tBioDx™ HPV ExtendScreen™ Kit

Instruction for Use

برای شناسایی، غربالگری و ژنوتایپینگ گسترده HPV به روش qPCR

Σ 25 Σ 100

Version 1.8

IVD

For in vitro diagnostic use

REF **412100-025**

REF **412100-100**

Zist Tashkhis Farda (tBioDx) Co., No. 2, 4th Dd. End, Seoul St., Tehran, Iran

سرفصل مطالب

کاربرد کیت	3
محتوای کیت	3
شرایط نگهداری - حمل، نگهداری و پایداری	3
مواد و ابزارهایی که مصرف کننده باید تهیه کند	3
اطلاعات ایمنی	4
توصیه های عمومی	4
نگهداری و کار با نمونه های بیولوژیک	6
کنترل کیفی	6
مقدمه	7
اصول و روش کار	7
آماده سازی نمونه برای استخراج DNA	9
استخراج DNA از LBC	9
استخراج DNA از FLOQSwab	11
نکات مهم در استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q	13
چیدمان نمونه ها بر روی روتور ۷۲ تایی دستگاه Rotor-Gene Q	13
برنامه PCR برای کیت *tBioDx*™ HPV ExtendScreen™ Kit	14
آماده سازی محلول واکنش برای انجام آزمایش HPV	30
آنالیز داده های آزمایش HPV	32
الف- آنالیز داده ها با استفاده از analysis template	32
ب- آنالیز داده ها بدون analysis template در نرم افزار دستگاه Rotor-Gene Q	37
تفسیر نتایج	40
عملکرد کیت	42
عملکرد آنالیتیکال	43
عملکرد کلینیکال	53
منابع	54
راهنمای رفع مشکلات	55
نکات عمومی مهم	58
اطلاعات سفارش	58
علائم	59

کاربرد کیت

کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit برای استفاده در آزمایش های بیولوژی مولکولی ساخته شده است. این کیت برای تشخیص زودهنگام HPV در غربالگری سرطان دهانه رحم ساخته شده است.

محتوای کیت

***tBioDx*™ HPV ExtendScreen™ Kit**	**Catalog no.: 412100-100**
نام محصول موجود در کیت	تعداد یا مقدار
qPCR Mix 1	1.6 mL
qPCR Mix 2	1.6 mL
qPCR Mix 3	1.6 mL
Positive Control	100 µL

شرایط حمل و نگهداری

شرایط حمل

کیت *tBioDx*™ HPV ExtendScreen™ Kit بر روی یخ خشک (CO_2 جامد) حمل می گردد. یخ خشک به صورت گرانول های سفید رنگ بوده و در اطراف کیت در حال حمل قرار می گیرد تا دمای حداقل ۳۰- تا ۲۰- را تأمین نماید. از تماس دست با این گرانول ها بپرهیزید زیرا به دلیل دمای بسیار پایین، می توانند موجب سوختگی پوست شوند.

شرایط نگهداری

کیت *tBioDx*™ HPV ExtendScreen™ Kit باید به محض دریافت در فریزر با دمای بین ۱۵- تا ۳۰- و دور از نور نگهداری شود.

پایداری

کیت *tBioDx*™ HPV ExtendScreen™ Kit در صورت نگهداری در دمای مناسب، تا پایان تاریخ مصرف درج شده بر روی جعبه پایدار و قابل استفاده است. در هنگام استفاده از کیت، می توانید محلول های کیت را در هر آزمایش در جعبه ی اصلی خود و در دمای ۱۵- تا ۳۰- نگهداری نمایید. از فریز و دفریز کردن بیش از ۵ بار محلول های کیت بپرهیزید.

مواد و ابزارهایی که مصرف کننده باید تهیه کند

برای استفاده از *tBioDx*™ HPV ExtendScreen™ Kit به مواد و ابزارهای زیر نیاز است:

- کیت استخراج *tBioCare™* HPV DNA Extraction Kit با شماره کاتالوگ 611400-50 و یا QIAamp MinElute Media Kit با شماره کاتالوگ 57414 از شرکت QIAGEN
- لوله ی ۱/۵ یا ۲ میلی لیتری
- ورتکس
- استریپ-تیوب های 0.1 mL برای استفاده در دستگاه Rotor-Gene Q
- میکرو سانتریفیوژ

- پیپتورهای مناسب برای انتقال حجم های بین ۱ تا ۱۰۰ میکرولیتر
- نوک سمپلر های فیلتر دار عاری از DNase
- دستگاه Rotor-Gene Q 5plex HRM و یا Rotor-Gene Q 5plex
- الگوی برنامه ی PCR برای *tBioDx*™ HPV ExtendScreen™ Kit قابل دانلود از لینک www.tbiodx.com
- الگوهای آنالیز نتایج PCR قابل دانلود از لینک www.tbiodx.com

اطلاعات ایمنی

هنگام کار با مواد شیمیایی حتما روپوش مناسب پوشیده، از دستکش نیتریل یا وینیل استفاده کرده و عینک محافظ چشم استفاده کنید. نمونه های بیولوژیک، بالقوه می توانند عفونی باشند.

تمام مواد موجود در کیت *tBioDx*™ HPV ExtendScreen™ Kit عاری از مواد خطرناک می باشند. برای اطلاعات بیشتر به برگ اطلاعات ایمنی (MSDS) مراجعه نمایید. این اطلاعات به صورت آنلاین و در صفحه محصول در www.tbiodx.com در دسترس شما قرار دارد.

توصیه های عمومی

استفاده از PCR در آزمایشگاه نیازمند به کار گیری اصولی است که رعایت آنها الزامی است، از قبیل:

۱- همیشه از دستکش های (وینیل یا نیتریل) یکبار مصرف و فاقد پودر استفاده کنید.

۲- نمونه ی مورد آزمایش، کیت ها و محلول های آزمایش را از آلودگی میکروبی و نوکلئازها (DNase) محافظت کنید. نوکلئازها (DNase) می توانند موجب تخریب و تجزیه الگوی واکنش (DNA) شوند.

۳- از آلودگی نمونه ی مورد آزمایش به DNAی نمونه های دیگر (cross contamination) یا محصول PCR (carryover) محافظت کنید. برای این منظور:

- در حین کار با نمونه ی بیولوژیک، از تماس دستکش به دهانه لوله ها هنگامی که درب لوله ها باز است، یا هنگامی که درب لوله ها را باز می کنید، بپرهیزید. در صورت تماس، بلافاصله دستکش خود را تعویض کنید.
- در صورت کار بر روی چند نمونه ی بیولوژیک به طور همزمان، فاصله فیزیکی مناسب بین لوله ها بگذارید و ترجیحا درب لوله ها را به نوبت باز کرده و پس از انجام پیپتینگ درب آن را بسته و پیپتینگ نمونه ی بعدی را آغاز کنید.
- در صورتیکه باید درب لوله های نمونه در حین آزمایش باز باشند، در هنگام پیپتینگ مراقب باشید تا «ذرات معلق» (aerosol) ایجاد نکنید.
- در صورت نیاز به سانتریفیوژ، مطمئن شوید که درب لوله های آزمایش کاملا بسته هستند.
- در صورتیکه در بخشی از آزمایش، محلول داخل لوله ها باید با سر-و-ته کردن لوله ها یا ورتکس مخلوط شوند، هیچگاه درب آنها را پیش از یک سانتریفیوژ کوتاه باز نکنید.
- در صورتیکه در بخشی از آزمایش، محلول داخل لوله ها باید در دمای بالاتر از اتاق انکوبه شوند (مثلا ۶۰ درجه یا بیشتر در مراحل استخراج اسیدهای نوکلئیک)، هیچگاه درب آنها را پیش از یک سانتریفیوژ کوتاه باز نکنید.
- در هنگام کار با محلول های غلیظ (viscous)، مانند بافرهای لیز کننده و یا محلول های حاوی دترجنت، از پیپتینگ معکوس (reverse pipetting) برای انتقال محلول استفاده کنید تا از تشکیل حباب و ذرات معلق جلوگیری شود.

- هنگام کار با محلول هایی که غلظت بالایی ندارند، مراقب باشید تا در هنگام پیپتینگ (چه مکش و چه تخلیه ی نوک سمپلر)، حباب هوا و یا ذرات معلق (aerosol) ایجاد نکنید.
- پس از هر پیپتینگ محلول حاوی نمونه ی بیولوژیک یا اسید نوکلئیک، نوک سمپلر را به آرامی در ظرف مخصوص دور بیاندازید.
- هیچگاه لوله های PCR را پس از اتمام آزمایش به اتاق استخراج و یا آماده سازی محلول ها منتقل نکنید.

۴- همیشه از نوک سمپلر های فیلتر دار و یکبار مصرف عاری از نوکلئازها (DNase/RNase-Free) استفاده کنید.

۵- مواد موجود در کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit آماده ی مصرف هستند. از رقیق کردن آنها بپرهیزید چون موجب عدم کارایی کیت خواهد شد.

۶- مواد موجود در کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit را با مواد مشابه از کیت دیگر جا به جا نکنید.

۷- از تغییر دماها یا زمان های مراحل PCR در کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit بپرهیزید زیرا موجب عدم کارایی یا کاهش عملکرد آن خواهد شد.

۸- از کیتی که تاریخ آن گذشته است استفاده نکنید.

۹- در معرض نور قرار گرفتن لوله های حاوی محلول PCR کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit را به حداقل برسانید. عدم رعایت این موضوع می تواند در کارایی کیت (و یا هر کیتی که از پروب های فلورسانس استفاده می کند) اثر بگذارد.

۱۰- قبل از اولین آزمایش در هر روز، یک برنامه ی ساده ی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه با دستگاه Rotor-Gene Q بگذارید تا دستگاه آماده آزمایش اصلی شود.

۱۱- برنامه ی حاوی زمان ها و دماهای PCR را علاوه بر شرح در این کتابچه، می توانید به صورت الگوی از قبل آماده (run-file template) از سایت این شرکت (www.tbiodx.com) دریافت نمایید. در این حالت کلیه ی پارامترهای مربوط به برنامه ی PCR، به صورت خودکار در دستگاه تعریف و قابل استفاده خواهند بود. دستورالعمل استفاده از این الگو در بخش برنامه ریزی دستگاه شرح داده شده است.

۱۲- برنامه ی آنالیز نتایج PCR با کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit را علاوه بر شرح در این کتابچه، می توانید به صورت الگوی از قبل آماده (analysis template) از سایت این شرکت (www.tbiodx.com) دریافت نمایید. در این حالت کلیه ی پارامترهای آنالیز به صورت خودکار اعمال و نتایج قابل ارزیابی خواهند بود. دستورالعمل استفاده از این الگو در بخش آنالیز نتایج شرح داده شده است.

نگهداری و کار با نمونه ی بیولوژیک

احتیاط	تمام نمونه های بیولوژیک باید به طور بالقوه مواد عفونی تلقی شوند.

نمونه های سرویکال در LBC

کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit برای استفاده از DNAی استخراج شده از نمونه هایی که از دهانه رحم گرفته (scrapes) و در LBC ذخیره شده اند صحه گذاری شده است. به محض دریافت نمونه، آن را در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد نگهداری کنید. نمونه های LBC را می توانید بین ۱ تا ۳ ماه (بسته به تولید کننده ی LBC) در شرایط ذکر شده نگهداری کنید.

نمونه ی سرویکو-واژینال گرفته شده توسط خود فرد (self-collected) با FLOQswab ساخت شرکت COPAN

کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit برای استفاده از DNAی استخراج شده از نمونه هایی که توسط خود فرد (self-collected) از واژن-سرویکس (cervico-vaginal) گرفته شده اند صحه گذاری شده است. این نمونه ها به صورت خشک و در دمای اتاق حمل می شوند. نمونه ها در حالت خشک و در دمای اتاق، تا ۱۰ روز پایداری کامل دارند. به محض دریافت نمونه، با رعایت کامل اصول ایمنی کار با نمونه های بیولوژیک و توصیه های عمومی مذکور در صفحه ۴، مقدار ۲ میلی لیتر PBS استریل به آن اضافه نموده و پس از ۳۰ تا ۶۰ ثانیه ورتکس، در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد نگهداری کنید. در این حالت نمونه ها را می توانید تا ۳ ماه در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد نگهداری کنید.

کنترل کیفی

مطابق با سیستم مدیریت کیفیت (ISO) شرکت زیست تشخیص فردا، هر سری تولید (Lot) از کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit با آزمایش های خاص و از پیش تعریف شده مورد ارزیابی قرار می گیرند تا از کیفیت آنها اطمینان حاصل شود.

مقدمه

کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit برای تشخیص کیفی ۱۴ ژنوتیپ از ویروس HPV با ریسک بالای ایجاد سرطان دهانه رحم (high-risk HPV) طراحی و صحه گذاری شده است. این ژنوتیپ ها عبارتند از: ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶، و ۶۸. علاوه بر ۱۴ ژنوتیپ فوق، ژنوتیپ ۶۷ جزء «احتمالا» با ریسک بالا (probably hrHPV) طبقه بندی می شود نیز شناسایی می گردد.

از کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit می توان برای شناسایی DNAی ۱۴ ژنوتیپ hrHPV ذکر شده که از نمونه های LBC و فلاک-سواب گرفته شده توسط خود فرد (self-collected FLOQSwabs) استفاده نمود.

صحه گذاری کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit با استفاده از راهنماهای معتبر جهانی (FDA و Meijer Guidline) صورت گرفته است و می تواند هم در غربالگری اولیه (primary screening) سرطان دهانه رحم در بانوان بین ۲۵ تا ۶۵ سال و هم در پیگیری درمان به شرح زیر مورد استفاده قرار گیرد:

- به عنوان آزمایش غربالگری اولیه سرطان دهانه رحم در بانوان، برای تعیین ریسک ابتلا به سرطان دهانه رحم و تعیین نیاز به ارجا ع برای کولپوسکوپی و یا سایر روش های مدیریت بیمار توسط پزشک متخصص زنان و یا انکولوژیست به کار می رود.
- به عنوان آزمایش پیگیری (follow-up) در بانوانی که سلول های سنگفرشی غیرمعمول با اهمیت نامشخص (ASQ-US)، و یا نئوپلازیای درون-اپیتلیالی سنگفرشی با درجه کم (LSIL) در تست پاپ آنها مشاهده شده است به کار می رود تا نیاز به کولپوسکوپی یا سایر روش های پیگیری و مدیریت بیمار توسط پزشک متخصص انکولوژیست زنان تعیین گردد.

کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit برای استفاده در آزمایشگاه هایی است که تکنسین آنها برای تکنیک های بیولوژی مولکولی و تشخیص مولکولی آموزش دیده اند.

اصول و روش کار

ویروس پاپیلومای انسانی (human papillomavirus - HPV)، یک ویروس با DNAی حلقوی دو رشته ای است که نزدیک به ۸ کیلوباز طول دارد. این ویروس متعلق به خانواده ی Papillomaviridae بوده و به زیر گروه های آلفا، بتا، گاما، نیو و میو تقسیم می شود. گروه آلفای این ویروسها پوست یا مخاط و یا هر دو را آلوده می کنند و به دو دسته ی عمومی «با ریسک پایین» (low-risk HPV - lrHPV) و «با ریسک بالا» (high-risk HPV - hrHPV) تقسیم می شوند. انوا ع high-risk HPV این ویروس که در مخاط تکثیر می شوند، طبق مطالعات اپیدمیولوژی، کارسینوژن هستند. این ۱۴ ژنوتیپ شناخته شده (۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۸، ۵۹، ۶۶ و ۶۸) موجب ضایعات مخاطی (mucosal lesions) می شوند که می تواند به بدخیمی بیانجامد. برخی از ژنوتیپ ها نیز مانند ژنوتیپ ۶۷ جزء «احتمالا با ریسک بالا» (probably high-resik) طبقه بندی می شوند.

آلودگی به ویروس HPV در بیش از ۸۰ درصد از افراد جامعه حداقل یکبار در طول عمرشان اتفاق می افتد. این آلودگی در بیش از ۹۲ درصد از افراد طی یک تا سه سال توسط سیستم ایمنی بدن، پاک می شود. سرطان دهانه رحم و ضایعات پیش سرطانی شامل نئوپلازی درون اپیتلیالی سرویکس (cervical intraepithelial neoplasia) یا CIN، حاصل تداوم عفونت با ویروسهای high-risk HPV است.

ژنوم ویروس HPV شامل ژن های E و L است که در ابتدا و انتهای چرخه ی زندگی ویروس مسئول تولید پروتئین های لازم می باشند. ژنهای E6 و E7 در ژنوتیپ های hrHPV ویژگی های کارسینوژنیک داشته و مسئول تغییر سلول های میزبان (دهانه رحم یا مخاط) به شکل بدخیمی هستند. این ویژگی با ادغام (integration) ژنوم ویروس در ژنوم سلول میزبان ارتباط مستقیم دارد. این ادغام ژنومی باعث به هم ریختگی (و گاه حذف) بخش هایی از ژنوم ویروس در ناحیه ی E1 تا L1 می شود. به همین خاطرآزمایش های PCRی که پرایمر و پروب هایشان برای این نواحی طراحی شده اند، گاه قادر به شناسایی ویروس در این مرحله نیستند. از آنجایی که شروع تغییرات سلولی پس از ادغام ژنومی، و ادامه ی این تغییرات به تولید پروتئین های ژنهای E6 و E7 وابسته است، این ناحیه از ژنوم ویروس در سرطان دهانه رحم و سلول های ضایعات پیش-سرطانی (CIN)، سالم باقی می ماند. از آنجایی که تشخیص سلولهای پیش-سرطانی و سرطانی اهمیت ویژه ای در حساسیت کلینیکی و همچنین ویژگی کلینیکی تشخیص hrHPV دارد، کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit ناحیه E6 و E7 را هدف قرارداده و بخش حفاظت شده ای از این دو ناحیه را تکثیر می کند. همچنین این کیت با استفاده از راهنماهای معتبری (FDA و Meijer Guideline) صحه گذاری کلینیکی شده است. بخشی از اطلاعات صحه گذاری آنالیتیکال و کلینیکال این کیت در بخش «عملکرد کیت» آمده است.

در کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit از روش multiplex real-time PCR برای تکثیر نواحی حفاظت شده ی ژن های E6 و E7 ژنوتیپ های hrHPV (۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶ و ۶۸) و ژنوتیپ «احتمالا با ریسک بالا»ی ۶۷ استفاده شده است. در این کیت، در صورت وجود DNAی ویروس، پس از استخراج از LBC یا FLOQSwab، مقدار سیگنال فلورسنس در هر سیکل از واکنش PCR، با تکثیر بخشی از ژنوم ویروس، افزایش یافته و منجر به تشکیل منحنی تکثیر در دستگاه real-time PCR می شود. در صورتیکه تعداد ویروس hrHPV در نمونه، با توجه به حساسیت آنالیتیکال تنظیم شده در صحه گذاری، بیشتر از حد آستانه ی تشخیص (LoD) برای هر ژنوتیپ باشد، مقدار سیگنال فلورسنس از خط آستانه (threshold) عبور کرده و با توجه به سیکل آستانه (threshold cycle - ct)، آن نمونه مثبت تلقی می شود.

روش multiplex real-time PCR یا multiplex qPCR این امکان را فراهم می کند که چندین ناحیه ی هدف، به طور همزمان تکثیر شود و در صورت استفاده از فلوروفورهای مختلف، این نواحی هدف یا ژنوتیپ ها را بتوان از هم تفکیک کرد. در کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit، نواحی حفاظت شده ی هدف در ژنوم hrHPV، در سه تیوب مجزا تکثیر شده و با توجه به استفاده از فلوروفورهای مختلف برای ژنوتیپ های گوناگون، می توان ۷ ژنوتیپ با انکوژنیسیتی بالا و متوسط را که عامل بیش از ۹۰٪ از سرطان دهانه رحم هستند را از هم تفکیک کرد. ژنوتیپ های با انکو ژنیسیتی کم به صورت تجمیعی (pooled) گزارش می شوند:

- تیوب ۱ - ژنوتیپ های ۱۶و ۱۸ و ۵۸ از یکدیگر تفکیک (ژنوتایپ) می شوند.
- تیوب ۲ - ژنوتیپ های ۳۱ و ۳۳ از یکدیگر تفکیک (ژنوتایپ) و برخی ژنوتیپ های دیگر به صورت تجمیعی (pooled) گزارش می شوند.
- تیوب ۳ - ژنوتیپ های ۴۵ و ۵۲ از یکدیگر تفکیک (ژنوتایپ) و برخی ژنوتیپ های دیگر به صورت تجمیعی (pooled) گزارش می شوند.
- در هر سه تیوب ۱ تا ۳، بخشی از ژن GAPDH انسان نیز به عنوان کنترل داخلی تکثیر می شود تا هم کیفیت استخراج DNA کنترل شود، هم وجود مهار کننده ها در نمونه شناسایی شود و هم خطای پیپتینگ آشکار گردد (زیرا اگر به هر یک از تیوب ها، DNA اضافه نشود با عدم تکثیر کنترل داخلی، از گزارش منفی کاذب جلوگیری می شود).

آماده سازی نمونه برای استخراج DNA

نمونه های LBC

کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit برای استفاده از DNAی استخراج شده از نمونه هایی که از دهانه رحم گرفته (scrapes) و در LBC ذخیره شده اند صحه گذاری شده است. به محض دریافت نمونه، آن را در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد نگهداری کنید. نمونه های LBC را می توانید بین ۱ تا ۳ ماه (بسته به تولید کننده ی LBC) در شرایط ذکر شده نگهداری کنید.

قبل از شروع استخراج DNA، ظرف حاوی LBC (حاوی ۱۰ میلی لیتر محلول LBC) را به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه ورتکس کنید. سپس با رعایت کامل اصول ایمنی کار با نمونه های بیولوژیک و توصیه های عمومی مذکور در صفحه ۴، مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر از محلول LBC را برداشته و به یک تیوب ۱/۵ یا ۲ میلی لیتری منتقل نمایید. پروتکل استخراج DNA را طبق مراحل صفحه ۹ شروع کنید.

نمونه ی سرویکو-واژینال گرفته شده توسط خود فرد (self-collected) با FLOQswab ساخت شرکت COPAN

کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit برای استفاده از DNAی استخراج شده از نمونه هایی که توسط خود شخص (self-collected) از واژن-سرویکس (cervico-vaginal) گرفته شده اند صحه گذاری شده است. این نمونه ها به صورت خشک و در دمای اتاق حمل می شوند. نمونه ها در حالت خشک و در دمای اتاق، تا ۱۰ روز پایداری کامل دارند. به محض دریافت نمونه، با رعایت کامل اصول ایمنی کار با نمونه های بیولوژیک و توصیه های عمومی مذکور در صفحه ۴، مقدار ۲ میلی لیتر PBS استریل به آن اضافه نموده و پس از ۳۰ تا ۶۰ ثانیه ورتکس، در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد نگهداری کنید. در این حالت نمونه ها را می توانید تا ۳ ماه در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد نگهداری کنید. برای نگهداری طولانی مدت از فریزرهای ۲۰- یا ۸۰- استفده کنید.

قبل از شروع استخراج DNA، تیوب حاوی PBS (حاوی ۲ میلی لیتر محلول PBS) را به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید. سپس با رعایت کامل اصول ایمنی کار با نمونه های بیولوژیک و توصیه های عمومی مذکور در صفحه ۴، مقدار ۲۵۰ میکرو لیتر از محلول PBS را برداشته و به یک تیوب ۱/۵ یا ۲ میلی لیتری منتقل نمایید. پروتکل استخراج DNA را طبق مراحل صفحه ۱۱ شروع کنید.

استخراج DNA از LBC

استخراج DNA با کیت *tBioCare™* HPV DNA Extraction Kit

در این پروتکل، مراحل استخراج DNA از ۵۰۰ میکرولیتر نمونه های LBC شرح داده می شود. در این پرتکل، مرحله تغلیظ سلولی و یک شستشو قبل از استخراج و خالص سازی DNA انجام می شود.

قبل از شروع

- بافر HL را طبق دستورالعمل صفحه ۳ کتابچه راهنمای کیت *tBioCare™* HPV DNA Extraction Kit آماده کنید.
- ترموبلاک را بر روی ۹۵ درجه سانتیگراد تنظیم کنید.
- ذرات مگنتیک H را به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس کنید تابه خوبی مخلوط و یکنواخت شود.

- مقدار کافی از مخلوط بافر HB و ذرات مگنتیک H به شرح زیر آماده کنید:
  - مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از بافر HB به یک لوله تمیز منتقل کنید.
  - مقدار ۳۰ میکرولیتر ذرات مگنتیک H به بافر HHB اضافه کنید. (**نکته:** حجم ذرات مگنتیک را تغییر ندهید. این ذرات همیشه در حجم ۳۰ میکرو لیتر باید استفاده شود و ارتباطی به حجم نمونه ندارد.)
  - مخلوط فوق را به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید تا کاملا یکنواخت شود.

پروتکل

۱- مخلوط بافر HB و ذرات مگنتیک H را طبق بالا صفحه قبل در یک لوله ۱/۵ یا ۲ میلی لیتری تمیز آماده کنید.

۲- مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از LBC را به مخلوط مرحله ۱ اضافه کنید و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید تا به خوبی مخلوط و یکنواخت شود. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۳- لوله را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. هر یک دقیقه، لوله ها را سرو-و-ته کنید تا محلول یکنواخت باقی بماند. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۴- نمونه را به مدت ۲ دقیقه بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنتیک به جداره لوله متصل شوند.

۵- بدون برداشتن لوله از روی رک مگنتیک، درب لوله را باز کرده و محلول رویی را دور بریزید.

۶- مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر HB به تیوب اضافه کنید. درب آن را ببندید و از روی رک مگنتیک بردارید و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۷- نمونه را به مدت ۲ دقیقه بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنتیک به جداره لوله متصل شوند.

۸- بدون برداشتن لوله از روی رک مگنتیک، درب لوله را باز کرده و محلول رویی را دور بریزید.

۹- مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر HL به تیوب اضافه کنید. مقدار ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K با غلظت (20mg/ml) به لوله اضافه کنید. درب آن را ببندید و از روی رک مگنتیک بردارید و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۱۰- نمونه را در ترموبلاک (ترجیحا ترمومیکسر) با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه کنید. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۱۱- نمونه را به مدت ۵ ثانیه ورتکس کنید. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۱۲- نمونه را به مدت ۲ دقیقه بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنتیک به جداره لوله متصل شوند.

۱۳- بدون برداشتن لوله از روی رک مگنتیک، درب لوله را باز کرده و محلول شفاف شده را به یک لوله ی تمیز منتقل نمایید.

۱۴- می توانید DNAی استخراج شده را تا ۲ ساعت در یخچال نگهدارید. در صورتی که آزمایش بعدی با فاصله ی بیشتر از ۲ ساعت انجام می شود، DNA استخراج شده را در دمای ۲۰- ذخیره کنید.

استخراج DNA با کیت QIAamp MinElute Media Kit شرکت QIAGEN

با استفاده از کیت فوق و طبق پروتکل آن و با ۲۵۰ میکرولیتر LBC استخراج DNA را آغاز نمایید. در پایان استخراج و در مرحله ایلوت، DNA داخل ستون استخراج را با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از بافر مذکور در کیت، ایلوت کنید.

استخراج DNA از نمونه های سرویکو-واژینال گرفته شده توسط خود فرد (self-collected) با FLOQswab

استخراج DNA با کیت *tBioCare™* HPV DNA Extraction Kit

در این پروتکل، مراحل استخراج DNA از ۲۵۰ میکرولیتر نمونه های سرویکو-واژینال گرفته شده توسط خود فرد (self-collected) با FLOQswab شرح داده می شود. در این پرتکل، مرحله تغلیظ سلولی و یک شستشو قبل از استخراج و خالص سازی DNA انجام می شود.

قبل از شروع

- بافر HL را طبق دستورالعمل صفحه ۳ کتابچه راهنمای کیت *tBioCare™* HPV DNA Extraction Kit آماده کنید.
- ترموبلاک را بر روی ۹۵ درجه سانتیگراد تنظیم کنید.
- ذرات مگنتیک H را به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس کنید تابه خوبی مخلوط و یکنواخت شود.
- مقدار کافی از مخلوط بافر HB و ذرات مگنتیک H به شرح زیر آماده کنید:
  - مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از بافر HB به یک لوله تمیز منتقل کنید.
  - مقدار ۳۰ میکرولیتر ذرات مگنتیک H به بافر HB اضافه کنید. (**نکته:** حجم ذرات مگنتیک را تغییر ندهید. این ذرات همیشه در حجم ۳۰ میکرو لیتر باید استفاده شود و ارتباطی به حجم نمونه ندارد.)
  - مخلوط فوق را به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید تا کاملا یکنواخت شود.

پروتکل

۱- مخلوط بافر HB و ذرات مگنتیک H را طبق توضیحات صفحه قبل در یک لوله ۱/۵ یا ۲ میلی لیتری تمیز آماده کنید.

۲- مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از محلول لوله ی حاوی FLOQSwab را به مخلوط مرحله ۱ اضافه کنید و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید تا به خوبی مخلوط و یکنواخت شود. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۳- لوله را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. هر یک دقیقه، لوله ها را سرو-و-ته کنید تا محلول یکنواخت باقی بماند. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۴- نمونه را به مدت ۲ دقیقه بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنتیک به جداره لوله متصل شوند.

۵- بدون برداشتن لوله از روی رک مگنتیک، درب لوله را باز کرده و محلول رویی را دور بریزید.

۶- مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر HB به تیوب اضافه کنید. درب آن را ببندید و از روی رک مگنتیک بردارید و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۷- نمونه را به مدت ۲ دقیقه بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنتیک به جداره لوله متصل شوند.

۸- بدون برداشتن لوله از روی رک مگنتیک، درب لوله را باز کرده و محلول رویی را دور بریزید.

۹- مقدار۱۲۵ میکرولیتر بافر HL به تیوب اضافه کنید. درب آن را ببندید و از روی رک مگنتیک بردارید و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس کنید. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۱۰- نمونه را در ترموبلاک (ترجیحا ترمومیکسر) با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه کنید. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۱۱- نمونه را به مدت ۵ ثانیه ورتکس کنید. لوله را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید تا تمام محلولهای متصل به دیواره و یا درب لوله به انتهای لوله منتقل شوند.

۱۲- نمونه را به مدت ۲ دقیقه بر روی رک مگنتیک قرار دهید تا ذرات مگنتیک به جداره لوله متصل شوند.

۱۳- بدون برداشتن لوله از روی رک مگنتیک، درب لوله را باز کرده و محلول شفاف شده را به یک لوله ی تمیز منتقل نمایید.

۱۴- می توانید DNAی استخراج شده را تا ۲ ساعت در یخچال نگهدارید. در صورتی که آزمایش بعدی بافاصله ی بیشتر از ۲ ساعت انجام می شود، DNA استخراج شده را در دمای ۲۰- ذخیره کنید.

استخراج DNA با کیت QIAamp MinElute Media Kit شرکت QIAGEN

با استفاده از کیت فوق و طبق پروتکل آن و با ۲۵۰ میکرولیتر PBS (پس از آماده سازی نمونه ی سرویکو-واژینال گرفته شده توسط خود فرد (self-collected) با FLOQswab که در صفحه ۹ شرح داده شده است) استخراج DNA را آغاز نمایید. در پایان استخراج و در مرحله ایلوت، DNA داخل ستون استخراج را با اضافه کردن ۱۲۵ میکرولیتر از بافر مذکور در کیت، ایلوت کنید.

نکات مهم در استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q

با مراجعه به کتابچه راهنمای دستگاه Rotor-Gene Q، خود را با کار با این دستگاه آشنا کنید. دو دستگاه Rotor-Gene Q 5plex HRM و یا Rotor-Gene Q 5plex برای صحه گذاری آنالیتیکال و کلینیکال کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit استفاده شده است. برای انجام PCR حتما از استریپ-تیوب های ۰/۱ میلی لیتری و روتور ۷۲ تایی دستگاه، استفاده نمایید.

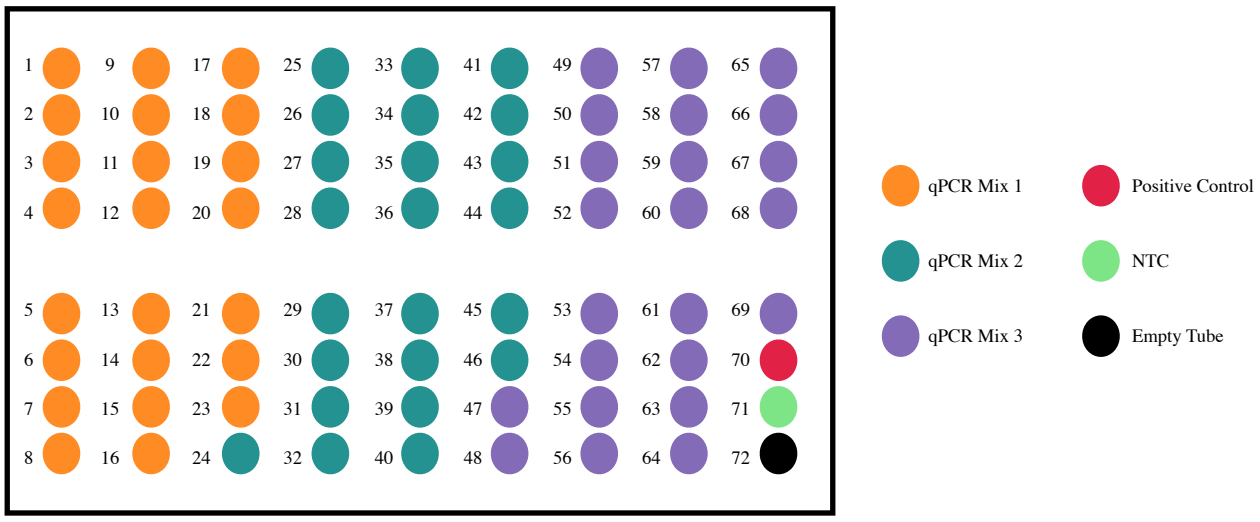
قبل از اولین آزمایش در هر روز، یک برنامه ساده ی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه با دستگاه Rotor-Gene Q بگذارید تا دستگاه آماده آزمایش اصلی شود.

برنامه ی حاوی زمان ها و دماهای PCR کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit را علاوه بر شرح در این کتابچه، می توانید به صورت الگوی از قبل آماده (run-file template) از سایت این شرکت (www.tbiodx.com) دریافت نمایید. در این حالت کلیه ی پارامترهای مربوط به برنامه ی PCR، به صورت خودکار در دستگاه تعریف و قابل استفاده خواهند بود. دستورالعمل استفاده از این الگو در بخش برنامه ریزی دستگاه شرح داده شده است.

برنامه ی آنالیز نتایج PCR با کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit را علاوه بر شرح در این کتابچه، می توانید به صورت الگوی از قبل آماده (analysis template) از سایت این شرکت (www.tbiodx.com) دریافت نمایید. در این حالت کلیه ی پارامترهای آنالیز به صورت خودکار اعمال و نتایج قابل ارزیابی خواهند بود. دستورالعمل استفاده از این الگو در بخش آنالیز نتایج شرح داده شده است.

چیدمان نمونه ها بر روی روتور ۷۲ تایی دستگاه Rotor-Gene Q

با استفاده از این روتور می توان تا ۲۳ نمونه را در کنار یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی آزمایش کرد. شکل شماتیک چیدمان (و پیپتینگ نمونه ها) برای تیوب های ۱، ۲ و ۳ آزمایش PCR برای هر نمونه در بلوک آماده سازی تیوب ها در زیر میبینید:

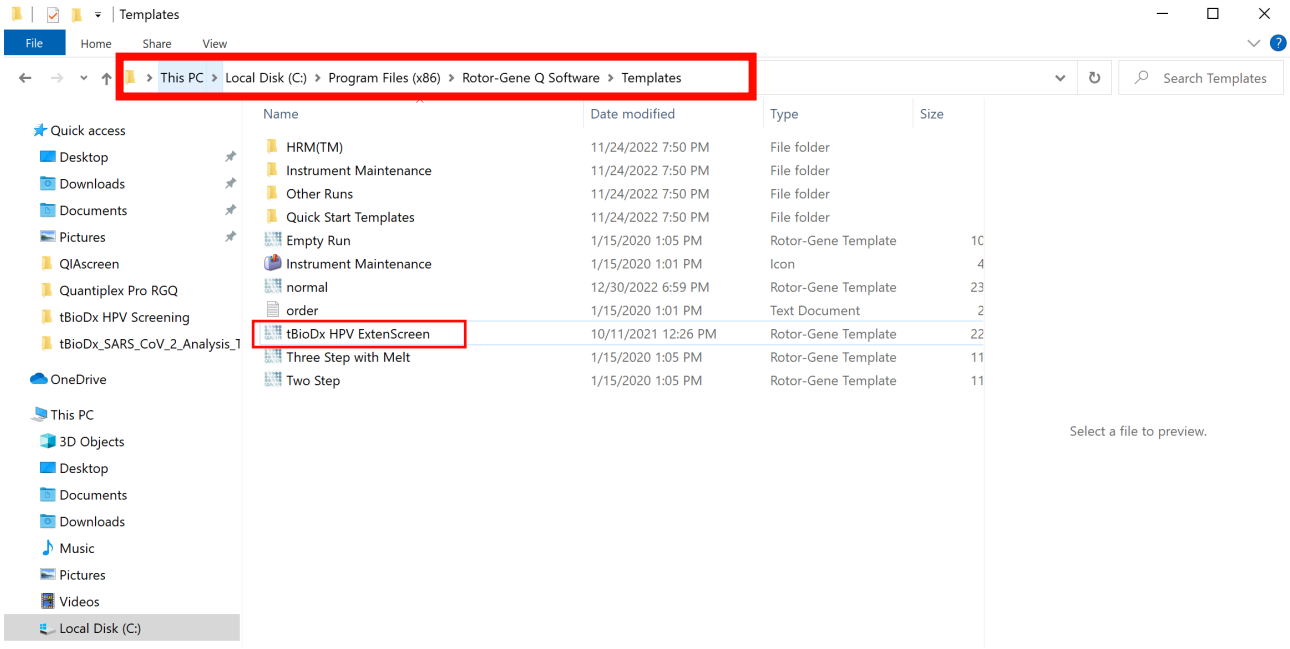


برنامه PCR برای کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit

برای تنظیم برنامه ی PCR کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit بر روی دستگاه Rotor-Gene Q (RGQ) به دو روش زیر می توان عمل کرد:

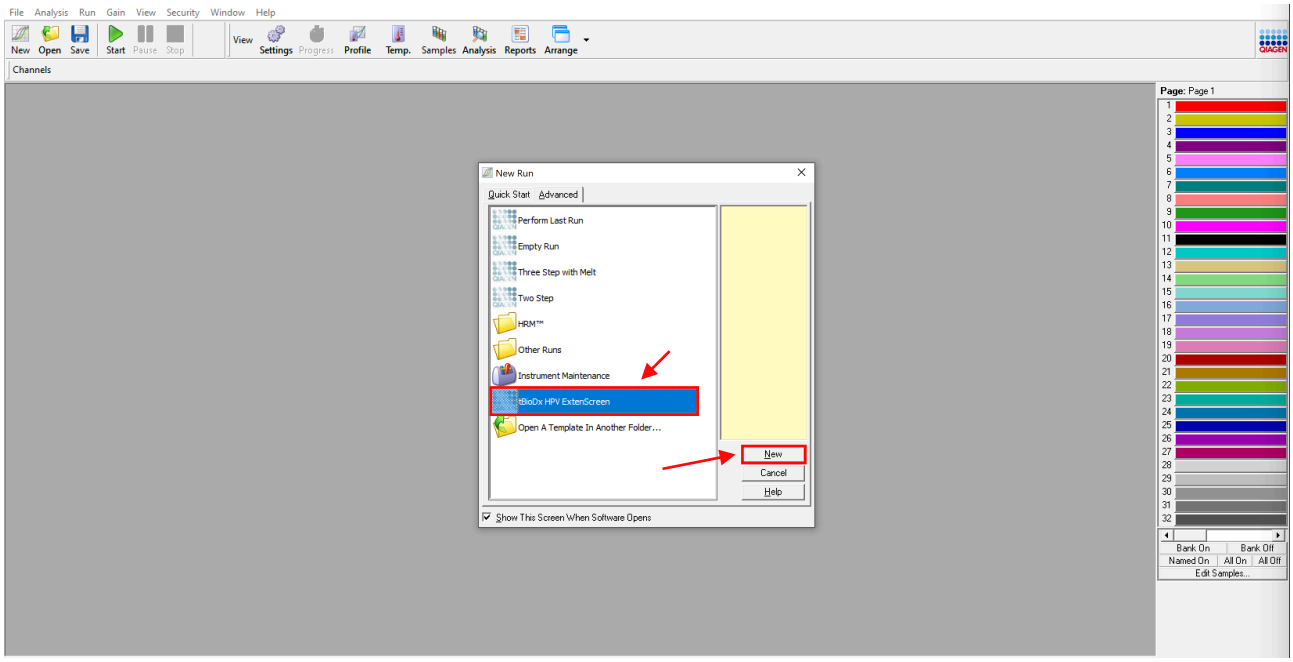
الف- استفاده از الگوی از قبل آماده (run-file template) به صورت زیر:

۱- الگوی از قبل آماده (run-file template) را از شرکت زیست تشخیص فردا دریافت و در پوشه ی نرم افزار RGQ به آدرس زیر ذخیره نمایید:

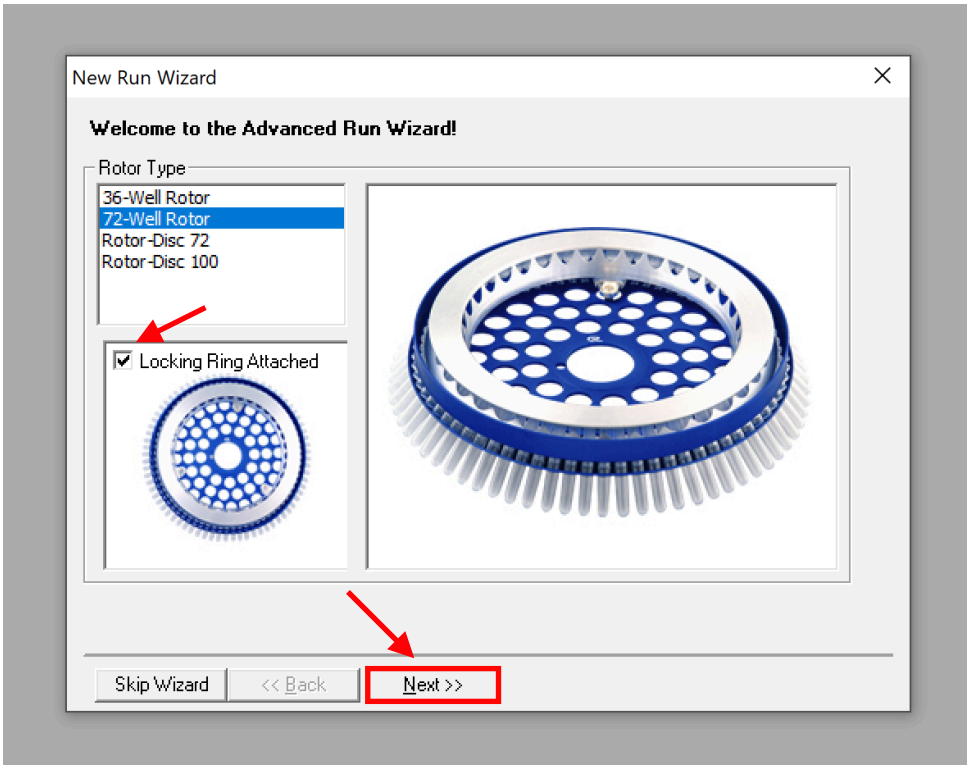


۲- بر روی علامت نرم افزار دستگاه Rotor-Gene Q دو بار کلیک کنید تا برنامه باز شود:

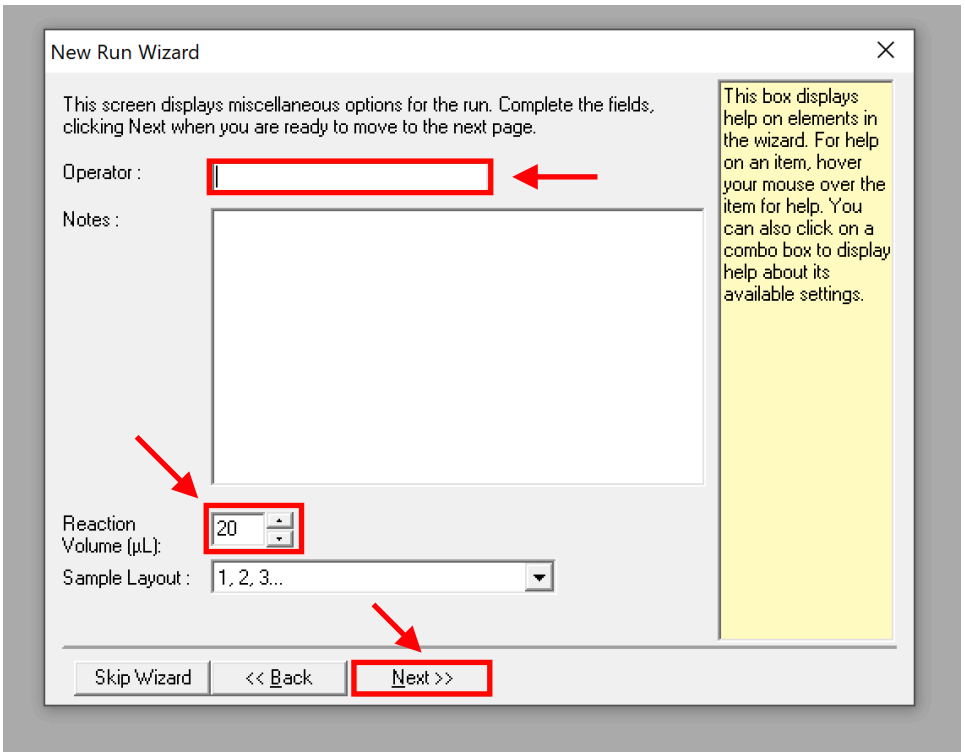
۳- برنامه tBioDx™ HPV ExtendScreen™ را انتخاب و بر روی New کلیک نمایید:



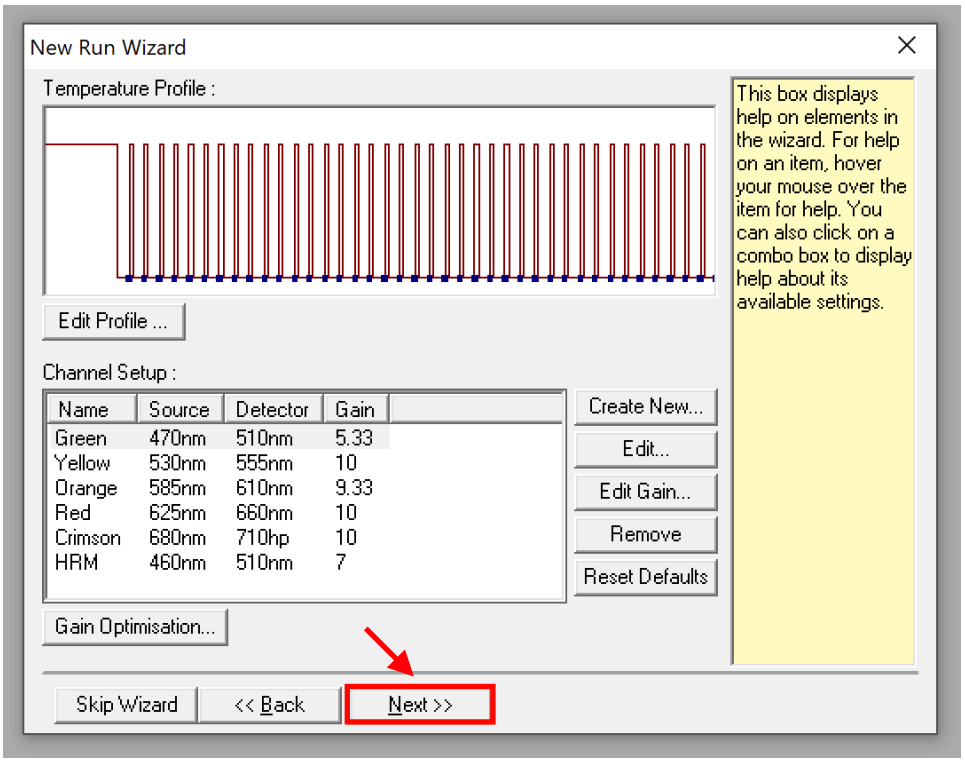
۴- روتور ۷۲ تایی به صورت پیش فرض نمایش داده می شود. Locking Ring Attached را انتخاب و بر روی Next کلیک نمایید:



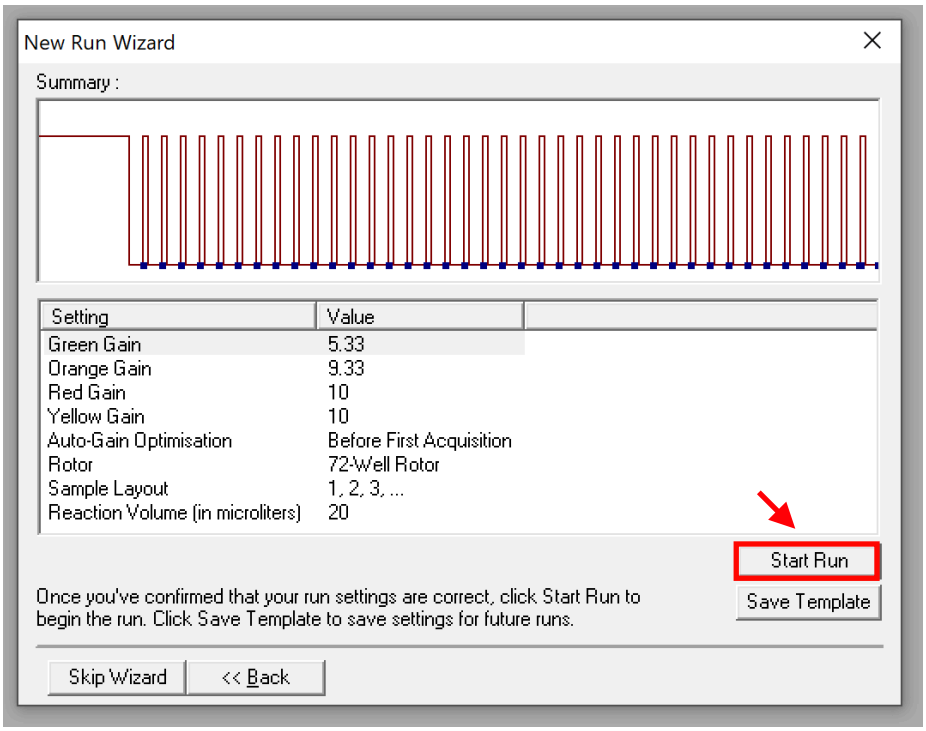
۵- نام کارشناس آزمایش را وارد کنید. حجم واکنش از قبل بر روی ۲۰ میکرو لیتر تنظیم شده است، بر روی Next کلیک نمایید:



۶- از آنجایی که پروفایل دمایی آزمایش و Gain Optimization از قبل در الگوی برنامه تعریف شده است، بر روی Next کلیک نمایید:



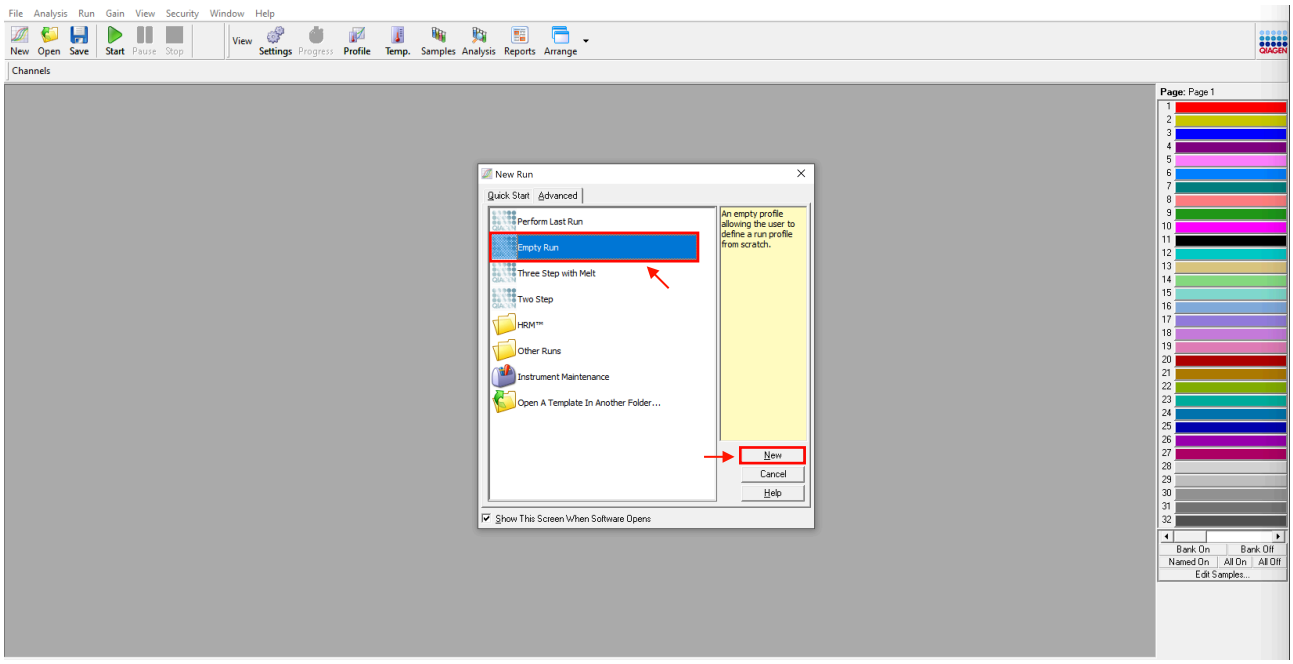
۷- بر روی Start Run کلیک نمایید تا آزمایش آغاز شود:



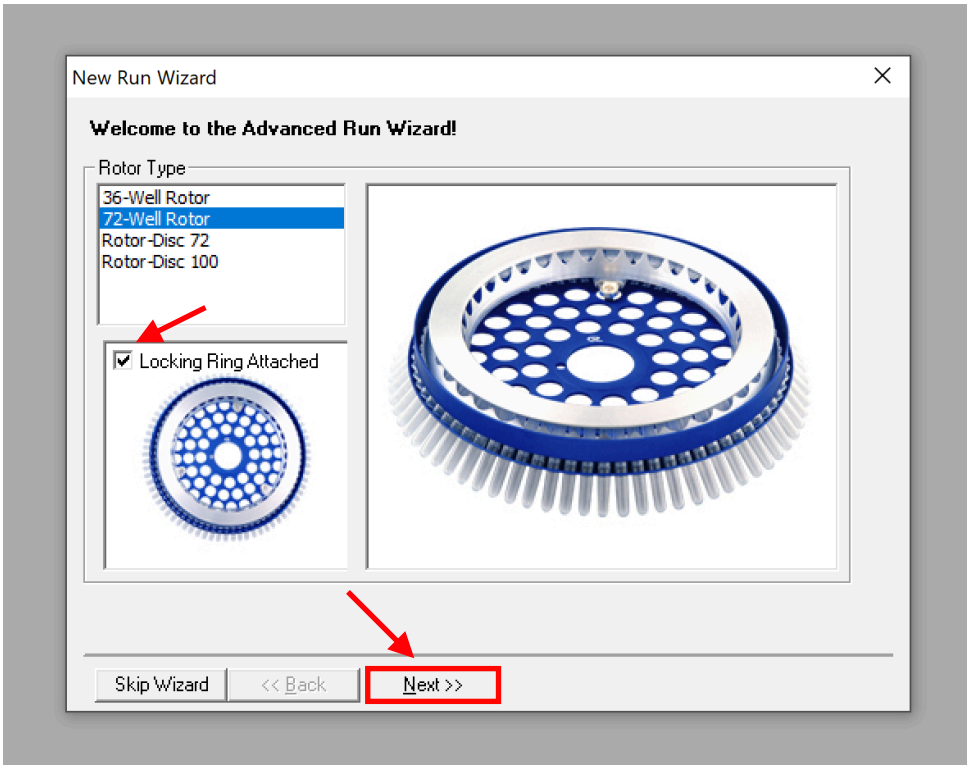
ب- ثبت برنامه ی PCR با استفاده از نرم افزار دستگاه RGQ بدون استفاده از الگوی از قبل آماده به صورت زیر:

۱-ابتدا بر روی علامت نرم افزار دستگاه Rotor-Gene Q دو بار کلیک کنید تا برنامه باز شود:

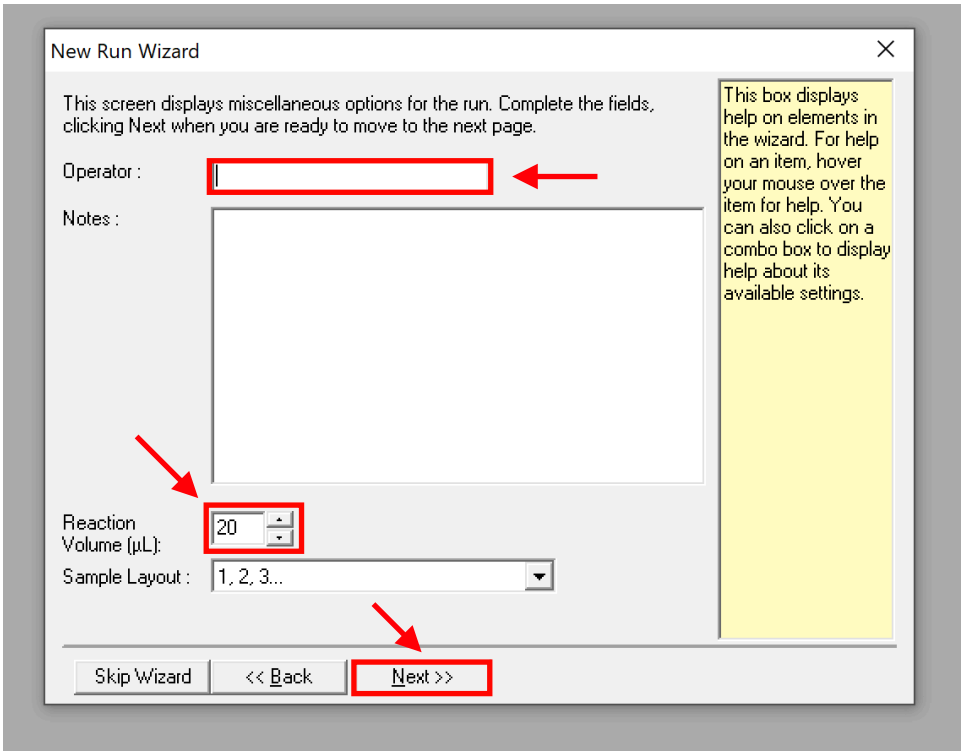
۲- برنامه ی Empty Run را انتخاب و بر روی New کلیک نمایید:



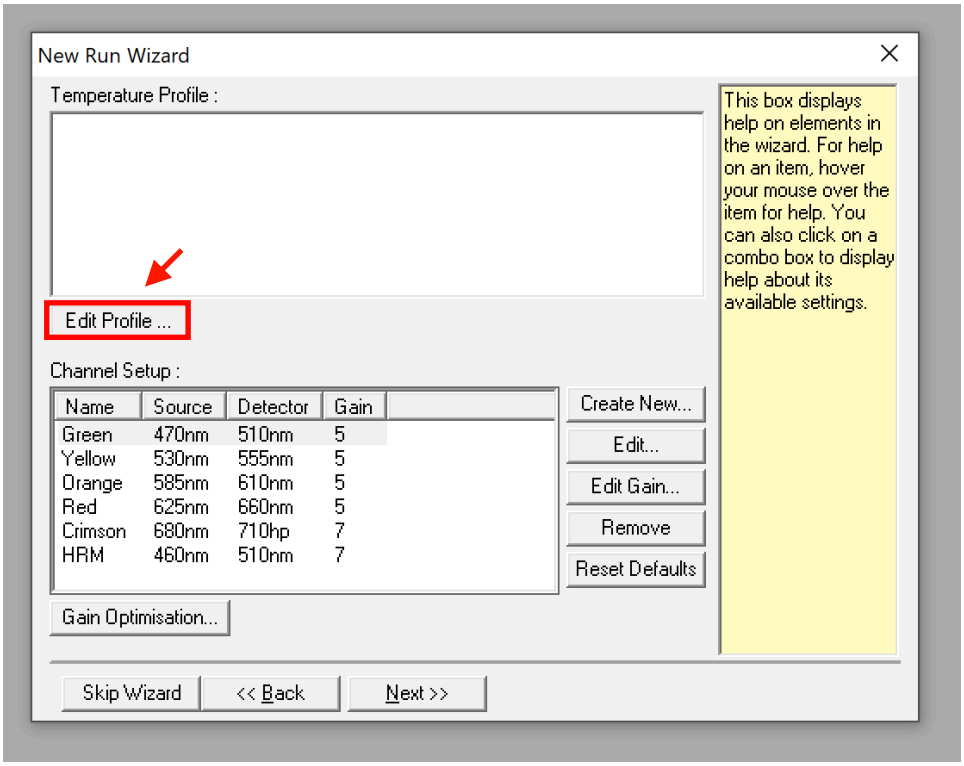
۳- روتور ۷۲ تایی را انتخاب کنید. سپس Locking Ring Attached را انتخاب و بر روی Next کلیک نمایید:



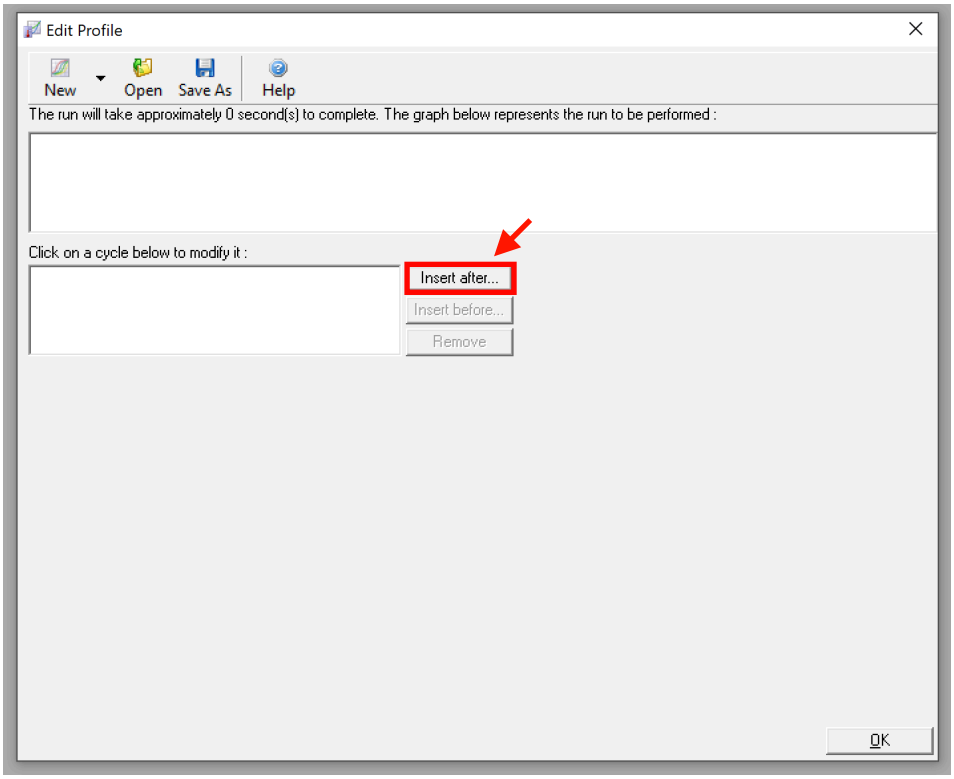
۴- نام کارشناس آزمایش را وارد کنید. حجم واکنش را بر روی ۲۰ میکرو لیتر تنظیم و بر روی Next کلیک نمایید:



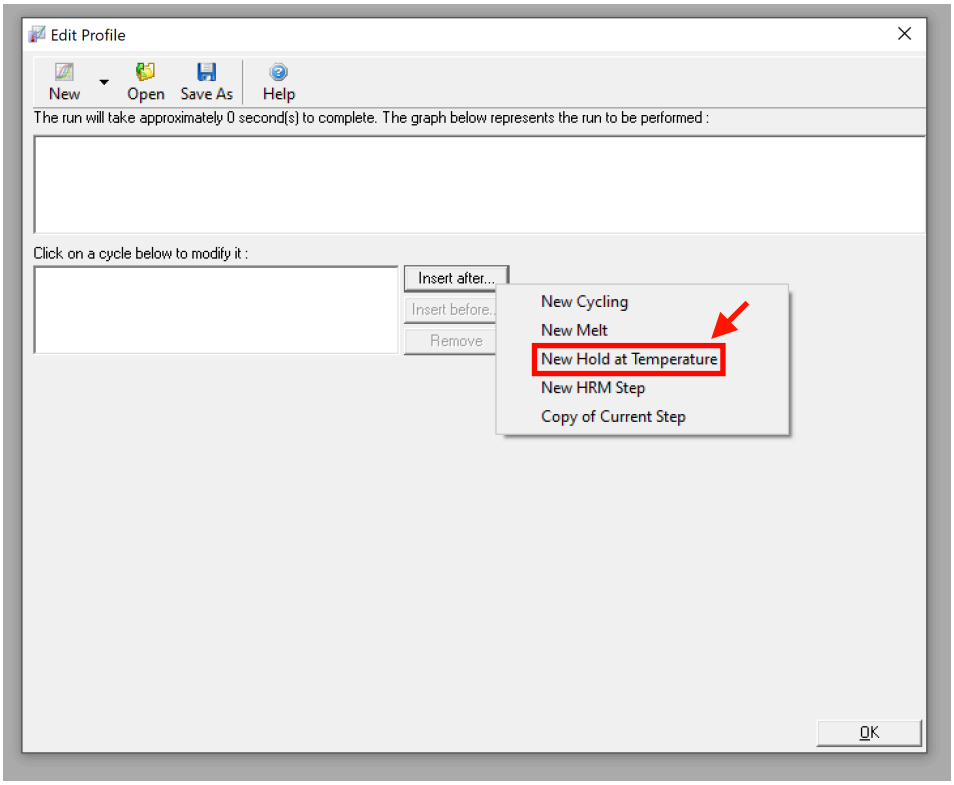
۵- بر روی Edit Profile... کلیک نمایید:



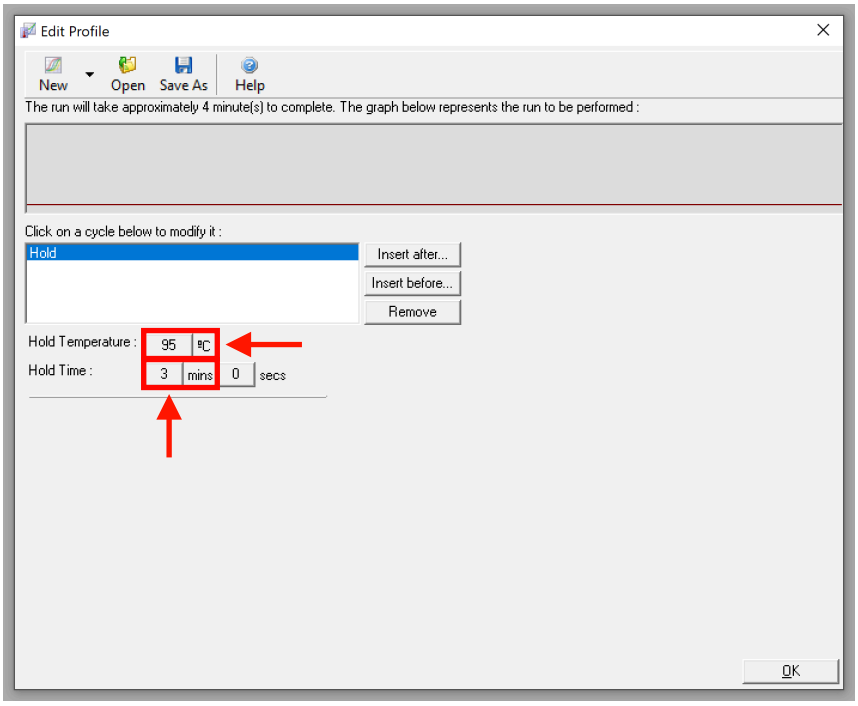
۵- در پنجره جدید بر روی ...Insert after کلیک کنید:



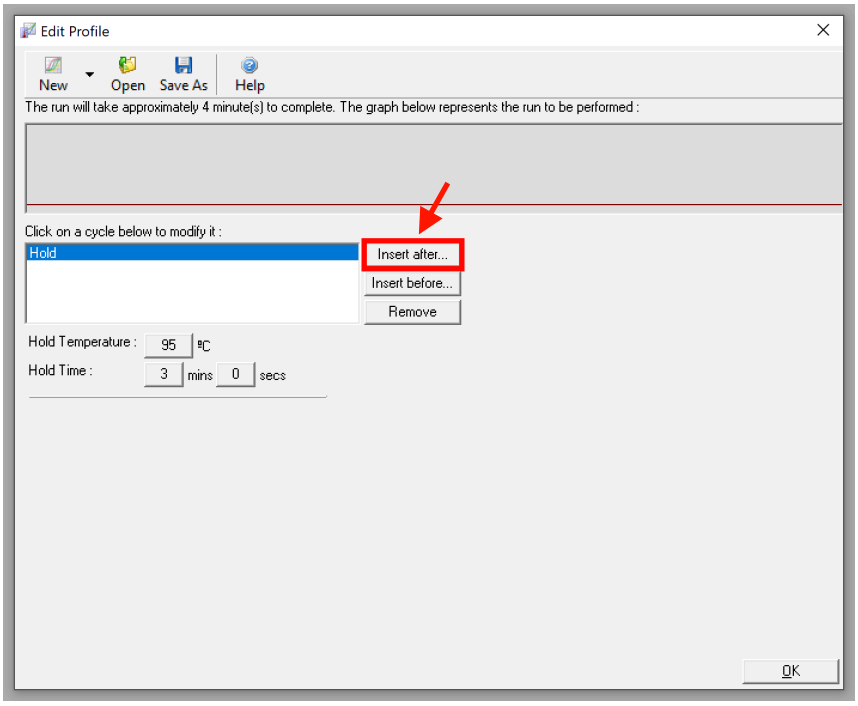
۶- و New Hold at Temperature را انتخاب کنید:



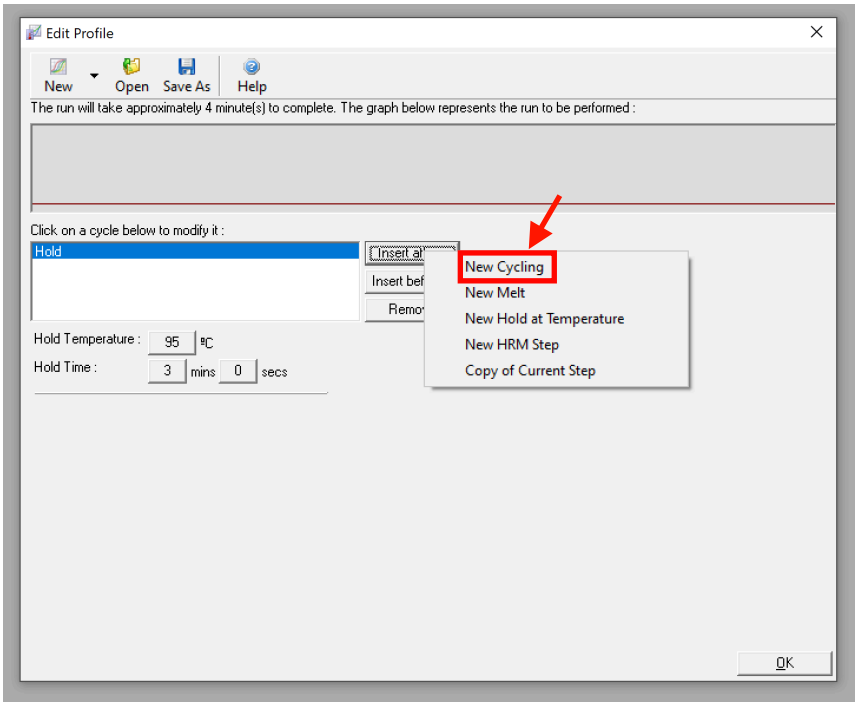
۷- دما وزمان را طبق شکل زیر بر روی ۹۵ درجه سانتیگراد و ۳ دقیقه تنظیم کنید:



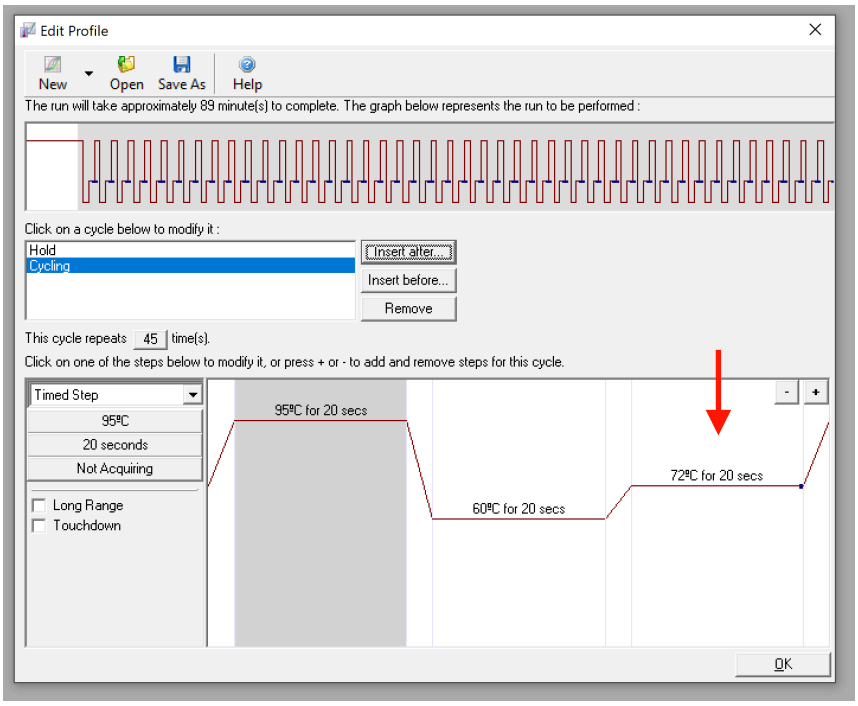
۸- مجددا بر روی Insert after... کلیک کنید:



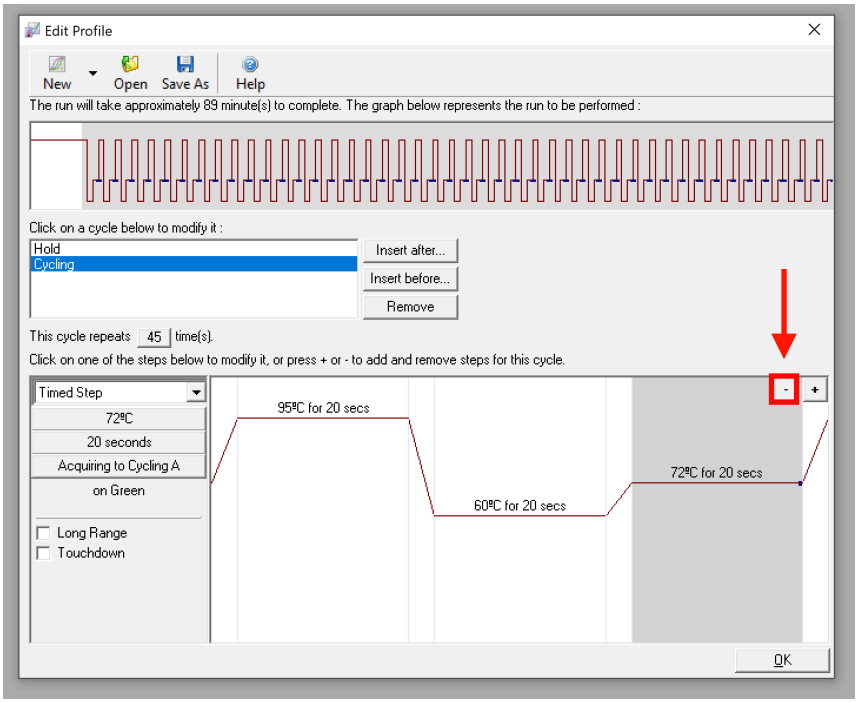
۹- و New Cycling را انتخاب کنید:



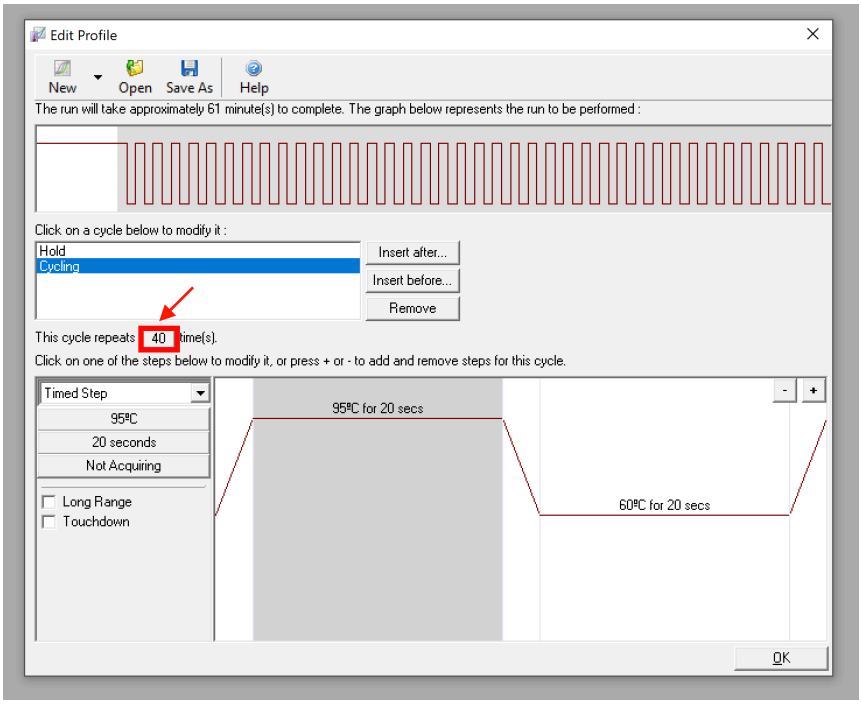
۱۰- در پنجره ی جدید، بر روی بخش سوم از پروفایل حرارتی کلیک کنید:



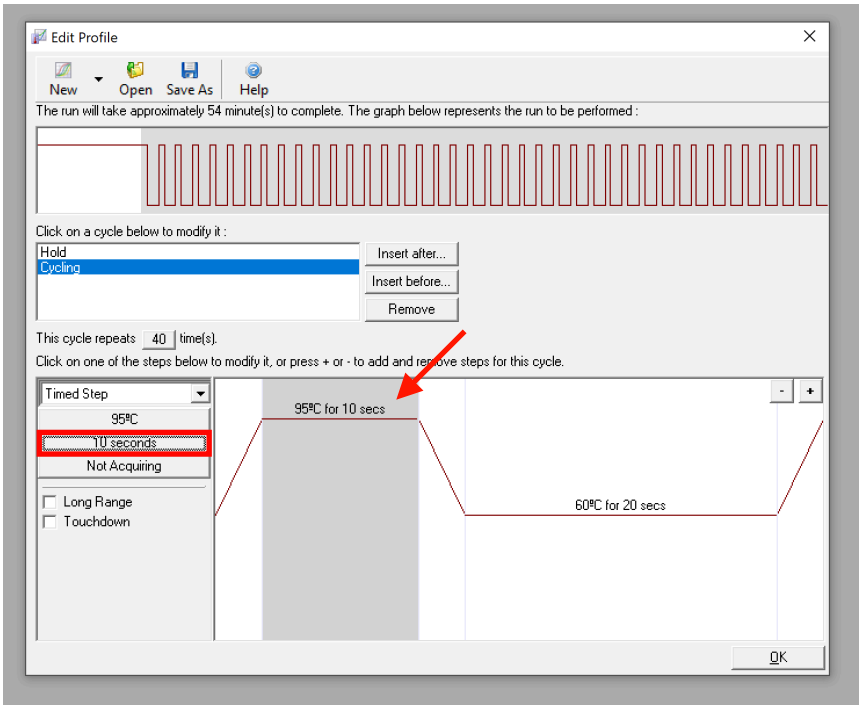
۱۱- سپس با کلیک بر روی علامت «منفی» این بخش از پروفایل را حذف کنید:



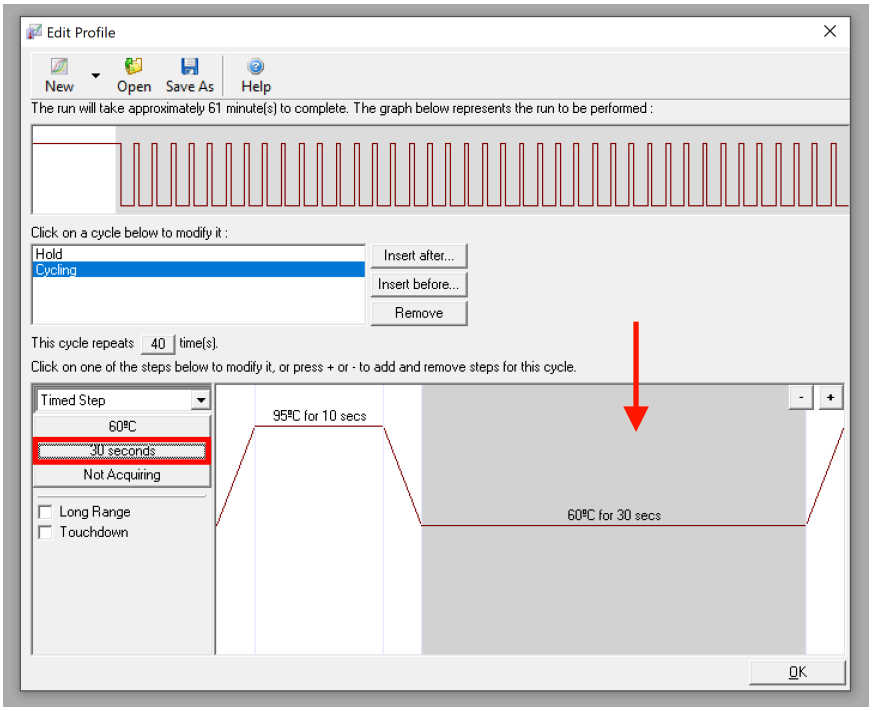
۱۲- تعداد تکرارهای برنامه را بر روی عدد ۴۰ تنظیم کنید:



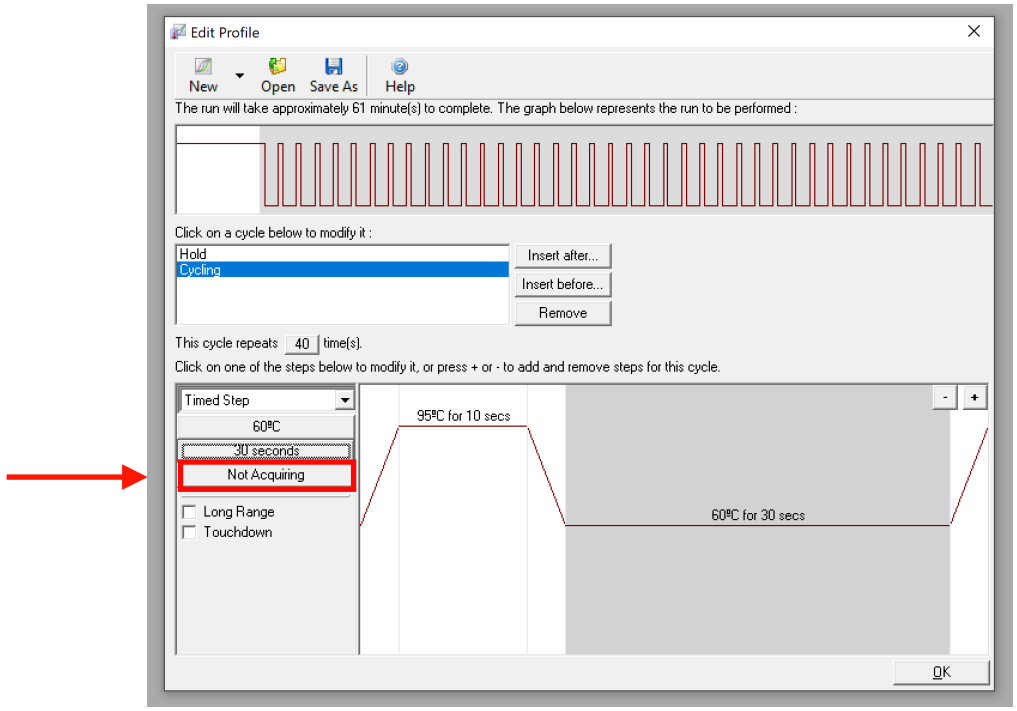
۱۳- بر روی بخش مربوط به denaturation کلیک کرده و زمان را بر روی ۱۰ ثانیه تنظیم کنید:



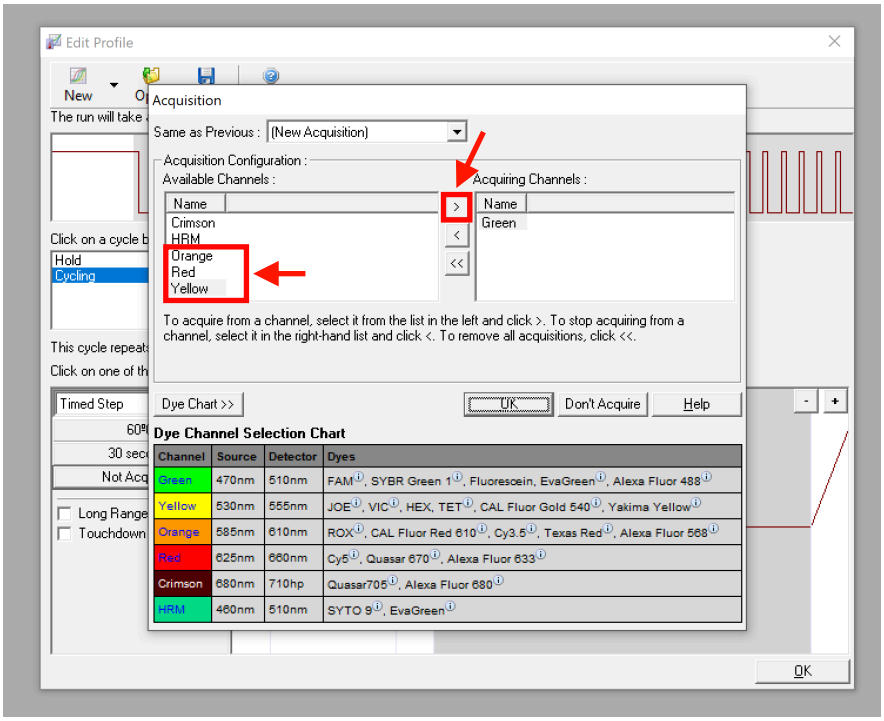
۱۴- بر روی بخش دوم پروفایل که شامل annealing و extention همزمان است کلیک کرده و زمان را بر روی ۳۰ ثانیه تنظیم کنید:



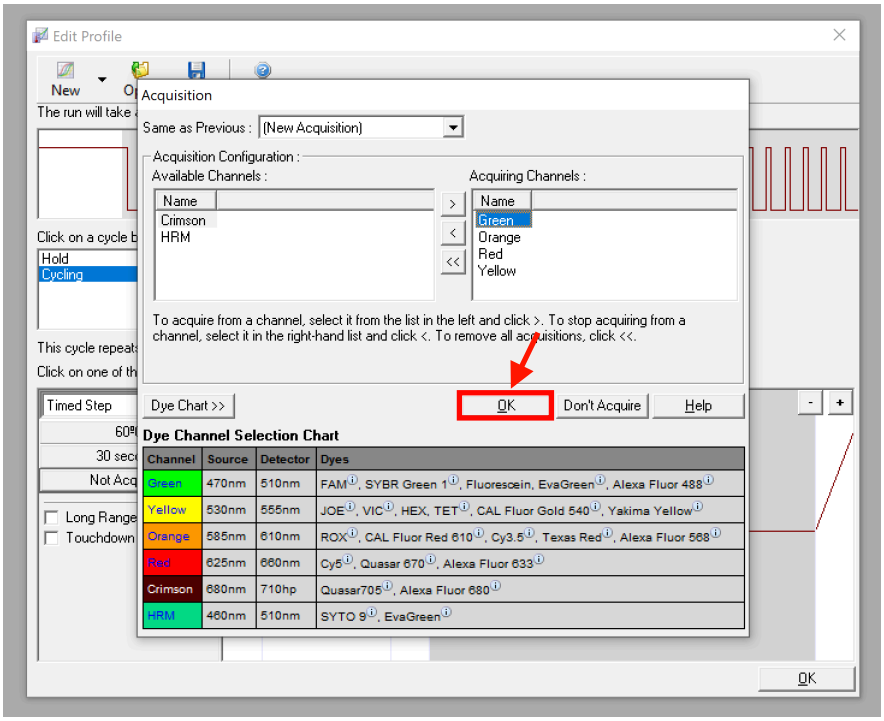
۱۵- بر روی Not Aquiring کلیک کنید تا تنظیمات مربوط به خوانش برنامه را تنظیم کنید:



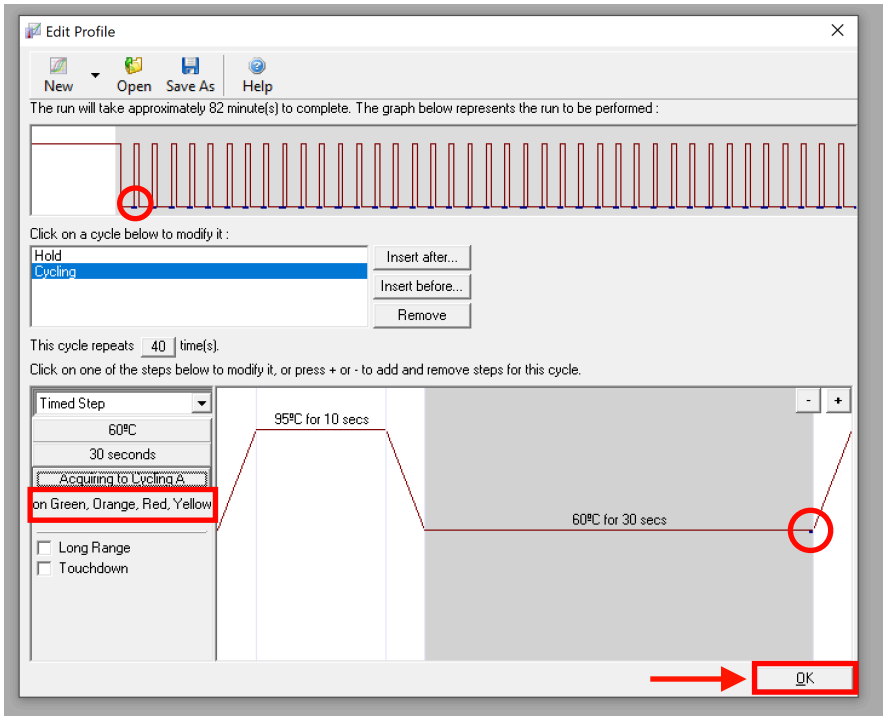
۱۶- به ترتیب کانال های نارجی، قرمز و زرد را در پنجره Available Channels انتخاب و با کلیک بر روی علامت >، کانال ذکر شده را به Acquiring Chennels اضافه کنید:



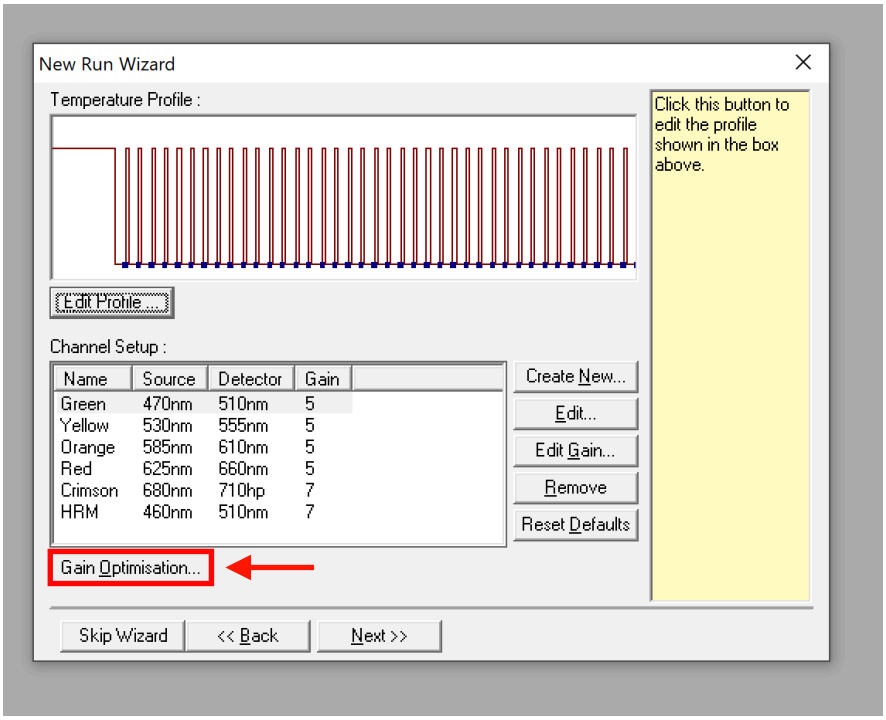
۱۷- بر روی OK کلیک کنید تا تغییرات، اعمال شود:



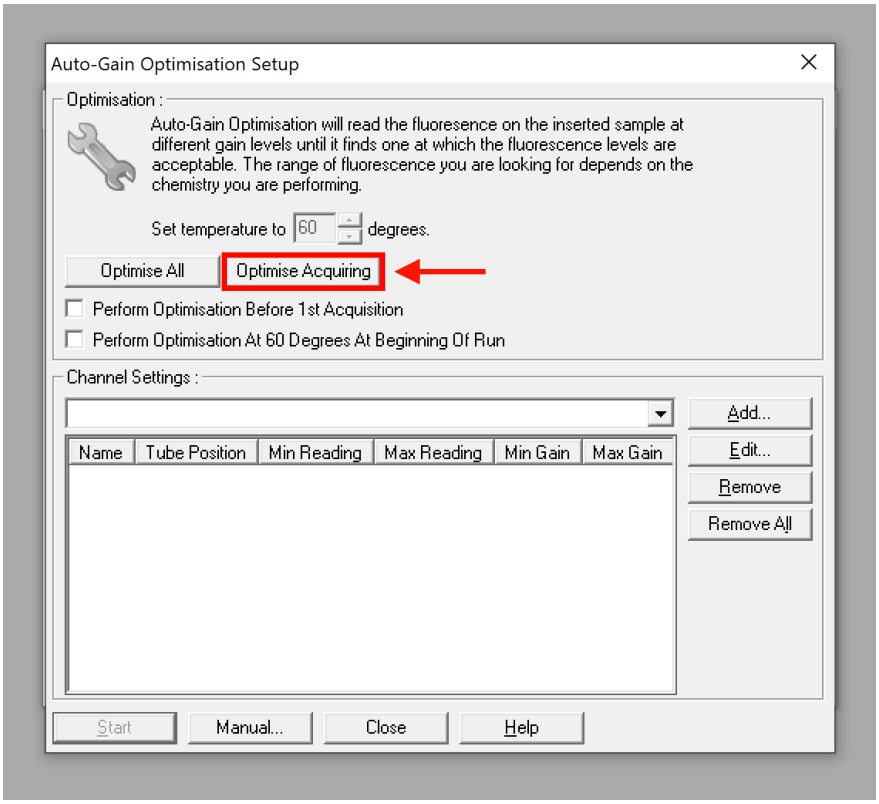
۱۸- تغییرات اعمال شده به صورت زیر در کادر های مشخص شده قابل شناسایی است. بر روی OK کلیک کنید تا به صفحه تنظیمات پروفایل حرارتی و تنظیم کانال ها باز گردید:



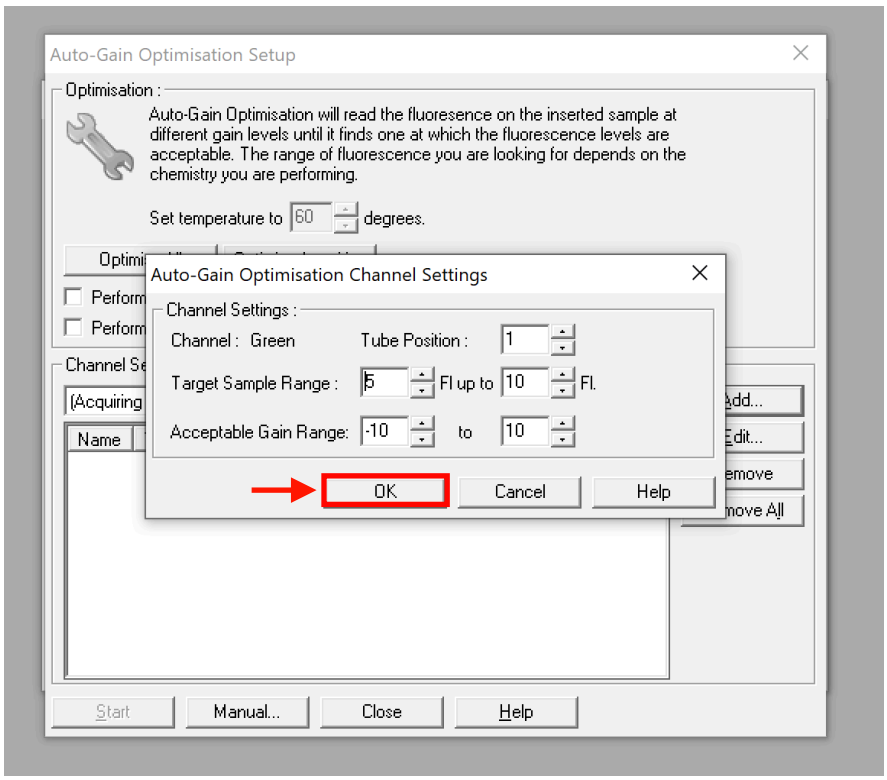
۱۹- بر روی ...Gain Optimisation کلیک کنید تا به صفحه تنظیمات Gain وارد شوید:



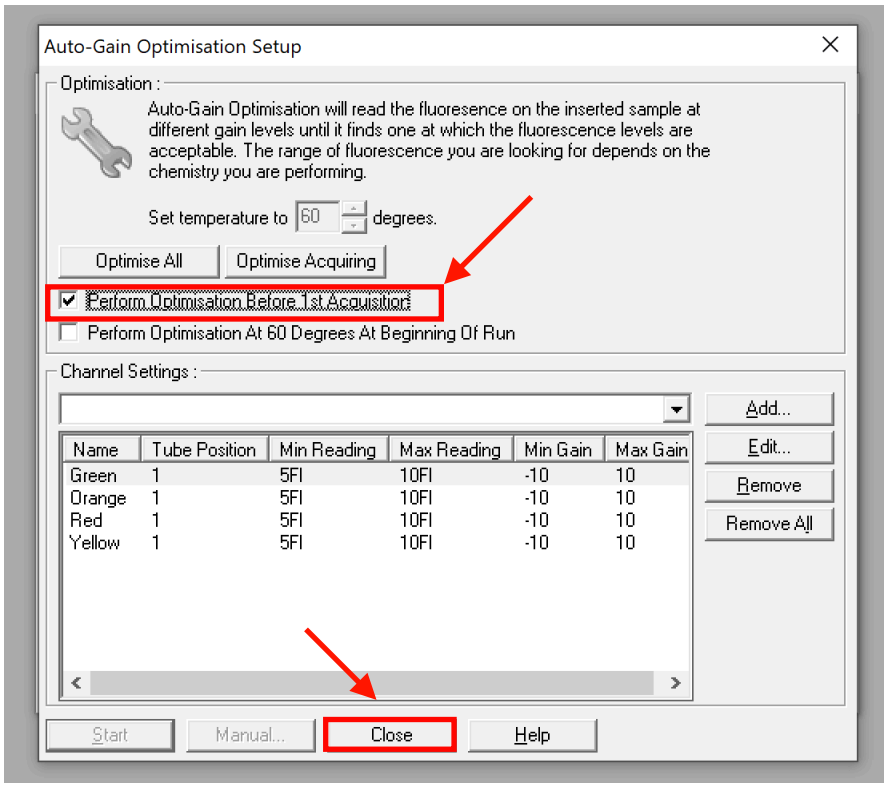
۲۰- در پنجره Auto-Gain Optimisation Setup بر روی Optimise Acquiring کلیک کنید:



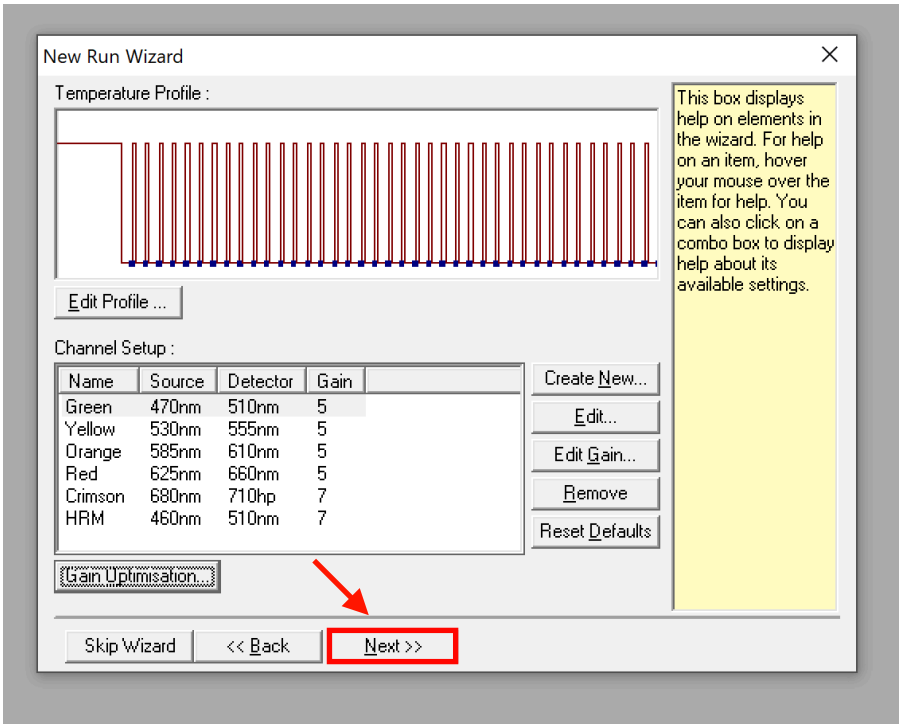
۲۱- بدون اعمال هیچ گونه تغییر در تنظیمات کانال ها، بر روی OK کلیک کنید تا کانال های مورد نیاز برای خوانش در آزمایش تایید شوند:



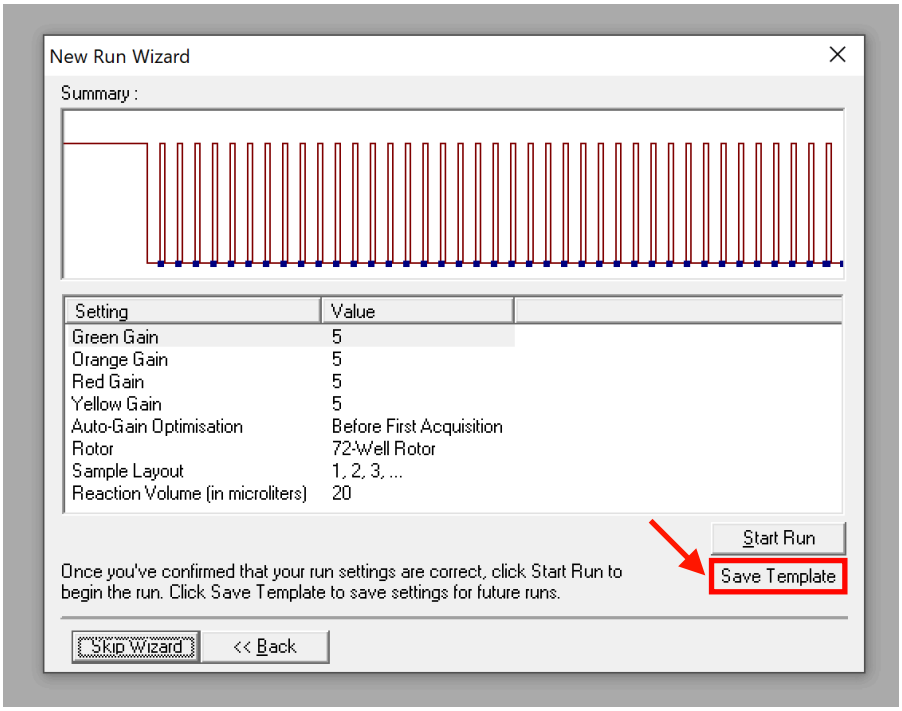
۲۲- تیک Perform Optimisation Before 1st Acquisition را فعال و بر روی Close کلیک کنید تا به پنجره ی اصلی برگردید:



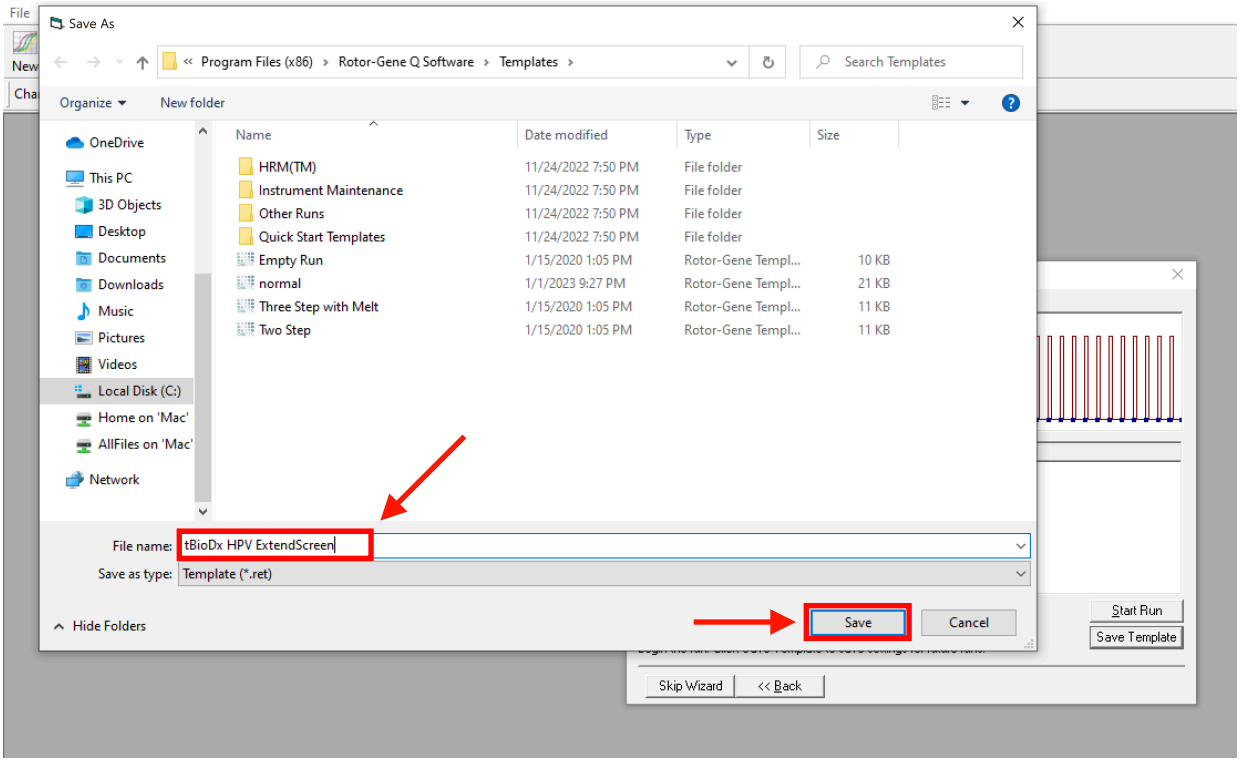
۲۳- بر روی Next کلیک کنید:



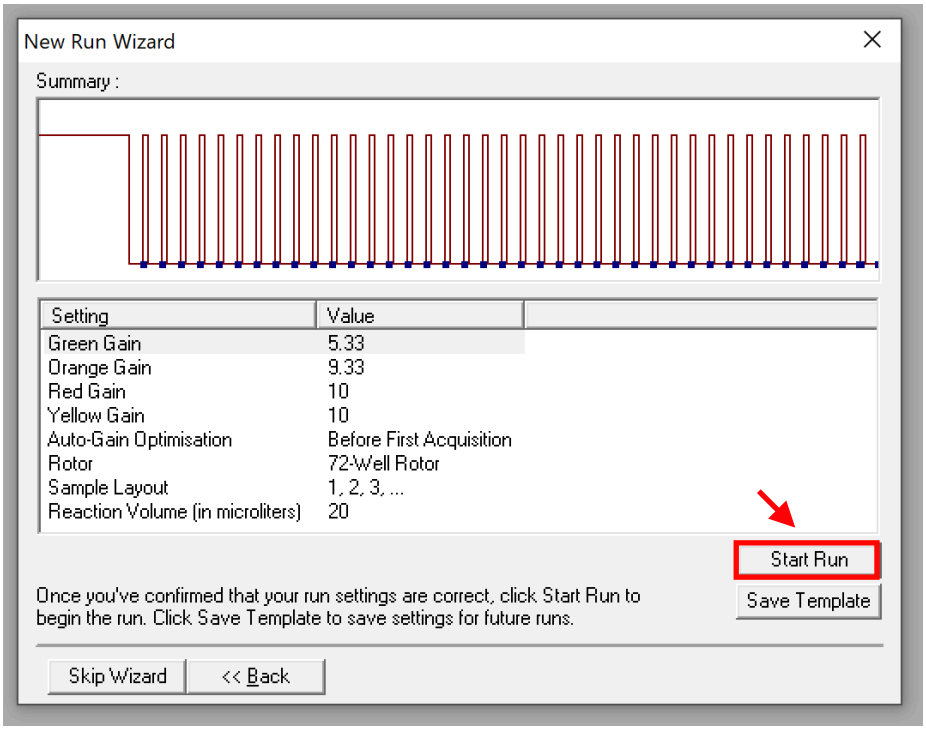
۲۴- بر روی Save Template کلیک کنید تا برنامه تنظیم شده را برای استفاده های بعدی ذخیره کنید:



۲۵- نرم افزار دستگاه به طور خودکار پنجره Templates در محل ذخیره نرم افزار را باز می کند. نام کیت را وارد و بر روی Save کلیک کنید:



۲۶- بر روی Start Run کلیک نمایید تا آزمایش آغاز شود:



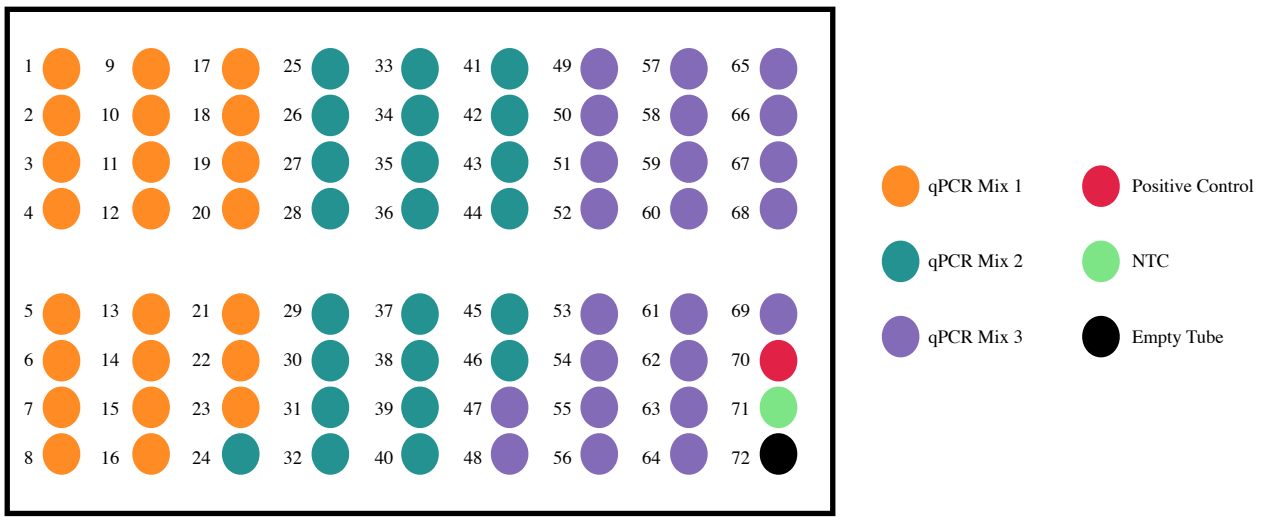
آماده سازی محلول واکنش برای انجام آزمایش HPV

۱- تیوب های qPCR Mix1, qPCR Mix 2, qPCR Mix 3 و کنترل مثبت را از فریزر خارج کنید تا دفریز شوند.

نکته مهم: برای به حداقل رساندن ریسک آلودگی، کلیه ی مراحل آماده سازی مخلوط واکنش را زیر یک کابینت PCR یا Workstation که دارای لامپ UV باشد انجام دهید. در این کابینت نباید DNA استخراج شود و همچنین نباید DNAی استخراج شده به تیوب ها اضافه شود. این کابینت باید عاری از DNA/RNA باشد. برای اضافه کردن DNA استخراج شده و یا کنترل مثبت به تیوب های PCR باید از کابینت دیگری استفاده کنید.

۲- تیوب های qPCR Mix1, qPCR Mix 2, qPCR Mix 3 را حداقل ۱۰ بار سر-و-ته کنید تا به خوبی مخلوط شوند. سپس تیوب ها را یکبار سانتریفیوژ کوتاه کنید.

۳- طبق شکل زیر ابتدا به تعداد نمونه های استخراج شده، مقدار ۱۵ میکرو لیتر محلول qPCR Mix 1 را به تیوب های ۰/۱ میلی لیتری اضافه کنید. سپس این کار را به ترتیب با qPCR Mix 2 و qPCR Mix 3 تکرار کنید. این مرحله می تواند در دمای اتاق انجام شود.



۴- تیوب های qPCR Mix1, qPCR Mix 2, qPCR Mix 3 را به فریزر بازگردانید.

۵- تیوب های ۰/۱ میکرولیتری حاوی مخلوط واکنش را برای اضافه کردن DNA به کابینت PCR دیگری منتقل کنید.

۶- مقدار ۵ میکرولیتر کنترل مثبت به تیوب مربوطه اضافه کرده و به آرامی با پیپتینگ آن را مخلوط کنید. درب لوله را ببندید.

نکته مهم: نوک سمپلر ها را بین هر پیپتینگ به آرامی دور بیاندازید و از نوک سمپلر جدید برای نمونه ی بعدی استفاده کنید.

۷- مقدار ۵ میکرو لیتر DNAی استخراج شده به تیوب های حاوی مخلوط واکنش اضافه و به آرامی با پیپتینگ آن را مخلوط کنید. هنگامی که DNA را به ۴ تیوب به هم پیوسته (strip tubes) اضافه کردید، درب آنها را ببندید.

۸- مقدار ۵ میکرولیتر آب به تیوب NTC اضافه کرده و به آرامی با پیپتینگ آن را مخلوط کنید. درب لوله را ببندید.

۹- دستگاه Rotor-Gene Q را طبق راهنمای صفحه ۱۴ و یا ۱۷ آماده کنید.

۱۰- روتور ۷۲تایی را بر روی پایه ی آن قرار دهید.

۱۱- تیوب های آماده شده را طبق شماره، درون روتور قرار دهید.

نکته مهم: در صورتیکه تعداد تیوب های حاوی مخلوط واکنش کمتر از ۷۲ تا بود، محل های خالی روتور را **حتما** با تیوب های خالی پر کنید. این کار برای هموژن بودن دمای محفظه ی PCR الزامی است.

۱۲- حلقه ی locking را بر روی روتور فیکس کنید.

۱۳- روتور حاوی تیوب ها را از روی پایه برداشته و به دستگاه Rotor-Gene Q منتقل کنید.

۱۴- بر روی Start Run کلیک کنید.

۱۵- پس از مشخص کردن نام و محل ذخیره سازی آزمایش، نام یا کد نمونه ها را ثبت کنید. ثبت کد و یا نام نمونه ها را می توانید پس از اتمام آزمایش نیز با کلیک بر روی Edit Samples انجام دهید.

۱۶- ژنوتیپ های هدف در تیوب های ۱، ۲ و ۳ هر نمونه به شرح زیر بوده و در کانال های سبز، زرد، نارنجی و قرمز شناسایی می شوند:

	qPCR Mix 1 (Target HPV)	qPCR Mix 2 (Target HPV)	qPCR Mix 3 (Target HPV)
Green	HPV 16	HPV 31	HPV 52
Yellow	HPV 18	HPV 33	HPV 45
Orange	IC	IC	IC
Red	HPV 58	HPV Others*	HPV Others*

*** HPV Others comprises the HPV types 35, 39, 51, 56, 59, 66, 67 & 68**

آنالیز داده های آزمایش HPV

برای آنالیز داده های حاصل از آزمایش qPCR، می توانید به دو صورت زیر عمل کنید:

الف - استفاده از الگوی از پیش آماده (analysis template)

ب- تنظیم پارامترهای آنالیز در نرم افزار دستگاه Rotor-Gene Q

الف- آنالیز داده ها با استفاده از analysis template

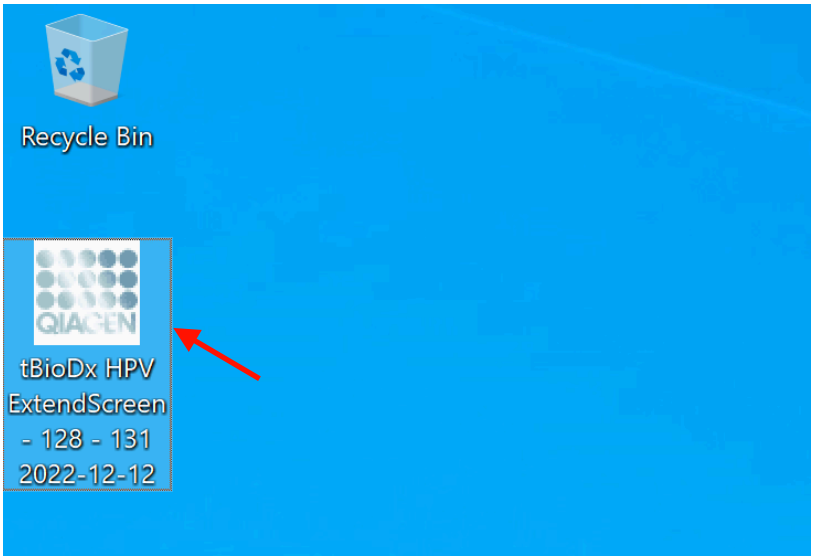
۱- برای آنالیز داده های حاصل از آزمایش qPCR، ابتدا الگوی از پیش آماده شده ی آنالیز (analysis template) را از سایت شرکت زیست تشخیص فردا به آدرس (www.tbiodx.com) دریافت نمایید.

۲- فایل های آنالیز، دارای پسوند (.qut) و با نام های زیر قابل دانلود از سایت می باشند:

	Analysis Template Names
Green	tBioDx HPV ExtendScreen Green channel analysis_V2.qut
Yellow	tBioDx HPV ExtendScreen Yellow channel analysis_V2.qut
Orange	tBioDx HPV ExtendScreen Orange channel analysis_V1.qut
Red	tBioDx HPV ExtendScreen Red channel analysis_Tube_1_V1.qut tBioDx HPV ExtendScreen Red channel analysis_Tube_2_V3.qut* tBioDx HPV ExtendScreen Red channel analysis_Tube_3_V3.qut*
	* In some cases enabling the noise slope correction is needed.

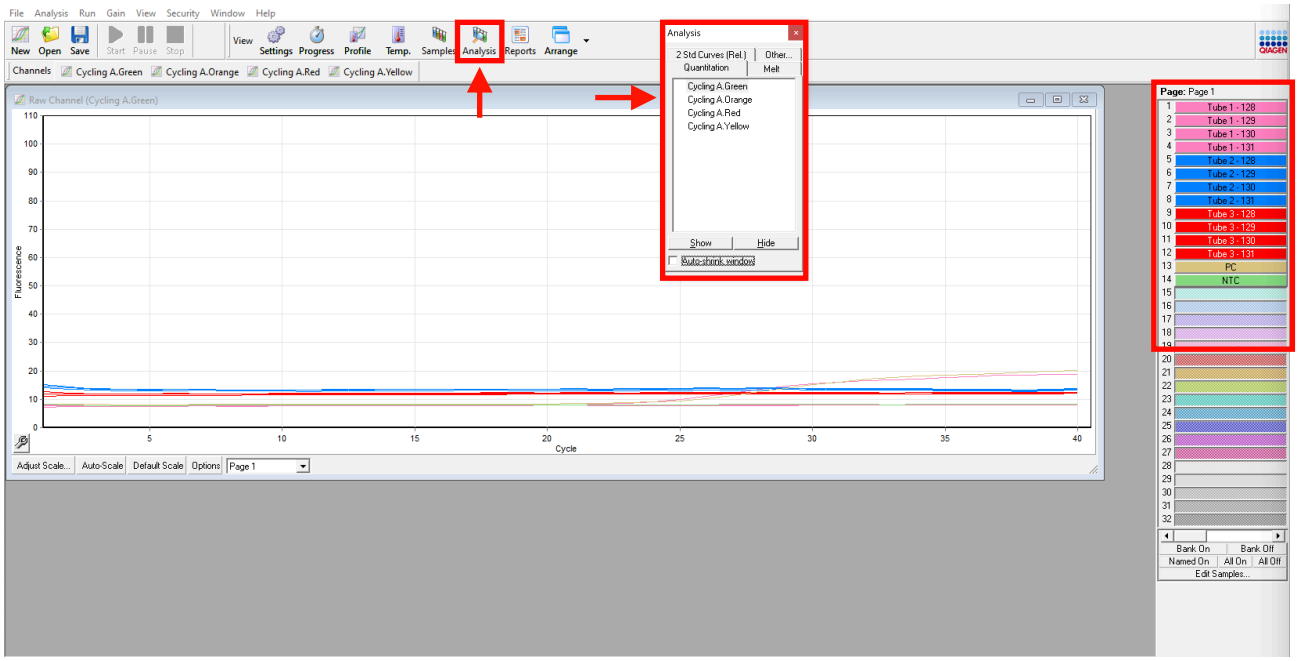
۳- فایل های فوق را پس از دانلود، در پوشه ای به نام HPV Analysis Templates ذخیره کنید تا در هر بار استفاده از آنها در دسترس باشند.

۴- بر روی علامت آزمایش انجام شده دو بار کلیک کنید تا باز شود:



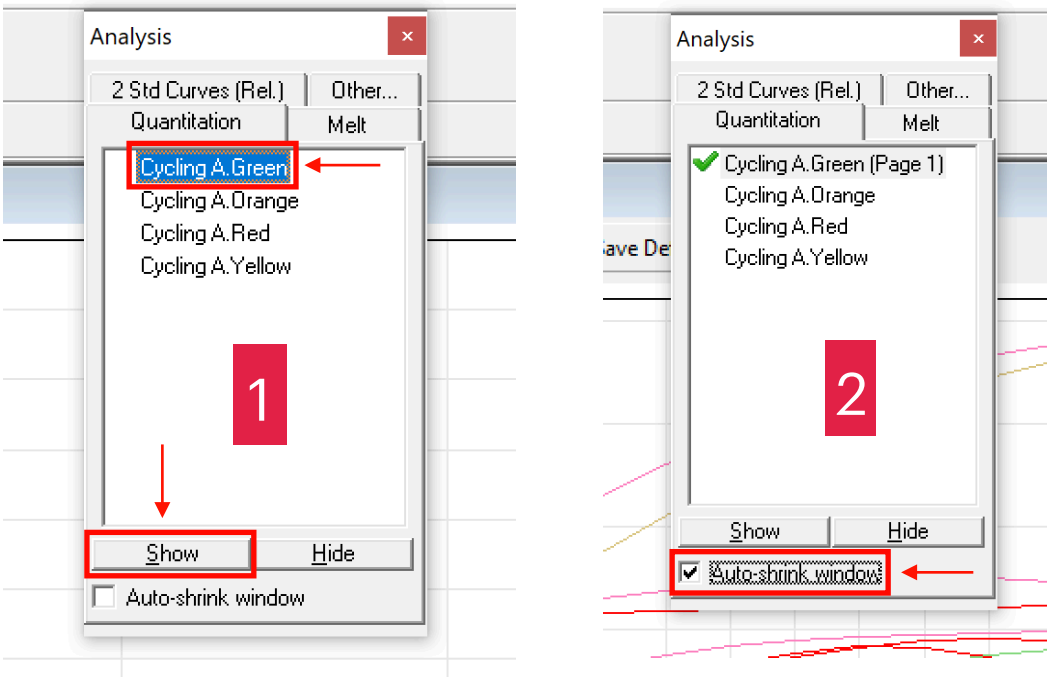
۵- بر روی Analysis در نوار ابزار بالای صفحه کلیک کنید تا پنجره ابزار آنالیز باز شود:

نکته: در صورت تمایل می توانید با کلیک بر روی Samples در نوار ابزار بالای صفحه، رنگ نمایش هر تیوب را به دلخواه تغییر دهید. در تصویر زیر، لوله های حاوی qPCR Mix 1 با رنگ صورتی، لوله های حاوی qPCR Mix 2 با رنگ آبی و لوله های حاوی qPCR Mix 3 با رنگ قرمز مشخص شده اند.

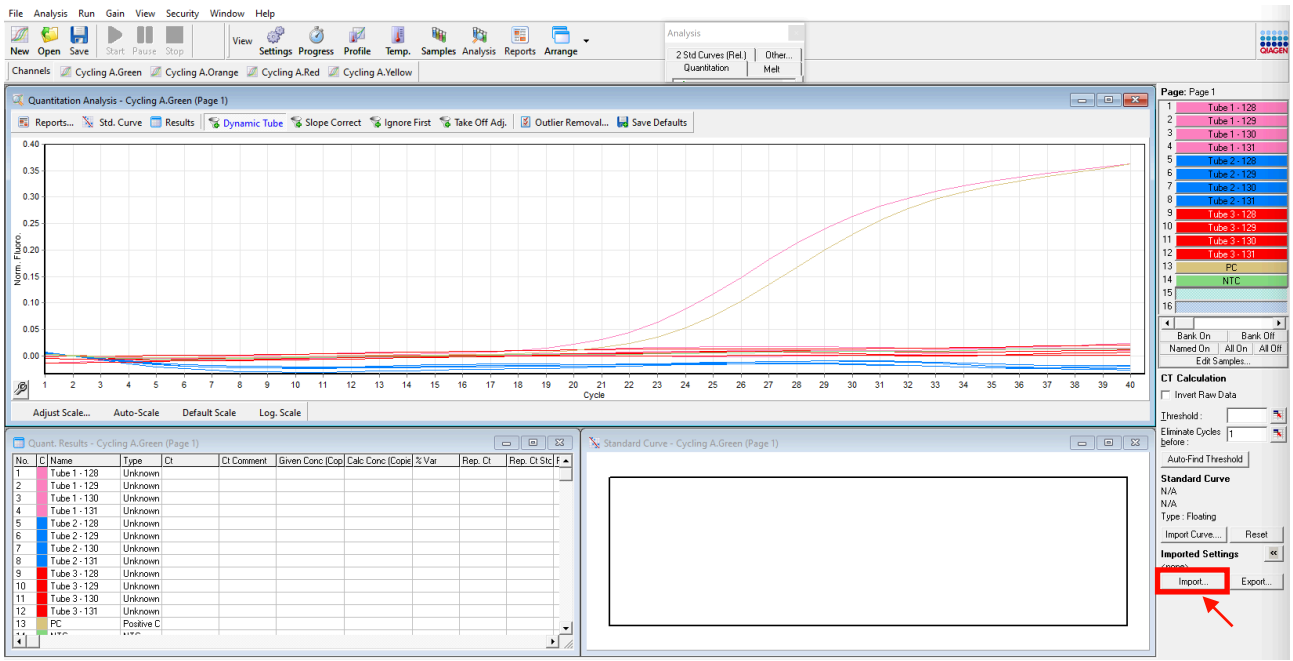


۶- کانال سبز را (Cycling A. Green) انتخاب و بر روی Show کلیک کنید (تصویر ۱):

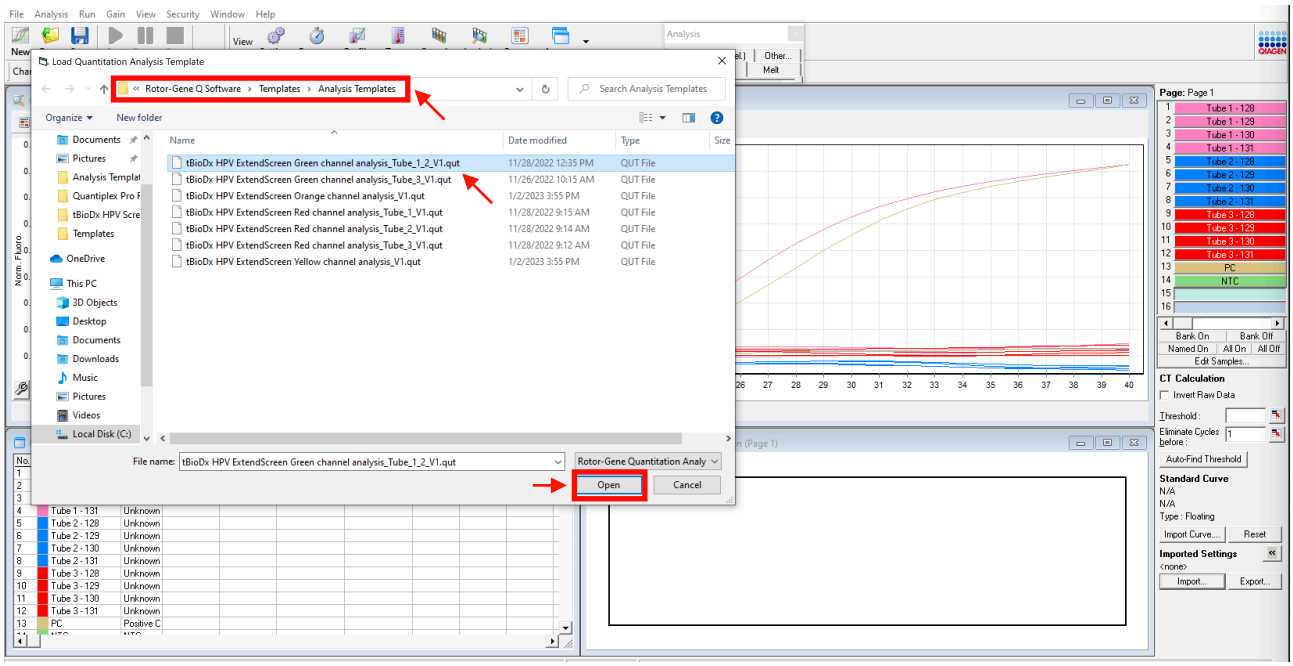
نکته: تیک Auto-shrink window را فعال کنید تا از روی صفحه آنالیز خارج شود. برای آنالیز سایر کانال ها، به محض قرار گیری ماوس بر روی آن مجددا نمایش داده می شود (تصویر ۲).



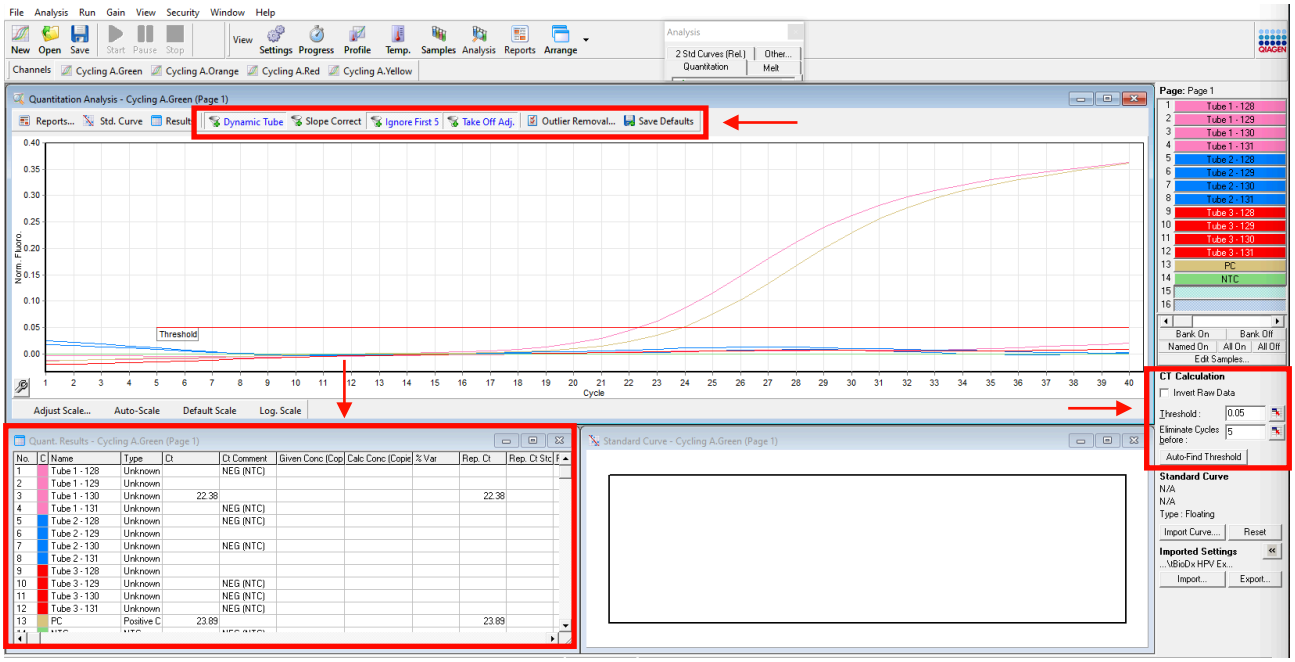
۷- از قسمت پایین-سمت راست پنجره، از بخش Import Setting بر روی Import کلیک کنید:



۸- در پنجره ای که باز می شود، به آدرس پوشه ای که فایل های آنالیز را در آن ذخیره کرده اید مراجعه، فایل آنالیز کانال سبز را انتخاب و بر روی Open کلیک کنید:

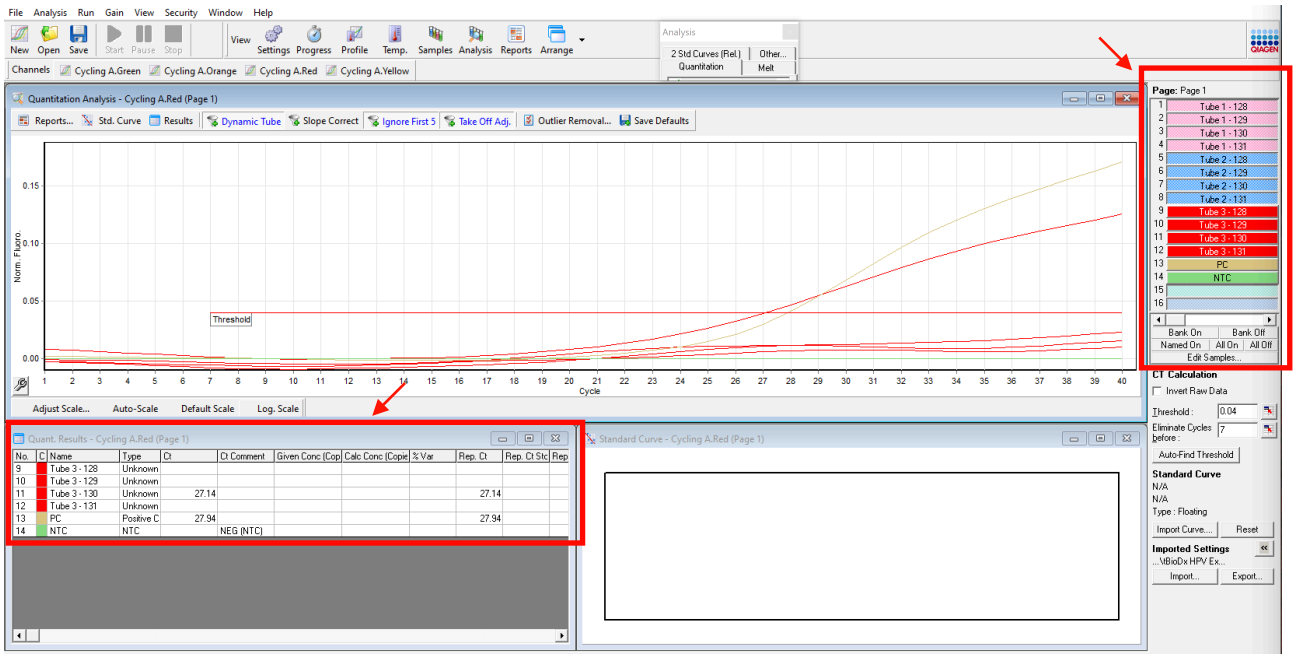


۹- در این حالت، کلیه پارامترهای آنالیز به نرم افزار وارد شده (import)، و نتایج نمایش داده می شود:



۱۰- مراحل ۷ تا ۹ را برای سایر کانال ها نیز تکرار کنید تا نتایج آزمایش در کانال ها و لوله های سه گانه ی HPV آنالیز شوند. کانال های سبز، زرد و نارنجی برای هر سه تیوب های حاوی qPCR Mix 1, 2 & 3 با یک فایل آنالیز می شوند. آنالیز کانال قرمز برای تیوب های حاوی qPCR Mix 1, 2 & 3 متفاوت بوده و هریک، فایل جداگانه ای برای آنالیز دارند.

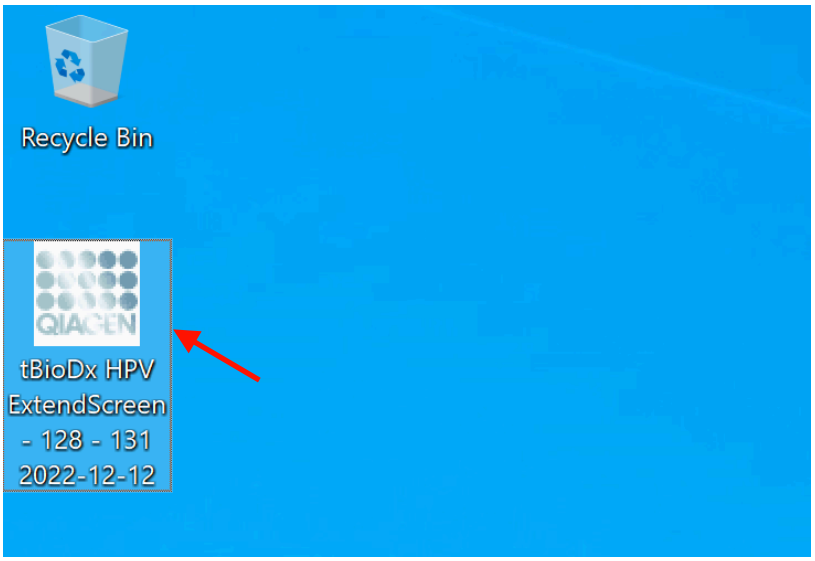
نکته ی کاربردی: برای سهولت آنالیز، می توانید هنگام import کردن آنالیز برای یک کانال، نمونه هایی که نباید در آنالیز باشند را از بخش سمت راست پنجره ی نرم افزار خاموش کنید. به عنوان مثال، هنگامی که قصد آنالیز کانال قرمز برای تیوب حاوی qPCR Mix 3 را دارید، می توانید نمونه های آزمایش در تیوب های حاوی qPCR Mix 1 & 2 را خاموش کنید. در این حالت فقط نتایج آنالیز در تیوب حاوی qPCR Mix 3 آزمایش HPV برای نمونه های مورد آزمایش نمایش داده می شود.



ب- آنالیز داده ها بدون analysis template در نرم افزار دستگاه Rotor-Gene Q

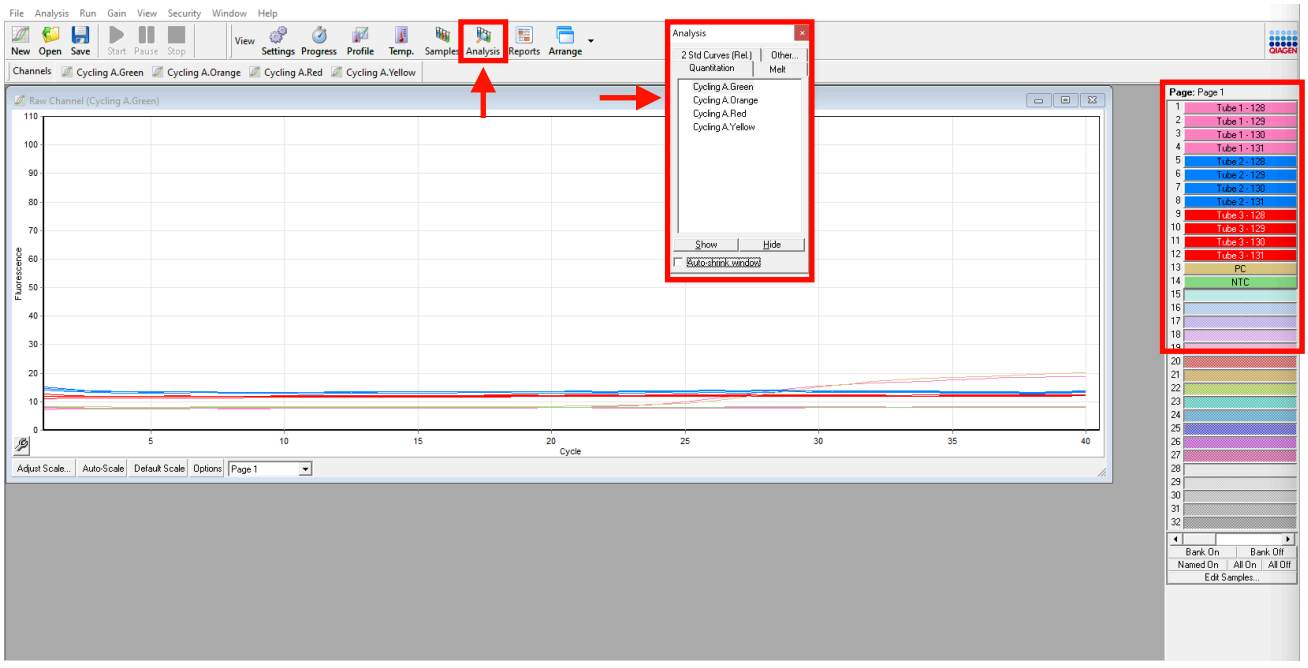
برای آنالیز داده های حاصل از آزمایش qPCR، بدون استفاده از الگوی از پیش آماده شده ی آنالیز (analysis template) مراحل زیر را انجام دهید.

۱- بر روی علامت آزمایش انجام شده دو بار کلیک کنید تا باز شود:



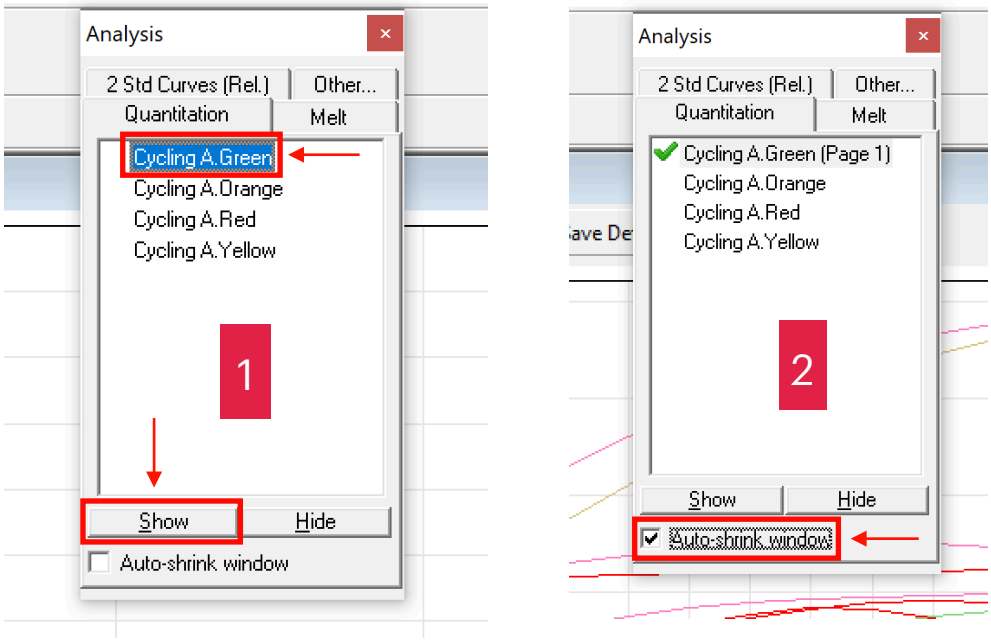
۲- بر روی Analysis در نوار ابزار بالای صفحه کلیک کنید تا پنجره ابزار آنالیز باز شود:

نکته: در صورت تمایل می توانید با کلیک بر روی Samples در نوار ابزار بالای صفحه، رنگ نمایش هر تیوب را به دلخواه تغییر دهید. در تصویر زیر لوله های حاوی qPCR Mix 1 با رنگ صورتی، لوله های حاوی qPCR Mix 2 با رنگ آبی و لوله های حاوی qPCR Mix 3 با رنگ قرمز مشخص شده اند.

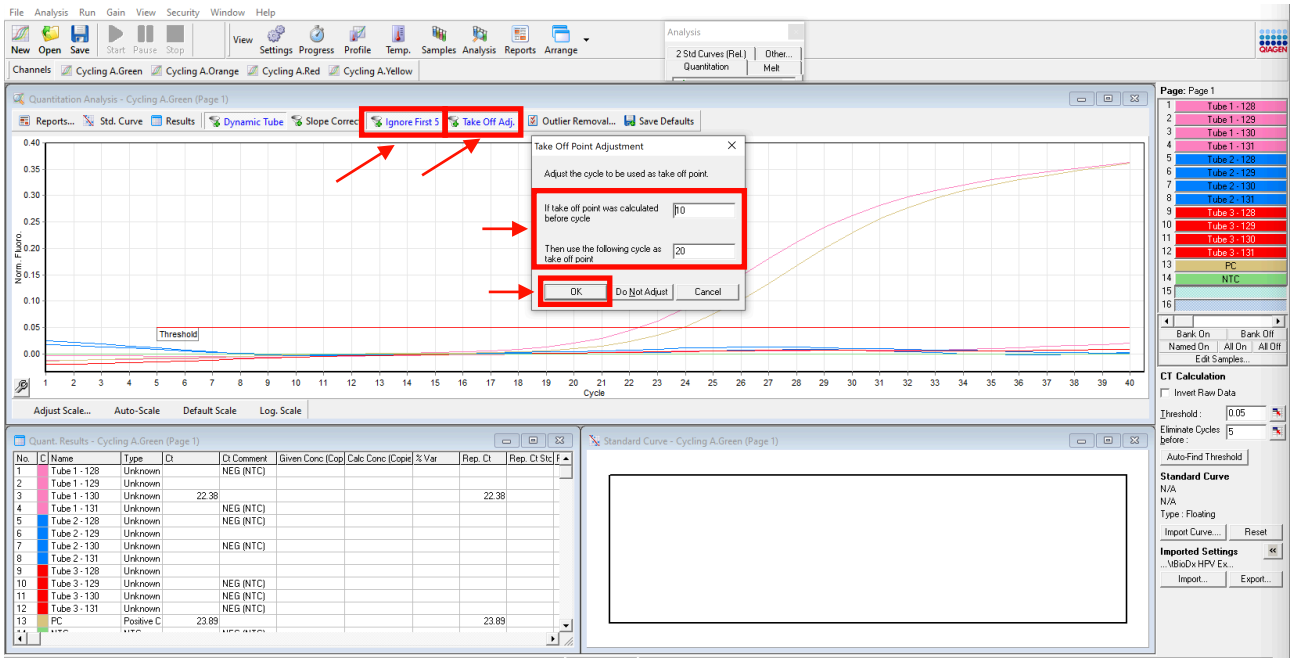


۳- کانالی که قصد آنالیز آن را دارید انتخاب و بر روی Show کلیک کنید (تصویر ۱):

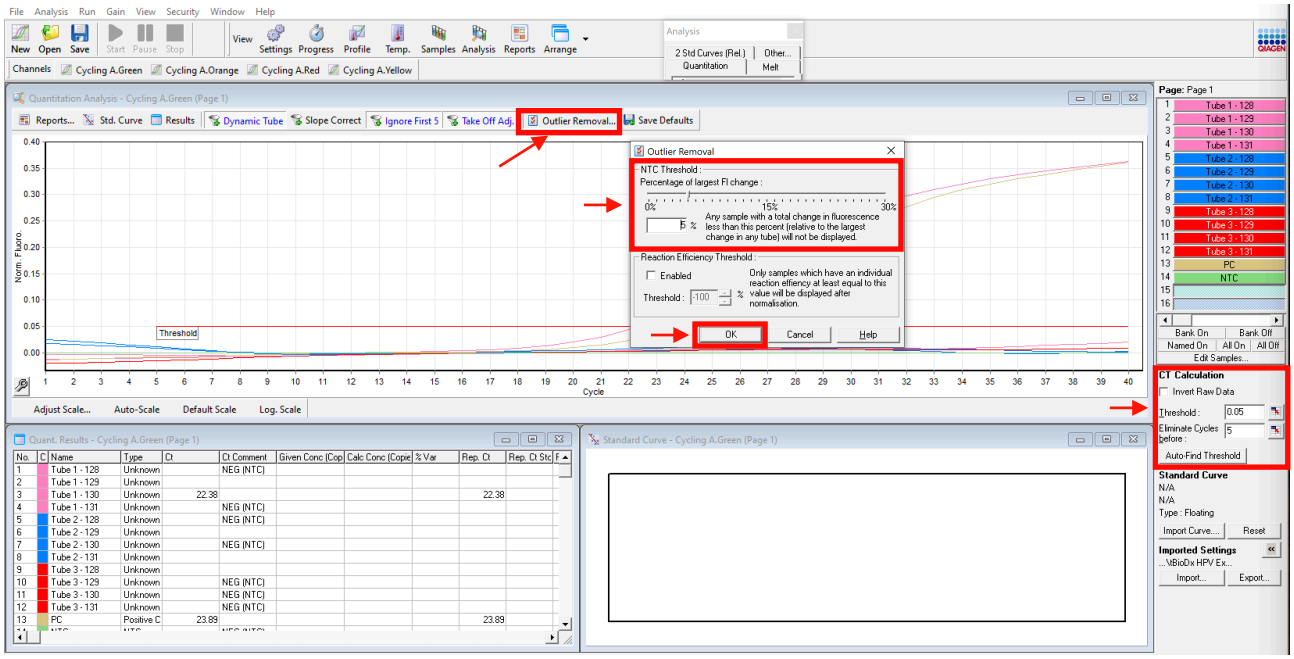
نکته: تیک Auto-shrink window را فعال کنید تا از روی صفحه آنالیز خارج شود. برای آنالیز سایر کانال ها، به محض قرار گیری ماوس بر روی آن مجددا نمایش داده می شود (تصویر ۲).



۴- برای تنظیم آنالیز، ابتدا Ignore First در نوار ابزار کانال مورد نظر را بر روی عدد تعیین (جدول صفحه ۴۰) تنظیم کنید. سپس بر روی Take Off Adj. کلیک و اعداد مندرج در جدول فوق را وارد و بر روی OK کلیک کنید:



۵- بر روی Outlier Removal کلیک کنید و آستانه ی NTC را بر روی عدد تعیین (جدول زیر) تنظیم و سپس بر روی OK کلیک کنید. در پنجره سمت راست نرم افزار برای محاسبه ی سیکل آستانه (Threshold Cycle) ابتدا در پنجره آستانه عدد تعیین شده را وارد کرده و سپس Eliminates Cycles Before را بر روی عدد مذکو در جدول زیر تنظیم کنید. با انجام این مرحله آنالیز کانال مورد نظر به اتمام می رسد:



۶- مراحل ۵ و ۶ را برای سایر کانال ها و تیوب ها طبق جدول زیر تنظیم کنید:

Channels			Green	Yellow	Orange	Red		
qPCR Master Mixes			Tube 1, 2 & 3	Tube 1, 2 & 3	Tube 1, 2 & 3	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Target DNA			HPV 16, 31, 52	HPV 18, 33, 45	IC	HPV 58	HPV Others*	HPV Others*
Parameters of Normalization								
Normalization	Dynamic tube		Enable	Enable	Enable	Enable	Enable	Enable
	Use noise slope correction		No	Yes	No	No	No**	No**
	Ignore first cycles		5	5	Non	5	5	5
	Adjust take-off points		Enable	Enable	No	Enable	Enable	Enable
		If take-off point	7	8	-	10	7	7
		Use take-off cycle	20	20	-	25	25	20
Parameters of Outlier Removal								
Filter data "Remove non-amplified curves"	fluorescence change		0%	0%	<5%	<5%	<7%	<7%
	reaction efficiency		Non	Non	Non	Non	Non	Non
Parameters of CT Calculation								
Cq calculation	Threshold		0.05	0.05	0.1	0.07	0.05	0.04
	Threshold start cycle		5	5	5	6	6	7
			* HPV Others comprises the HPV types 35, 39, 51, 56, 59, 66, 67 & 68					
			** In some cases enabling the noise slope correction is needed.					

تفسیر نتایج

صحه گذاری کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit به گونه ای انجام شده است که برای تفسیر نتایج باید موارد زیر برای مثبت یا منفی بودن نمونه احراز شود.

۱- سیکل آستانه (threshold Cycle)، در کانال های سبز، زرد و نارجی برای کنترل مثبت باید کمتر ۳۰ (<30) و برای کانال قرمز کمتر از ۳۵ (<35) باشد.

۲- هیچ سیگنالی نباید در لوله ی NTC و در کانال های سبز، زرد، نارجی و قرمز، قبل از سیکل ۴۰ (<40) دیده شود.

۳- نتایج نمونه ها طبق جدول های زیر تفسیر می شوند:

مثال:

نتیجه مثبت: اگر در تیوب حاوی qPCR Mix 1 و در کانال سبز، نمونه ای قبل از سیکل ۳۴ از خط آستانه گذشته باشد و کنترل داخلی همان نمونه نیز قبل از سیکل ۳۰، از خط آستانه گذشته باشد، این نمونه برای HPV 16 مثبت است.

نتیجه منفی: اگر در تیوب حاوی qPCR Mix 1 و در کانال سبز، نمونه ای بدون سیگنال بوده و یا بعد از سیکل ۳۴ از خط آستانه گذشته باشد و کنترل داخلی همان نمونه نیز قبل از سیکل ۳۰، از خط آستانه گذشته باشد، این نمونه برای HPV 16 منفی است.

نتیجه نامعتبر (باید تکرار شود): اگر در تیوب حاوی qPCR Mix 1 و در کانال سبز، نمونه ای بدون سیگنال بوده ویا بعد از سیکل ۳۴ از خط آستانه گذشته باشد و کنترل داخلی همان نمونه نیز بعد از سیکل ۳۰، از خط آستانه گذشته باشد، نتیجه نامعتبر است و باید تکرار شود.

تفسیر نتایج برای تیوب ۱

Tube 1	Ct value of HPV target	All Tubes	Ct value of IC	Result
HPV 16	<34	IC	<30	HPV Positive
HPV 18	<35			
HPV 58	<32			
Tube 1	Ct value of HPV target	All Tubes	Ct value of IC	Result
HPV 16	>34	IC	<30	HPV Negative
HPV 18	>35			
HPV 58	>32			
Tube 1	Ct value of HPV target	All Tubes	Ct value of IC	Result
HPV 16	>34	IC	>30	Invalid
HPV 18	>35			
HPV 58	>32			

تفسیر نتایج برای تیوب ۲

Tube 2	Ct value of HPV target	All Tubes	Ct value of IC	Result
HPV 31 HPV 33 Others	<32	IC	<30	HPV Positive
Tube 2	Ct value of HPV target	All Tubes	Ct value of IC	Result
HPV 31 HPV 33 Others	>32	IC	<30	HPV Negative
Tube 2	Ct value of HPV target	All Tubes	Ct value of IC	Result
HPV 31 HPV 33 Others	>32	IC	>30	Invalid

تفسیر نتایج برای تیوب ۳

Tube 3	Ct value of HPV target	All Tubes	Ct value of IC	Result
HPV 52 HPV 45 Others	<33	IC	<30	HPV Positive
Tube 3	Ct value of HPV target	All Tubes	Ct value of IC	Result
HPV 52 HPV 45 Others	>33	IC	<30	HPV Negative
Tube 3	Ct value of HPV target	All Tubes	Ct value of IC	Result
HPV 52 HPV 45 Others	>33	IC	>30	Invalid

عملکرد کیت

برای صحه گذاری آنالیتیکال و کلینیکال کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit از راهنماهای بین المللی معتبری چون FDA و Meijer Guideline استفاده شده است. کلیه ی مراحل صحه گذاری به طور همزمان و با هر دو روش نمونه گیری و دو کیت استخراج زیر انجام شده است. کیت ارجاع که از آن در تمام مراحل صحه گذاری استفاده شده است، کیت QIAscreen HPV PCR Test (HPV-Risk Assay by Self-screen B.V.) شرکت QIAGEN می باشد که مخصوص غربالگری سرطان دهانه رحم است.

نمونه گیری: برای صحه گذاری کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit از دو روش نمونه گیری LBC و نمونه گیری توسط خود فرد (Self-Sample Collection) با استفاده از FLOQSwab شرکت COPAN استفاده شده است. تمام آزمایش های مربوط به صحه گذاری آنالیتیکال به طور همزمان با هر رو روش نمونه گیری انجام شده است. برای صحه گذاری کلینیکال، به طور همزمان دو نمونه (یک LBC و یک FLOQSwab)از بانوان بین ۲۵ تا ۶۵ تهیه و درآزمایش های مربوط به حساسیت و ویژگی کلینیکال استفاده شده است.

استخراج DNA: برای صحه گذاری کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit از دو روش استخراج مبتنی بر ستون (کیت QIAamp MinElute Media Kit شرکت QIAGEN) و یک کیت مبتنی بر ذرات مگنتیک با تکنولوژی خالص سازی معکوس (کیت *tBioCare™* HPV DNA Extraction Kit شرکت زیست تشخیص فردا - tBioDx™) استفاده شده است. از تمام نمونه های LBC و FLOQSwab با هر دو روش، استخراج DNA انجام شده و سپس به طور همزمان با هر دو کیت QIAscreen HPV PCR Test (HPV-Risk Assay by Self-screen B.V.) و *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit آزمایش شده اند.

دستگاه real-time PCR: برای صحه گذاری کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit از دستگاه Rotor-Gene Q 5plex HRM و Rotor-Gene Q 5plex استفاده شده است. (ارزیابی سایر دستگاه های real-time PCR در دست اقدام است و به زودی در نسخه های بعدی این کتابچه اطلاعات استفاده از آنها نیز خواهد آمد.)

نرم افزار آنالیز: برای آنالیز نتایج از نرم افزار استاندارد Rotor-Gene Q با نسخه ی (Build 1) 2.3.5 استفاده شده است.

کیت ارجاع: برای ارزیابی عملکرد کلینیکی کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit، از کیت QIAscreen HPV PCR Test (HPV-Risk Assay by Self-screen B.V.) شرکت QIAGEN استفاده شده است. همانطور که در صفحه ۵۴ شرح داده شده است، DNAی کلیه ی نمونه های LBC (۸۲۶ نمونه ی CIN1 یا کمتر و ۷۱ نمونه ی +CIN2) و FLOQSwab (۸۲۵ نمونه ی CIN یا کمتر و ۷۱ نمونه ی +CIN2) با دو کیت متفاوت استخراج (که در بالا به آنها اشاره شده است) و به طور موازی با هر دو کیت شرکت زیست تشخیص فردا و کیت شرکت QIAGEN مورد آزمایش قرار گرفتند.

عملکرد آنالیتیکال

- ☑ حساسیت آنالیتیکال (Analytical Sensitivity) - حد آستانه ی تشخیص (Limit of Detection - LoD)
- ☑ ویژگی آنالیتیکال (Analytical Specificity)
- ☑ پایداری کیت
- ☑ مواد مداخله گر (Interfering Substances)
- ☑ اثر هوک (Hook Effect)
- ☑ تکرار پذیری درون- و بین-آزمایش آنالیتیکال برای LBC - (Intra & Inter Assay Reproducibility)
- ☑ تکرار پذیری درون- و بین-آزمایش آنالیتیکال برای FLOQSwab در نمونه هایی که توسط خود فرد (SelfCollected) گرفته شده اند - (Intra & Inter Assay Reproducibility)

حساسیت آنالیتیکال (Analitical Sensitivity)
حد آستانه ی تشخیص (Limit of Detection - LoD)

برای ارزیابی حساسیت آنالیتیکال کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit، از پلازمیدهای حاوی ژن E6 و E7 ویروس HPV (ژنوتیپ های ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶، ۶۷، ۶۸) و GAPDH استفاده شده است. برای این منظور از یک رقت سه تایی از هر یک از ژنوتیپ ها تهیه و در یک آزمایش ۸-تکراری برای هر ژنوتیپ استفاده شد.

حد آستانه تشخیص برای ژنوتیپ های مختلف HPV کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit به شرح زیر است:

Target	LoD (copies/PCR)
HPV 16 & 18	**150-160**
HPV 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66, 67	**1500-1600**
HPV 51, 68	**3800-4000**
GAPDH	**780**

ویژگی آنالیتیکال (Analytical Specificity)

برای ارزیابی ویژگی آنالیتیکال کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit، از DNA میکروارگانیسم های گروه یک در جدول زیر پس از استخراج DNA، برای PCR استفاده شد و سایر میکروارگانیسم های گروه دو به صورت in silico مورد ارزیابی قرار گرفت و هیچ واکنش متقاطعی مشاهده نشد.

Group 1

Bacteria	Viruses	Protozoa
Lactobacillus acidophilus	Cytomegalovirus	Candida albicans
Streptococcus agalactiae	Epstein Barr virus	
Neisseria gonorrhoeae	Herpes simplex virus 1	
Gardnerella vaginalis		
Lactobacillus jensenii		

Group 2

Human Papillomaviruses	Bacteria	Viruses	Protozoa
All non-targeted alpha-HPV genotypes	Peptostreptococcus spp.	Adenovirus	Trichomonas vaginalis
Alpha HPV genotypes include the following: HPV 16, 18, 26, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82, 85	Klebsiella spp.	Herpes simplex virus 2	
	Enterobacter spp.		
	Proteus spp.		
HPV 6, 11, 42, 43, 44	Pseudomonas spp.		
	Bacteroides spp.		
	Bifidobacterium spp.		
	Fusobacterium spp.		
	Treponema pallidum		
	Staphylococcus epidermidis		
	Staphylococcus aureus		
	Streptococcus faecalis		
	Streptococcus pyogenes		
	Corynebacterium spp.		
	Escherichia coli		
	Enterococcus spp.		
	Clostridium spp.		
	Chlamydia trachomatis		

پایداری کیت (Stability)

برای بررسی پایداری کیت در شرایط گوناگون از نمونه های مثبت حاوی مقادیر نزدیک به LoD و تقریبا 3log> LoD استفاده شد.

- ☑ **فریز - دفریز یا استفاده روزانه از کیت:** برای ارزیابی اثر فریز و دفریز شدن مخلوط واکنش، آزمایش به صورت تکرار سه تایی و بر روی نمونه های مثبت حاوی مقادیر نزدیک به LoD و تقریبا 3log > LoD و در پنج نوبت انجام شد. میزان CV% (Coefficient of Variation) در سیکل حد آستانه (ct value) درون آزمایش و بین آزمایش همانطور که در جدول زیر قابل مشاهده است، بسیار کم بود. بنابراین، ۵ بار فریز و دفریز شدن مخلوط آزمایش اثر منفی در عملکرد کیت ندارد.

In Use Stability - qPCR Mix Tube 1, 2 & 3

qPCR Mix	HPV Type Tested	Target Concentration	Intra Assay Reproducibility				Inter Assay Reproducibility		
			SD	CV%	Variance		SD	CV%	Variance
qPCR Mix 1	HPV 16	1 log > LoD	0.15	0.50	0.03		0.28	0.96	0.08
	HPV 18	1 log > LoD	0.19	0.65	0.04		0.20	0.69	0.04
	IC	3 log > LoD	0.07	0.33	0.01		0.14	0.61	0.02
	HPV 58	≈ LoD	0.27	0.86	0.08		0.34	1.09	0.11
qPCR Mix 2	HPV 31	1 log > LoD	0.19	0.65	0.04		0.48	1.62	0.23
	HPV 33	3 log > LoD	0.11	0.50	0.01		0.12	0.51	0.01
	IC	3 log > LoD	0.05	0.23	0.00		0.10	0.44	0.01
	HPV 35	1 log > LoD	0.22	0.81	0.06		0.33	1.21	0.11
qPCR Mix 3	HPV 52	1 log > LoD	0.87	3.00	0.87		0.96	3.37	0.93
	HPV 45	3 log > LoD	0.14	0.56	0.02		0.12	0.51	0.02
	IC	3 log > LoD	0.07	0.31	0.01		0.15	0.66	0.02
	HPV 51	1 log > LoD	0.42	1.52	0.20		0.57	2.09	0.32

☑ **پایداری در شرایط حمل:** برای ارزیابی اثر حمل کیت با یخ خشک (CO_2 جامد) بر روی مخلوط واکنش، یک کیت در شرایط حمل بر روی یخ خشک قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت در مقایسه با کیت معیار، آزمایش شد. آزمایش به صورت تکرار سه تایی و بر روی نمونه های مثبت حاوی مقادیر نزدیک به LoD و تقریبا 3log > LoD انجام شد. میزان CV% (Coefficient of Variation) در سیکل حد آستانه (ct value) درون آزمایش و بین آزمایش همانطور که در جدول زیر قابل مشاهده است، بسیار کم بود. بنابراین، حمل کیت بر روی یخ خشک، اثر منفی در عملکرد کیت ندارد.

Shipment Stability - qPCR Mix Tube 1, 2 & 3

qPCR Mix	HPV Type Tested	Target Concentration	Intra Assay Reproducibility				Inter Assay Reproducibility		
			SD	CV%	Variance		SD	CV%	Variance
qPCR Mix 1	HPV 16	≈ LoD	0.10	0.34	0.01		0.13	0.46	0.02
	HPV 18	≈ LoD	0.25	0.83	0.07		0.25	0.83	0.06
	IC	3 log > LoD	0.07	0.32	0.01		0.08	0.36	0.01
	HPV 58	≈ LoD	0.20	0.67	0.04		0.26	0.85	0.07
qPCR Mix 2	HPV 31	1 log > LoD	0.19	0.65	0.04		0.21	0.72	0.04
	HPV 33	3 log > LoD	0.03	0.14	0.00		0.12	0.51	0.01
	IC	3 log > LoD	0.08	0.34	0.01		0.10	0.44	0.01
	HPV 35	1 log > LoD	0.19	0.66	0.05		0.29	1.04	0.09
qPCR Mix 3	HPV 52	1 log > LoD	0.59	2.28	0.39		0.71	2.74	0.51
	HPV 45	3 log > LoD	0.18	0.75	0.03		0.18	0.72	0.03
	IC	3 log > LoD	0.17	0.74	0.03		0.15	0.68	0.02
	HPV 51	1 log > LoD	0.38	1.35	0.15		0.38	1.35	0.14

اثر هوک (Hook Effect)

برای ارزیابی اثر مهار کنندگی در زمان غالب بودن یک ژنوتیپ HPV، در نمونه ای که با بیش از یک ژنوتیپ آلوده است، نمونه های مثبتی مورد آزمایش قرار گرفت که تعداد کپی یک ویروس در آن نزدیک به 4log> LoD بود در حالی که تعداد کپی ژنوتیپ های دیگر در همان نمونه نزدیک به LoD بودند. این آزمایش برای ژنوتیپ های ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۴۵، ۵۲ و ۵۸، به طور جداگانه در سه آزمایش ارزیابی شد. هر آزمایش به گونه ای انجام شد که هر ژنوتیپ یکبار به صورت غالب (4log> LoD) و دو بار نزدیک به LoD باشد. همانطور که در جداول زیر ملاحظه می کنید، اثر منفی در این تعداد کپی از ویروس بر روی سایر ژنوتیپ ها دیده نشد.

tBioDx™ HPV ExtendScreen™ - qPCR Mix 1

						tBioDx™ HPV ExtendScreen™ - qPCR Mix 1						
qPCR Mix	HPV Type Tested	HPV 16 Concentration	HPV 18 Concentration	HPV 58 Concentration	IC Concentration	Intra Assay Reproducibility				Inter Assay Reproducibility		
						SD	CV%	Variance		SD	CV%	Variance
qPCR Mix 1	HPV 16, 18, 58	4 log > LoD	≈ LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.04	0.26	0.00		0.07	0.42	0.00
	HPV 16, 18, 58	4 log > LoD	≈ LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.31	1.09	0.11		0.34	1.21	0.12
	HPV 16, 18, 58	4 log > LoD	≈ LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.16	0.81	0.03		0.27	1.32	0.07
	HPV 16, 18, 58	4 log > LoD	≈ LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.41	1.32	0.18		0.49	1.58	0.24
qPCR Mix 1	HPV 16, 18, 58	≈ LoD	4 log > LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.19	0.66	0.04		0.19	0.67	0.04
	HPV 16, 18, 58	≈ LoD	4 log > LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.05	0.28	0.00		0.17	0.96	0.03
	HPV 16, 18, 58	≈ LoD	4 log > LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.09	0.44	0.01		0.19	0.94	0.04
	HPV 16, 18, 58	≈ LoD	4 log > LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.35	1.12	0.13		0.40	1.29	0.16
qPCR Mix 1	HPV 16, 18, 58	≈ LoD	≈ LoD	3 log > LoD	1xlog> LoD	0.20	0.72	0.04		0.24	0.86	0.06
	HPV 16, 18, 58	≈ LoD	≈ LoD	3 log > LoD	1xlog> LoD	0.19	0.64	0.04		0.27	0.92	0.07
	HPV 16, 18, 58	≈ LoD	≈ LoD	3 log > LoD	1xlog> LoD	0.11	0.56	0.01		0.22	1.07	0.05
	HPV 16, 18, 58	≈ LoD	≈ LoD	3 log > LoD	1xlog> LoD	0.11	0.62	0.01		0.19	1.03	0.04

tBioDx™ HPV ExtendScreen™ - qPCR Mix 2

						tBioDx™ HPV ExtendScreen™ - qPCR Mix 2						
qPCR Mix	HPV Type Tested	HPV 31 Concentration	HPV 33 Concentration	HPV 35 Concentration	IC Concentration	Intra Assay Reproducibility				Inter Assay Reproducibility		
						SD	CV%	Variance		SD	CV%	Variance
qPCR Mix 2	31, 33, 35	4 log > LoD	≈ LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.22	1.33	0.05		0.30	1.85	0.09
	31, 33, 35	4 log > LoD	≈ LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.16	0.83	0.03		0.21	1.09	0.04
	31, 33, 35	4 log > LoD	≈ LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.16	0.71	0.04		0.20	0.88	0.04
	31, 33, 35	4 log > LoD	≈ LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.31	1.06	0.10		0.33	1.15	0.11
qPCR Mix 2	31, 33, 35	≈ LoD	4 log > LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.19	0.72	0.04		0.26	0.98	0.07
	31, 33, 35	≈ LoD	4 log > LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.35	2.18	0.34		0.61	3.78	0.38
	31, 33, 35	≈ LoD	4 log > LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.09	0.41	0.01		0.14	0.61	0.02
	31, 33, 35	≈ LoD	4 log > LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.56	1.95	0.42		0.66	2.32	0.44
qPCR Mix 2	31, 33, 35	≈ LoD	≈ LoD	4 log > LoD	1xlog> LoD	0.24	0.77	0.06		0.27	0.88	0.07
	31, 33, 35	≈ LoD	≈ LoD	4 log > LoD	1xlog> LoD	0.13	0.55	0.02		0.15	0.68	0.02
	31, 33, 35	≈ LoD	≈ LoD	4 log > LoD	1xlog> LoD	0.10	0.45	0.01		0.18	0.78	0.03
	31, 33, 35	≈ LoD	≈ LoD	4 log > LoD	1xlog> LoD	0.42	2.19	0.21		1.07	5.45	1.14

tBioDx™ HPV ExtendScreen™ - qPCR Mix 3

						tBioDx™ HPV ExtendScreen™ - qPCR Mix 3						
qPCR Mix	HPV Type Tested	HPV 45 Concentration	HPV 52 Concentration	HPV 51 Concentration	IC Concentration	Intra Assay Reproducibility				Inter Assay Reproducibility		
						SD	CV%	Variance		SD	CV%	Variance
qPCR Mix 3	45, 52, 51	4 log > LoD	≈ LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.17	0.88	0.03		0.44	2.21	0.19
	45, 52, 51	4 log > LoD	≈ LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.15	0.62	0.02		0.23	0.95	0.05
	45, 52, 51	4 log > LoD	≈ LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.13	0.55	0.02		0.17	0.72	0.03
	45, 52, 51	4 log > LoD	≈ LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.25	0.93	0.07		0.30	1.10	0.09
qPCR Mix 3	45, 52, 51	≈ LoD	4 log > LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.52	1.93	0.28		0.72	2.65	0.51
	45, 52, 51	≈ LoD	4 log > LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.04	0.22	0.00		0.11	0.63	0.01
	45, 52, 51	≈ LoD	4 log > LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.09	0.39	0.01		0.16	0.69	0.03
	45, 52, 51	≈ LoD	4 log > LoD	≈ LoD	1xlog> LoD	0.27	1.09	0.07		0.34	1.38	0.12
qPCR Mix 3	45, 52, 51	≈ LoD	≈ LoD	4 log > LoD	1xlog> LoD	0.51	1.99	0.29		0.55	2.14	0.31
	45, 52, 51	≈ LoD	≈ LoD	4 log > LoD	1xlog> LoD	0.12	0.50	0.02		0.16	0.65	0.02
	45, 52, 51	≈ LoD	≈ LoD	4 log > LoD	1xlog> LoD	0.07	0.31	0.01		0.15	0.65	0.02
	45, 52, 51	≈ LoD	≈ LoD	4 log > LoD	1xlog> LoD	0.53	2.83	0.30		0.52	2.79	0.27

مواد مداخله گر (Interfering Substances)

مواد مداخله گر زیر برای ارزیابی عملکرد کیت در حضور موادی که بالقوه می توانند واکنش PCR را مهار کنند مورد استفاده قرار گرفت. در این آزمایش مواد زیر به نسبت های ذکر شده و به طور مجزا (با نسبت های ذکر شده در زیر) به LBC و FLOQSwab که حاوی مقادیر نزدیک به LoD و تقریبا 2log < LoD از ژنوتیپ های مختلف HPV بود اضافه و آزمایش به صورت تکرارهای سه تایی از هر نسبت (٪) مخلوط شده انجام شد.

- ☑ کرم Clotrimazol 1% با نسبت ۱٪، ۵٪ و ۱۰٪
- ☑ کرم Clotrimazol 2% با نسبت ۱٪، ۵٪ و ۱۰٪
- ☑ کرم مخلوط Clotrimazol 2% و Clindamazol 2% با نسبت ۱٪، ۵٪ و ۱۰٪
- ☑ هورمون واژینال Progestron با نسبت ۱٪، ۵٪ و ۱۰٪
- ☑ یک میلیون سلول لوکوسیت
- ☑ خون تام با نسبت ۲٪، ۵٪ و ۱۰٪
- ☑ موکوس سرویکال با نسبت ۰/۵٪ و ۵٪
- ☑ استیک اسید با نسبت ۱٪، ۵٪ و ۱۰٪
- ☑ جوش شیرین با نسبت ۱٪، ۵٪ و ۱۰٪
- ☑ ژل شستشوی واژینال با نسبت ۱٪، ۵٪ و ۱۰٪
- ☑ ژل Lubricant معمولی با نسبت ۱٪، ۵٪ و ۱۰٪
- ☑ ژل Lubricant مورد استفاده در معاینات پزشکی با نسبت ۱٪، ۵٪ و ۱۰٪

آزمایش فوق با هر دو کیت QIAamp MinElute Media Kit شرکت QIAGEN و کیت *tBioCare™ HPV DNA* Extraction Kit شرکت زیست تشخیص فردا (tBioDx™) انجام شد. همانطور که در جدول های زیر ملاحظه می کنید، هیچ یک از مواد فوق در نسبت های ذکر شده تاثیر منفی بر روی عملکرد کیت نداشتند.

Interfering Substances Results - Tested with QIAamp MinElute Media Kit - QIAGEN

		Interference Observed	
Potential Interfering Substances	**Concentration Tested**	**LBC Samples**	**COPAN Vaginal FLOQSwab Self-Collected Samples**
Anti-bacterial and Anti-Fungal - Clotrimazol 1%	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Anti-bacterial and Anti-Fungal - Clotrimazol 2%	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Anti-bacterial and Anti-Fungal - Clindimazol 2% + Clotrimazol 2%	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Hormons - Fertigest Progestron	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Leukocytes	1 Million Cells/ Sample	Non	Non
Whole Blood	2%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Cervical Mucosa	0.5%	Non	Non
	5%	Non	Non
Acetic Acid	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Backing Soda	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Fresheners (Feminine Intimate Cleansing Gel)	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Lubricants - Water Gel	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Clinician Sampling Gel	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non

Interfering Substances Results Tested with tBioCare™ HPV DNA Extraction Kit - tBioDx™

		Interference Observed	
Potential Interfering Substances	**Concentration Tested**	**LBC Samples**	**COPAN Vaginal FLOQSwab Self-Collected Samples**
Anti-bacterial and Anti-Fungal - Clotrimazol 1%	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Anti-bacterial and Anti-Fungal - Clotrimazol 2%	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Anti-bacterial and Anti-Fungal - Clindimazol 2% + Clotrimazol 2%	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Hormons - Fertigest Progestron	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Leukocytes	1 Million Cells/ Sample	Non	Non
Whole Blood	2%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Cervical Mucosa	0.5%	Non	Non
	5%	Non	Non
Acetic Acid	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Backing Soda	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Fresheners (Feminine Intimate Cleansing Gel)	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Lubricants - Water Gel	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non
Clinician Sampling Gel	1%	Non	Non
	5%	Non	Non
	10%	Non	Non

تکرار پذیری درون- و بین آزمایش آنالیتیکال برای نمونه های LBC - Intra & Inter Assay) (Reproducibility

برای ارزیابی تکرار پذیری درون- و بین آزمایش، دو سری ساخت (Lot) از کیت HPV *tBioDx™* ExtendScreen™ Kit مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه های مورد آزمایش حاوی دو مقدار از هر ژنوتیپ بود: نزدیک به LoD و 2log> LoD و همچنین 2log> LoD و 4log>LoD تا تکرار پذیری نتایج آزمایش در مقادیر متنوعی مورد ارزیابی قرار بگیرد. هر نمونه به صورت تکرارهای سه تایی و در ۱۰ آزمایش متفاوت و بر روی دو دستگاه مجزا، توسط دو اپراتور انجام شد. میانگین CV% آزمایش در جدول زیر آمده است:

	Intra Assay Reproducibility		Inter Assay Reproducibility	
	CV%	CV%	CV%	CV%
	Device 1	Device 2	Device 1	Device 2
Tube 1 (qPCR Mix 1)	0.55	0.55	1.77	1.55
Tube 2 (qPCR Mix 2)	0.35	0.38	1.84	1.29
Tube 3 (qPCR Mix 3)	0.99	0.73	2.50	1.99

تکرار پذیری درون- و بین آزمایش آنالیتیکال برای FLOQSwab در نمونه هایی که توسط خود فرد گرفته شده اند - (SelfCollected) (Intra & Inter Assay Reproducibility)

برای ارزیابی تکرار پذیری درون- و بین آزمایش، دو سری ساخت (Lot) از کیت HPV *tBioDx™* ExtendScreen™ Kit مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه های مورد آزمایش حاوی دو مقدار از هر ژنوتیپ بود: نزدیک به LoD و 2log> LoD و همچنین 2log> LoD و 4log>LoD تا تکرار پذیری نتایج آزمایش در مقادیر متنوعی مورد ارزیابی قرار بگیرد. هر نمونه به صورت تکرارهای سه تایی و در ۱۰ آزمایش متفاوت و بر روی دو دستگاه مجزا، توسط دو اپراتور انجام شد. میانگین CV% آزمایش در جدول زیر آمده است:

	Intra Assay Reproducibility		Inter Assay Reproducibility	
	CV%	CV%	CV%	CV%
	Device 1	Device 2	Device 1	Device 2
Tube 1 (qPCR Mix 1)	0.58	0.50	1.29	0.99
Tube 2 (qPCR Mix 2)	0.44	0.44	1.07	1.05
Tube 3 (qPCR Mix 3)	0.44	0.88	1.05	1.51

عملکرد کلینیکال

حساسیت و ویژگی کلینیکال (Clinical Sensitivity & Specificity) برای نمونه های LBC

حساسیت و ویژگی کلینیکال آزمایش با کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit برای نئوپلازیای درون اپیتلیالی سرویکس گرید ۲ یا بیشتر (Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 - CIN 2+) و همچنین نمونه های نرمال یا با ضایعات پیش سرطانی شامل نئوپلازی درون اپیتلیالی سرویکس گرید ۱ یا کمتر (Cervical Intraepithelial Neoplasia) در مقایسه با کیت QIAscreen HPV PCR Test (HPV-Risk Assay Self-screen B.V.) طبق راهنمای بین المللی برای غربالگری سرطان دهانه رحم (Meijer Guideline) انجام شد. حساسیت کلینیکی با آزمایش بر روی ۷۱ نمونه ی CIN 2+ برابر با ۹۶/۳۰٪ و ویژگی کلینیکی با آزمایش بر روی ۸۲۶ نمونه ی CIN1 یا کمتر برابر با ۹۸/۸۴٪ بود.

حساسیت و ویژگی کلینیکی کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit در مقایسه با کیت ارجاع، QIAscreen HPV PCR Test (HPV-Risk Assay by Self-screen B.V.)، عملکرد بسیار خوبی داشت (جدول زیر).

حساسیت و ویژگی کلینیکال (Clinical Sensitivity & Specificity) برای نمونه های FLOQSwab

حساسیت و ویژگی کلینیکال آزمایش با کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit برای نئوپلازیای درون اپیتلیالی سرویکس گرید ۲ یا بیشتر (Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 - CIN 2+) و همچنین نمونه های نرمال یا با ضایعات پیش سرطانی شامل نئوپلازی درون اپیتلیالی سرویکس گرید ۱ یا کمتر (Cervical Intraepithelial Neoplasia) در مقایسه با کیت QIAscreen HPV PCR Test (HPV-Risk Assay by Self-screen B.V.) طبق راهنمای بین المللی برای غربالگری سرطان دهانه رحم (Meijer Guideline) انجام شد. حساسیت کلینیکی با آزمایش بر روی ۷۱ نمونه ی CIN 2+ برابر با ۹۶/۲۳٪ و ویژگی کلینیکی با آزمایش بر روی ۸۲۵ نمونه ی CIN1 یا کمتر برابر با ۹۸/۱۹٪ بود.

حساسیت و ویژگی کلینیکی کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit در مقایسه با کیت ارجاع، QIAscreen HPV PCR Test (HPV-Risk Assay by Self-screen B.V.)، عملکرد بسیار خوبی داشت (جدول زیر).

Sample Type	Number of <CIN1 Samples	Clinical Specificity	Meijer Guideline Requirement	Number of CIN2+ Samples	Clinical Sensitivity	Meijer Guideline Requirement
LBC	826	98.84	98%	71	96.30	90%
COPAN FLOQSwabs	825	98.19	98%	70	96.23	90%

منابع

1. Meijer C.J, et al., *Int J Cancer*. 2009 February 1; 124(3): 516–520. doi:10.1002/ijc.24010

2. Establishing the Performance Characteristics of In Vitro Diagnostic Devices for the Detection or Detection and Differentiation of Human Papillomaviruses, U.S. Food and Drug Administration, September 15, 2017

3. Demarco M, et al., A study of type-specific HPV natural history and implications for contemporary cervical cancer screening programs, EClinicalMedicine 22 (2020) 100293

4. Malagón T., et al., Cumulative risk of cervical intraepithelial neoplasia for women with normal cytology but positive for human papillomavirus: Systematic review and meta-analysis, Int. J. Cancer. 2020;147:2695–2707

5. Arbyn M et al., 2020 list of human papillomavirus assays suitable for primary cervical cancer screening, Clinical Microbiology and Infection 27 (2021) 1083e1095

6. Poljak M et al., Commercially available molecular tests for human papillomaviruses: a global overview, Clinical Microbiology and Infection 26 (2020) 1144e1150

7. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer, Human Papillomavirus and Related Diseases Report, October 2021

راهنمای حل مشکلات

لطفا از اطلاعات جدول زیر برای رفع مشکلات احتمالی استفاده کنید. برای دریافت پشتیبانی بیشتر لطفا به آدرس https://www.tbiodx.com/ticketing مراجعه کنید.

مشکلات احتمالی و راه حل ها

مشکل	علت	راه حل

نکات عمومی مهم

- ☑ کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit برای نمونه های LBC و یا FLOQSwab که از سرویکس و یا سرویکو-واژینال گرفته می شوند صحه گذاری شده است.
- ☑ شیوه ی نمونه گیری، شرایط حمل و نحوه ی نگهداری نمونه، می تواند در تعداد کپی HPV در نمونه اثرگذار باشد و منجر به نتایج نامعتبر شود.
- ☑ استخراج DNA با استفاده از کیتهایی غیر از آنچه که در این کتابچه ذکر شده اند می تواند نتایج نامعتبر به ارمغان آورد.

اطلاعات سفارش

جهت سفارش کیت *tBioDx™* HPV ExtendScreen™ Kit و *tBioCare™ HPV DNA* Extraction Kit به آدرس www.tbiodx.com و یا با شماره تلفن ۰۲۱-۸۸۲۱۸۱۲۰ و ۰۲۱-۸۸۰۶۰۳۳۶ از روزهای شنبه تا چهارشنبه بین ساعت ۸ صبح تا ۴:۳۰ دقیقه بعد از ظهر تماس بگیرید.

شماره کاتالوگ	محصول
412100-025	tBioDx™ HPV ExtendScreen™ PCR Kit (25)
412100-100	tBioDx™ HPV ExtendScreen™ PCR Kit (100)
611400-50	tBioCare™ HPV DNA Extraction Kit (50)
MagRack-1.5-2	tBioRack™ - 1.5/2.0 mL

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group), FLOQSwab® (COPAN), tBioDx™, ExtendScreen™, tBioCare™, tBioMag™, tBioSpin™ (Zist Tashkhis Farda - tBioDx Co.). Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law.

Self-screen B.V. is the legal manufacturer of the QIAscreen HPV PCR Test.
The QIAscreen HPV PCR Test is manufactured for QIAGEN by Self-screen B.V.

علائم

لیست علائمی که ممکن است بر روی لیبل و یا جعبه محصول باشد:

Tests Per Kit

Research Use Only

In Vitro Diagnostic Use Only

Catalogue Number

Lot Number (Batch Code)

Global Trade Item Number

Temperature Limitations (Storage Temperature)

Use By (Expiration Date)

Attention

Consult Instructions for Use

Date of Manufacture

Manufacturer