقال و جابه‌جایی کیت از یونولیت با درب و یخ‌خشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری‌کیت دردمای۴ درجه‌سانتی‌گراد هیچ‌گاه نباید بیشتر از یک‌ساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل برروی بسته‌های یخزده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان‌طور که روی برچسب بسته‌بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخه‌های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و درنتیجه عدم کارایی کیت می‌شود.
- ✓ از قراردادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
- ✓ معرف‌ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله‌ها را به طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به طور یکنواخت مخلوط شده‌اند.

مواد و تجهیزات مورد نیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود؛

۱. کیت استخراج DNA
۲. سمپلر قابل‌تنظیم دراندازه‌هاش مختلف و نوک سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفوژ رومیزی
۴. بلوک خنک کننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
۶. گان و دستکش
۷. دستگاه Rotor-Gene , MIC, Azur با ۴ کانال فلوروسنت رنگ Green و Yellow و Orange و Red و یا انتخاب فلورفورهای FAM و HEX و Texas Red(ROX) و CY5
۸. نرم افزار Rotor-Gene Q نسخه ۱,۷,۹۴ ، نرم افزار Rotor-Gene 6000 نسخه ۱,۷,۶۵ ,۱,۷,۸۷ ,۱,۷,۹۴ و نرم افزار Rotor-Gene 3000 نسخه ۶,۰,۲۳ و یا بالاتر.
۹. استریپ و کپ ۰,۱ ml برای استفاده در روتور ۷۲ چاهکی و یا لوله‌های PCR 0.2 ml برای روتورهای ۳۶ چاهکی

نکات احتیاط عمومی

۱. لطفاً دستورالعمل را با دقت بخوانید و قبل از استفاده محصول با تمام اجزای کیت آشنا شوید و درحین‌کار دستورالعمل را دقیقاً دنبال کنید.
✓ لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرآیند را با آن‌ها جلو ببرید.
✓ از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضا استفاده نکنید.
✓ در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.
۲. از سرسمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free استفاده نمایید.
۳. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای HPV نمونه‌های‌گرفته شده از مریض، کنترل‌ها و محصولات حاصل از PCR باید درمحلی‌کاملا جدا از محل نگهداری و آماده‌سازی MasterMix صورت پذیرد.
۴. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.
۵. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد (به ویژه استانداردهای‌کیت) را به خوبی پیپتاژ نمایید و به‌طور مختصر اسپین‌کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به‌طورکامل توصیه می شود.

۶. تمام مراحل مربوط به تهیه Master Mix باید بر روی یخ یا جعبه‌های سرد (Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به Master Mix بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.
۷. هنگام‌کار با موادشیمیائی، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یکبار مصرف، و عینک های محافظ داشته باشید.
۸. کیت حاوی کنترل مثبت است. برای جلوگیری از آلودگی که ممکن است باعث ایجاد مثبت کاذب شود، کنترل مثبت را از سایر مواد موجود در کیت کاملا جدا کنید.
۹. PCRبسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس‌فرآیند کار را با دقت انجام دهید.
۱۰. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.
۱۱. از تیپ های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ‌های فیلتر دار برای جلوگیری از ورود آلودگی DNA استفاده کنید.
۱۲. لطفاً لوله‌های PCR را با دو دستکش یکبارمصرف بسته‌بندی کرده و به درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR را پس از امپلیفای باز نکنید.
۱۳. از مواد یکبار مصرف، بیش از یک بار استفاده نکنید.
۱۴. مواد موجود درکیت‌که بلا استفاده هستند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به‌درستی دور انداخته شوند.
۱۵. پس از آزمایش، محل‌کار را پاک‌کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ اسپری کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP[۱] توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ (PPE)[۲] انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 انجام شود. دستورالعمل زیر را مطالعه فرمایید :

Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Specimen Associated

[۱] Good Laboratoty Practice

[۲] Personal Protective Equipment

۲. پیشنهاد می شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همین طور بعد از کار لامپ UV زده شود.
۳. پیشنهاد می شود محل استخراج DNA، آماده سازی مخلوط واکنش از فضای آماده کردن، اضافه کردن نمونه و نمونه استاندارد جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید.
۴. پس از آماده سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

کنترل‌ها

۱. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک حاصل از استخراج DNA استفاده شود.
۲. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب بجای نمونه استفاده شود.
۳. کنترل مثبت (PTC): از کنترل مثبت کیت به‌جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

نمونه گیری و نگهداری

۱. برای تشخیص ویروس می‌توان از سواب دهانه رحم(Cervical) ، آلت تناسلی (Penis) و واژن (Vagina) استفاده کرد.
۲. نمونه مناسب می‌تواند پاپ‌اسمیر یا هر نمونه مشابهی باشد که حاوی میزان کافی از سلول‌های مخاطی دهانه یا گردن رحم است.

نگهداری نمونه‌های گرفته شده

برای نگهداری کوتاه مدت، نمونه را می توان کمتر از ۸ ساعت در یخچال با محدوده دمایی ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قرار داد و برای نگهداری طولانی‌مدت، نمونه را در دمای ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

کنترل داخلی (Internal Control)

در این کیت کنترل داخلی نیز وجود دارد که به کاربر این امکان را می‌دهد که فرآیند تخلیص و احتمال وجود مواد مهارکننده PCR را نیز بررسی کند.

عوامل تداخلی

EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه‌های سیلیس (µl۱)، خون (µl1)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و بافر لیز عملکرد آزمایش را مهار می‌کنند. وجود مهارکننده در واکنش با وجود حضور ژن کنترل داخلی (β-گلوبین) قابل ردیابی است.

خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسیدنوکلئیک باید توسط کیت‌های جداسازی موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود.

مواد نمونه باید از سلول‌های نمونه‌برداری شده از دهانه و ترشح دستگاه ادراری تناسلی استخراج شده باشد. کیت استخراج DNA در این کیت گنجانده نشده است.

۱) برای نمونه‌های رحم، از وسیله مخصوص برای تراشیدن سلول‌های ضایعات دهانه استفاده کنید، نمونه حاصله را داخل ویال جمع‌آوری نمونه استریل قرار دهید.

۲) نمونه‌های ترشح مجاری ادراری تناسلی، شامل مجرای ادراری مردان، دستگاه تناسلی زنان و ترشح مجرای ادراری است.

۳) نمونه‌ها باید با کیسه یخ در دمای زیرصفر درجه‌سانتی‌گراد منتقل شده و استخراج شوند تا بلافاصله در تست استفاده شوند. اگر DNA استخراج شده بلافاصله مورداستفاده قرارنگیرد، باید دردمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شود.

آماده‌سازی

۱. ابتدا لوله‌ها را روی رک‌یخ بگذارید تا محتویات آن‌ها ذوب شوند و محتویات لوله‌ها را به آرامی پیپتاژ و یا ورتکس‌کنید و به‌طور مختصر سانتریفیوژ کنید.

۲. مقدار ۱۴ میکرولیتر HPV Master A را به لوله‌های PCR اضافه کنید.

۳. مقدار ۱ میکرولیتر HPV Master B را به لوله‌های PCR اضافه کنید **(در تعویض سر سمپلر در اضافه کردن HPV Master B به HPV Master A مختلف، توجه فرمایید!)**.

۴. پس از آماده سازی محلول‌ها و انتقال آن به تیوب‌های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، ۵ میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید و درب آن را ببندید. سپس لوله ها را به منطقه کار با اسیدنوکلئیک انتقال دهید، ۵ میکرولیتر از کنترل مثبت و ۵ میکرولیتر از نمونه‌های بیمار را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید. در حین تهیه PCR لازم است همه اجزا در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند (جدول شماره ۱).

Reaction Setup	Volume
HPV Master A- 1or 2 or 3 or 4 or 5	14 µl
HPV Master B	1 µl
Sample or Control	5 µl
Final Volume	20 µl

جدول ۱. آماده سازی واکنش

۵. لوله‌ها را ببندید، مختصراً سانتریفیوژ کنید، آنها را داخل دستگاه قرار دهید و اجازه دهید مطابق مشخصات برنامه قید شده در جدول شماره ۲ تکثیر شوند. هنگام استفاده از کنترل مثبت یا مواد بالینی بسیار مراقب باشید.

- ✓ نکته در هر بار انجام تست یک لوله به‌عنوان No Template Control باید گذاشته شود. در NTC به‌جای نمونه استخراج شده از آب استفاده می‌شود که برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.
- ✓ بهتر است از فضاهای جداگانه برای اضافه‌کردن مستر واکنش و نمونه‌های بیمار استفاده کرد و همچنین در نظر داشته باشید که در ویال‌کنترل مثبت را تنها در محل آماده‌سازی نمونه و فضای آلوده باز نمایید.

برنامه ریزی دمایی

دستورالعمل برای دستگاه‌های MIC و Rotor-Gene توصیف شده است. دیگر دستگاه‌های Real-Time PCR دارای کانال‌های Red ، Orange، Green و Yellow نیز مناسب برای استفاده از این‌کیت هستند. پس از تنظیم‌کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید.

	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	10 min	1
Denaturation	95 °C	10 sec	40
Annealing and Acquisition on Channel Green, Orange, Red and Yellow	55°C	20 sec	
Extension	72°C	20 sec	

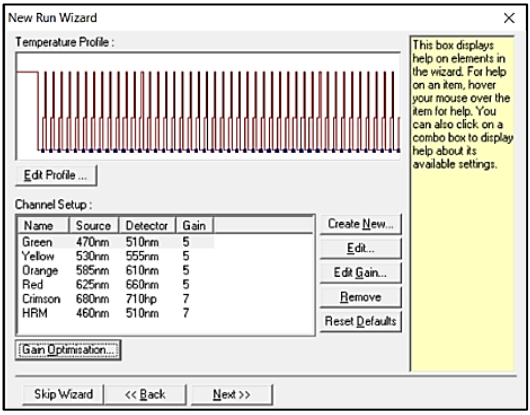
جدول ۲: برنامه دمایی دستگاه

علاوه بر تعریف دمایی دستگاه که در قسمت‌بالا آمده است دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت رنگ‌های FAM، Texas Red، HEX و CY5 نیز تنظیم‌گردد. برای پشتیبانی فنی لطفا با تلفن های شرکت تماس حاصل فرمایید.

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها

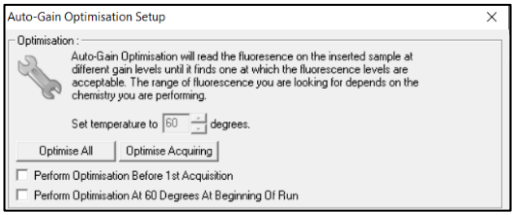
دستگاه Rotor-Gene

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه‌ی Gain Optimization را انتخاب کنید (شکل ۱).



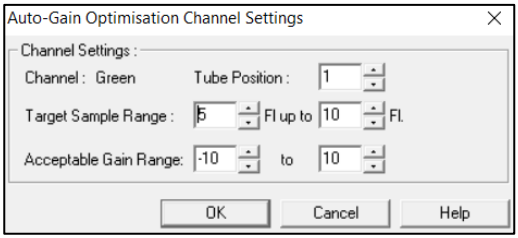
شکل ۱: تنظیمات دستگاه برای Gain Optimization

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimise Acquiring برای هر ۴ کانال سبز، زرد، نارنجی و قرمز، بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش‌فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



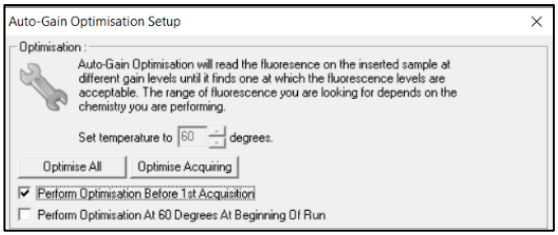
شکل ۲: تنظیمات دستگاه برای Auto Gain Optimization

توجه نمایید Gain دستگاه باید برمبنای تیوب شامل HPV Mix1 انجام شود، بنابراین عدد نوشته شده در کادر Tube Position باید صحیح نوشته شده باشد (شکل ۳).



شکل ۳: تنظیمات دستگاه برایAuto Gain Optimization

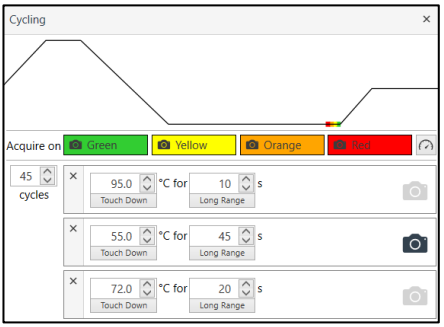
پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی Perform Optimization Before 1st Acquisation را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۴).



شکل ۴: تنظیمات دستگاه برایAuto Gain Optimization

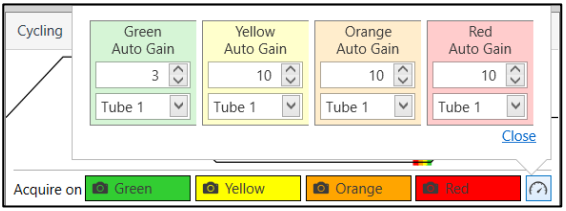
دستگاه MIC

بدین منظور در دستگاه MIC با انتخاب گزینه‌ی Run Profile پروفایل دمایی کیت را وارد کرده و در بخش cycling سنجش فلورسنت را در هر ۴ کانال فعال کنید (شکل ۵).



شکل ۵: تنظیمات دستگاه MIC

از آنجایی که Gain دستگاه باید برمبنای تیوب شامل HPV Mix1 انجام شود، با بازکردن پنجره‌ی تنظیمات Gain برای کانال‌های مختلف، در کادر مربوط به تیوب Gain، گزینه All tube را از حالت پیش‌فرض به تیوب مورد نظر تغییر دهید (شکل ۶).



شکل ۶: تنظیمات دستگاه MIC

آنالیز نتایج

۱. آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در ۴ کانال رنگی Green و Yellow و Orange و Red و یا فلورفورهای FAM و HEX و TEX و CY5 آستانه را در بازه‌ی مناسب قرار دهید.نتایج را به صورت زیر تفسیر کنید:

۱. نمونه زمانی مثبت می‌شود که دارای دو شرط زیر باشد.

- ✓ دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد.
- ✓ Ct برای ژنوتیپ های ۱۶ کمتر از ۴۰ و Ct، برای سایر ژنوتیپ ها کمتر از 35 باشد.
- ✓ نمونه در میکس ۱ در کانال نارنجی که کنترل داخلی(IC) است، مثبت باشد و CT حدود ۲۰ تا ۳۰ داشته باشد.

جدول تفسیر نتایج

	Green	Yellow	Orange	Red	Result
Mix 1	+	-	-	-	Pos: HPV16
	-	+	-	-	Pos: HPV6 or 11
	-	-	IC	-	Beta-globin(IC)
	-	-	-	+	Pos: HPV18
Mix 2	-	+	-	-	Pos: HPV31 or 35
	+	-	-	-	Pos: HPV33
	-	-	+	-	Pos: HPV39
	-	-	-	+	Pos: HPV45
Mix 3	+	-	-	-	Pos: HPV51
	-	+	-	-	Pos: HPV52
	-	-	+	-	Pos: HPV56
	-	-	-	+	Pos: HPV58
Mix 4	+	-	-	-	Pos: HPV59
	-	+	-	-	Pos: HPV66
	-	-	+	-	Pos: HPV67
	-	-	-	+	Pos: HPV68
Mix 5	+	-	-	-	Pos: HPV54 or70 or 71
	-	+	-	-	Pos: HPV44 or 74 or 42
	-	-	+	-	Pos: HPV61 or 72 or 62
	-	-	-	+	Pos: HPV40 or 43 or 91

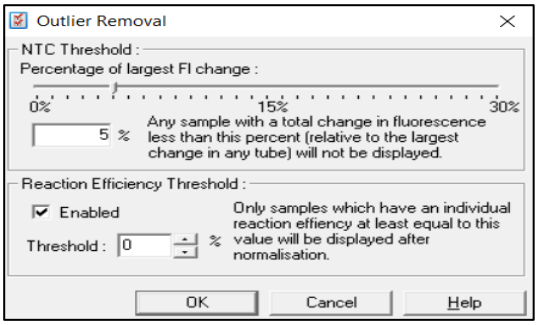
جدول ۳: تفسیر نتایج

دستگاه Rotor-Gene

آنالیز اطلاعات در دستگاه Rotor-gene 6000 و Rotor-gene 3000 باید توسط نرم‌افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.

۱. از منوی Quantitation، Analysis را انتخاب کرده و روی یک‌رنگ، به طور مثال Green، دوبار کلیک کنید.

۲. در صورت وجود نویز با کلیک بر گزینه ی Outlier Removal، ترشلد NTC را بر ۵٪ تنظیم کرده و ترشلد افیشنسی واکنش را به شکل زیر فعال کنید (شکل شماره ۴).



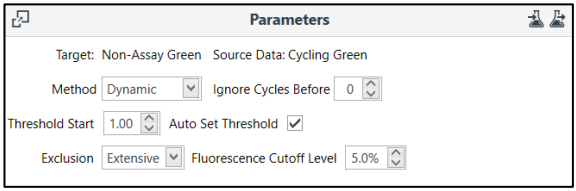
شکل ۷. تنظیمات دستگاه

۳. در کانال Green، Orange، Yellow و Red آستانه را بر ۰,۰۲ تنظیم نمایید.

دستگاه MIC PCR

آنالیز اطلاعات در دستگاه Magnetic Induction Cycler (Mic) PCR توسط نرم‌افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.

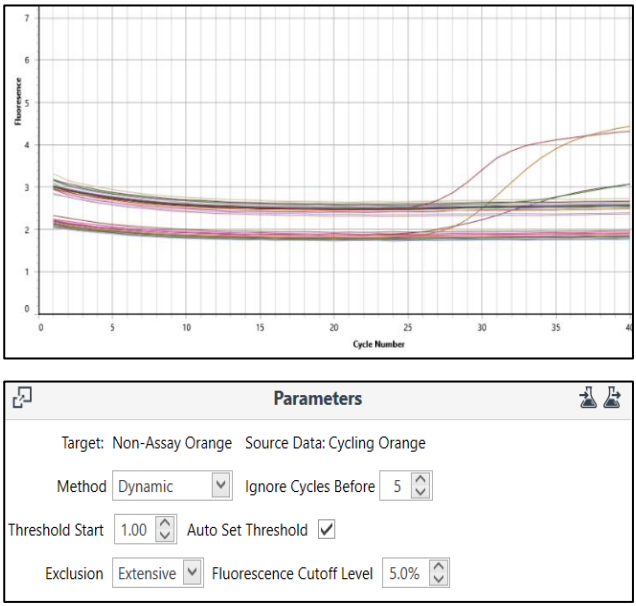
۱. از منوی Analysis روی یک رنگ، به طور مثال Non-Assay Green، کلیک کنید.
۲. در بخش Parameters به طور پیش‌فرض حالت Extensive برای Exclusion انتخاب شده است؛ و بخش Flourescence Cutoff Level بر ۵٪ تنظیم شده است. در غیر این صورت، این تنظیمات را وارد کنید (شکل ۸) :
۳. انتخاب Threshold را به صورت اتوماتیک با فعال کردن گزینه‌ی Auto Set Threshold انجام دهید.



شکل ۸. تنظیمات دستگاه

۴. مراحل بالا را برای کانال‌های دیگرOrange، Yellow و Red تکرار کنید.

۵. در صورت وجود نویز ابتدایی در بخش Data (شامل داده‌های خام) کانال Orange به شکل زیر، در بخش Parameters با قرار دادن عدد ۵ در کادر مقابل Ignore Cycles Before، ۵ سیکل ابتدایی را نادیده بگیرید (شکل ۹).



شکل ۹. تنظیمات دستگاه

ارزیابی آنالیتیکال

حساسیت آنالیتیکال

باتوجه به نتایج حاصله، حدپایین تشخیصی برای این کیت در تایپ‌های مختلف به شرح زیر است (جدول ۴):

Target	LoD
HPV 16	10 copies per PCR
HPV 6	5 copies per PCR
HPV 11	5 copies per PCR
HPV 18	10 copies per PCR
HPV 31	50 copies per PCR
HPV 33	250 copies per PCR
HPV 35	50 copies per PCR
HPV 39	25 copies per PCR
HPV 45	50 copies per PCR
HPV 51	50 copies per PCR
HPV 52	50 copies per PCR
HPV 56	25 copies per PCR
HPV 58	25 copies per PCR
HPV 59	50 copies per PCR
HPV 66	25 copies per PCR
HPV 68	500 copies per PCR
HPV 54-70-71	250 copies per PCR
HPV 44,74-42	250 copies per PCR
HPV 61,72-62	400 copies per PCR
HPV 40,43,91	300 copies per PCR

جدول ۴. ارزیابی حساسیت آنالیتیکال

اختصاصیت آنالیتیکال

به جهت بررسی اختصاصیت پرایمرها و پروب‌های کیت HPV ، احتمال شناسایی غیراختصاصی دیگر با عوامل‌عفونی بررسی گردید و نتایج بیوانفورماتیک اختصاصیت ۱۰۰٪ پرایمرها و پروبها را تایید نمودند. همچنین، این کیت با DNA عوامل دیگر که عمدتاً از دستگاه ادراری تناسلی جدا شده و بعضی نیز سبب بیماری می‌شوند بررسی گردید و نتایج عدم وجود واکنش متقاطع را نشان داد (جدول ۵).

Bacterium	chlamydia trachomatis	ureaplasma urealyticum
	Streptococcus hemolytis-β	Enterococcus faecalis
	Clostridium sporogenes	syphilis
	mycoplasma hominis	Bacillus pumilus
	Serratia marcescens subsp marcescens	neisseria gonorrhoeae
	Salmonella enterica subsp enterica	Pseudomonas aeruginosa
	Staphylococcus aureus subsp.aureus	Micrococcus luteus
	Escherichia coli	
Virus	herpes simplex virus	
Fungus	Candida albicans	monilia albican
Protozoan	trichomonas vaginalis	

جدول ۵: ارزیابی اختصاصیت آنالیتیکال

ارزیابی کلینیکال

حساسیت و اختصاصیت کلینیکال

برای تعیین حساسیت و اختصاصیت کلینیکال از ۲۰۰ نمونه مثبت و ۲۰۰ نمونه منفی استفاده شد. نتایج تستهای انجام شده در جدول۶ نشان داده شده است:

Target	Sensitivity	Specificity
HPV16	96%	**100%**
HPV6 or 11	97%	**100%**
HPV18	94.5%	**100%**
HPV31 or 35	92%	**98%**
HPV33	93%	**98%**
HPV39	98%	**92%**
HPV45	90%	**97%**
HPV51	90%	**96%**
HPV52	93%	**98%**
HPV56	90%	**96%**
HPV58	93%	**98%**
HPV59	90%	**97%**
HPV66	90%	**96%**
HPV67	93%	**98%**
HPV68	91%	**98%**
HPV54 or 70 or 71	91%	**94%**
HPV 44 or 74 or 42	90%	**94%**
HPV61or72 or 62	90%	**96%**
HPV40 or 43or 91	93%	**93%**

جدول ۶: نتایج حساسیت و اختصاصیت کلینیکی

پشتیبانی فنی

برای پشتیبانی فنی لطفا با تلفن های شرکت تماس حاصل فرمایید .

نشانه‌ها

	Research Use Only	برای مصارف پژوهشی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولید شده
	Temprature Limitation	محدودیت دمایی
	Concult Instructon For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficent for <n> tets	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

اطلاعات تماس

شرکت فناوری بن یاخته -گروه سین مورو

دفتر مرکزی : تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار ۲۴ متری سعادت آباد، خیابان حیدرنیا (دوم شرقی)، پلاک ۹، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی : ۱۹۹۷۷۷۵۵۵۵ تلفن : ۲۲۰۸۲۱۲۰ پشتیبان فنی : ۰۹۳۰۱۸۲۱۶۰۱

تلفن های تماس : ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

Web Site: www.Senmurv.co Email: info@senmurv.ir