مقدمه

پاپیلوماویروس‌های انسانی (HPVs) ویروس‌هایی دارای DNA دو رشته‌ای حلقوی با طول حدود ۷/۹ جفت باز هستند. تاکنون بیش از ۱۰۰ نوع از این ویروس‌ها شناسایی شده است که آلودگی با ۱۴ نوع از آن‌ها (High-risk HPVs یا hrHPVs) می‌تواند ریسک ابتلا به سرطان گردنه رحم را افزایش دهد[1]. بنابراین شناسایی و غربال‌گری hrHPVها از نظر بالینی حائز اهمیت است. بر اساس گایدلاین اخیر WHO (که به منظور پایش و کنترل و مدیریت بیماری منتشر شده است) پیشنهاد شده است که علاوه بر غربال‌گری اولیه تیپ‌های پرخطر، به منظور افتراق HPV16 و HPV18 از سایر تیپ‌های پرخطر، ژنوتایپینگ این ۲ تیپ نیز انجام شود. افراد مثبت از نظر HPV16 یا HPV18 کاندید کولپوسکوپی، جهت بررسی‌های بیشتر هستند و همچنین لازم است تا افراد مثبت از نظر ابتلا به سایر تیپ‌های پرخطر تست‌های سیتولوژیکی مثل پاپ اسمیر انجام دهند[2,3].

حیطه کاربرد و اساس تست

کیت Delta hrHPV Real-time PCR جهت انجام یک تست تشخیصی (غربالگری) In vitro کیفی به‌منظور ژنوتایپینگ انواع پرخطر HPV16 و HPV18 و همچنین تشخیص همزمان (Pool) سایر تیپ‌های پرخطر پاپیلوماویروس انسانی (شامل HPV31، HPV33، HPV35، HPV39، HPV45، HPV51، HPV52، HPV56، HPV58، HPV59، HPV66 و HPV68) طراحی شده است. این تست بر روی نوکلئیک اسید استخراج شده از نمونه‌های بالینی بدست آمده از گردنه رحم (سرویکس) انجام می‌شود. این نمونه‌های بالینی با استفاده از یک سیتوبراش جمع‌آوری شده و در یک محلول نگهدارنده قرار داده می‌شوند و سپس استخراج DNA از این نمونه‌ها انجام می‌شود. کاربرد تست مذکور، غربالگری زنان بالای ۳۰ سال در معرض خطر سرطان دهانه رحم است و نتایج این تست جهت تصمیم‌گیری در مورد نیاز به انجام کولپوسکوپی و پیگیری‌های بعدی کاربرد دارد. این کیت برای استفاده‌ی پرسنل آموزش دیده آزمایشگاه می‌باشد. اساس تست تشخیصی حاضر، تکنیک Multiplex probe-based real-time PCR است. در این روش، نواحی مختلفی از ژنوم پاپیلوماویروس‌های انسانی پرخطر (ژن‌های *E6* و *E7*) بعنوان هدف تشخیصی در فرآیند PCR تکثیر می‌شوند. برای این منظور، ابتدا DNA ژنومی استخراج شده از هر نمونه‌ی بالینی بعنوان الگو در دو واکنش Real-time PCR مجزا (درون ۲ میکروتیوب حاوی HPV mix A و HPV mix B) اضافه می‌شود تا بعد از تکثیر، بوسیله‌ی پروب‌های متصل به رنگ‌های فلوروسنت (فلوروفور) شناسایی شود. این پروب‌ها در انتهای ´۵ دارای فلوروفورهای مختلف و در انتهای ´۳ دارای یک خاموش کننده (کوئنچر) هستند. در میکروتیوب حاوی HPV mix A یکی از پروب‌ها که به فلوروفور FAM متصل است جهت شناسایی HPV16 و سایر پروب‌ها که به فلوروفور HEX متصل هستند جهت شناسایی سایر تیپ‌های پرخطر پاپیلومای انسانی شامل HPV31، HPV39، HPV51، HPV58، HPV59 و HPV68 و همچنین پروب دیگر متصل به فلوروفور Texas red جهت شناسایی ژن کنترل داخلی شماره ۱ استفاده می‌شوند. در میکروتیوب حاوی HPV mix B یکی از پروب‌ها که به فلوروفور FAM متصل است جهت شناسایی ژن کنترل داخلی شماره ۲ و سایر پروب‌ها که به فلوروفور HEX متصل هستند جهت شناسایی سایر تیپ‌های پرخطر پاپیلومای انسانی شامل HPV33، HPV35، HPV45، HPV52، HPV56 و HPV66 و همچنین پروب دیگر متصل به فلوروفور Texas red جهت شناسایی HPV18 استفاده می‌شوند. حضور کوئنچر در کنار فلوروفور مانع از ساطع شدن رنگ‌های فلوروسنت می‌شود. اما حین انجام واکنش PCR در صورت وجود ژنوم هدف، پرایمرها و پروب‌های اختصاصی به نواحی مربوطه متصل می‌شوند و به‌منظور تکثیر ناحیه‌ی هدف، آنزیم پلیمراز به انتهای ´۳ پرایمرها متصل شده و شروع به سنتز رشته‌های جدید می‌کند. در حین سنتز رشته‌های جدید، این آنزیم با استفاده از فعالیت اگزونوکلئازی باعث هیدرولیز پروب‌های متصل شده به نواحی هدف مربوطه شده و باعث جدا شدن کوئنچر از فلوروفورها و در نتیجه ساطع شدن رنگ‌های مختلف فلوروسنت می‌شوند که دستگاه Real-time PCR قادر به خوانش و ثبت آن‌ها بصورت یک منحنی سیگموئیدی شکل می‌باشد. در نهایت بعد از پایان واکنش PCR نتایج با استفاده از نرم افزار مربوطه آنالیز می‌شوند و مقادیر Ct (Cq)های مربوط به هر کانال بدست می‌آید.

منابع

1. Bosch, F.X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C.J., Shah, K.V. (2002) The casual relationship between human papillomavirus and cervical cancer. J. Clin. Pathol. 55, 244.
2. Meije, C.J., et al. (2009) Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. Int. J. Cancer 124(3), 516.
3. Hesselink, A. et al. (2014) Clinical validation of the HPV-Risk assay: a novel, real-time PCR assay for the detection of high-risk human papillomavirus DNA by targeting the E7 region. J. Clin. Microbiol. 52, 890

محتوای کیت ۵۰ تستی

	ریجنت	مقدار
۱	HPV mix A	۷۵۰ میکرولیتر
۲	HPV mix B	۷۵۰ میکرولیتر
۳	HPV negative ctrl	۱۰۰ میکرولیتر
۴	HPV positive ctrl	۱۰۰ میکرولیتر

شرایط حمل و نقل و نگهداری

- حمل و نقل کیت در دمای زیر ۲۰- درجه سانتیگراد انجام شود.
- تمامی اجزای کیت تا زمان انقضای مندرج بر روی لیبل در دمای ۵ ± ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شوند.
- اجزای کیت نهایتا بعد از ۳ سیکل ذوب / فریز پایدار هستند.
- در صورت نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، بهتر است آزمایشات در کمتر از یک هفته انجام شوند.
- تا حد امکان ریجنت حاوی پرایمر/ پروب در معرض نور مستقیم قرار نگیرد.

هشدارها

- هرگونه تغییرات در پروتکل پیش رو ممکن است باعث ایجاد خطا در نتایج حاصله شود.
- تست حاضر باید توسط افراد متخصص آموزش دیده و تحت شرایط GLP (Good laboratory practice) انجام شود.
- نتایج قابل اطمینان بستگی به جمع‌آوری، حمل، ذخیره و نگهداری مناسب نمونه و همچنین استخراج ژنومی صحیح دارد.
- کیت حاضرصرفا برای انجام تست بر روی ژنوم ویروس استخراج شده است. این تست نباید به‌طور مستقیم بر روی نمونه‌های بیمار انجام شود.
- مهارکننده‌های موجود در حین استخراج DNAژنومی می‌توانند مانع از تکثیر DNA هدف در حین انجام واکنش PCR شوند.

پروتکل

قبل از انجام تست تمامی اجزای کیت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شوند تا به آرامی ذوب شوند. استفاده از کرایورک به منظور نگهداری محلول‌ها در این مرحله پیشنهاد می‌شود. سپس برای حل کردن و هموژن کردن محلول‌ها از ورتکس استفاده شود. در مرحله بعد، تمامی محلول‌ها اسپین شوند تا در صورتی که قطرات محلول روی درب تیوب‌ها باشد به ته میکروتیوب کشیده شوند.

مراحل:

۱– در زیر یک ورک استیشن PCR، به ازای هر نمونه، مقدار **۱۵ میکرولیتر** از HPV mix A را در یک چاهک از پلیت مخصوص Real-time PCR (یا هر تیوب از استریپ تیوب ۸تایی) و مقدار **۱۵ میکرولیتر** از HPV mix B را در یک چاهک دیگر الیکوت نمایید.

۲– در زیر یک ورک استیشن دیگر مقدار **۵ میکرولیتر** از هر DNA استخراج شده‌ی پاپیلوماویروس را در به دو چاهک حاوی HPV mix A و HPV mix B اضافه و سپس اسپین نمایید.

- در این مرحله، بطور موازی مقدار ۵ میکرولیتر از هر کدام از کنترل‌های مثبت HPV positive ctrl و منفی HPV negative ctrl موجود در کیت را نیز به‌صورت جداگانه به ۲ چاهک دیگر حاوی میکس واکنش اضافه نمایید.

۳- پلیت یا استریپ حاوی میکس واکنش حاصل از مرحله‌ی قبل را به دستگاه Real-time PCR منتقل کرده و برنامه‌ی آورده شده در جدول روبرو را اجرا نمایید.

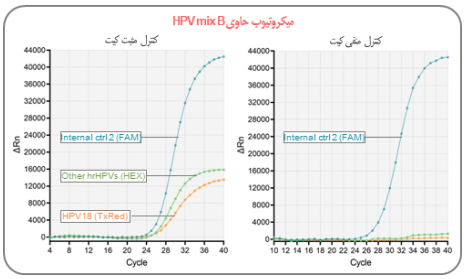
- دستگاه‌های ریل تایم PCR پیشنهادی: Roche LightCycler، BMS Mic-qPCR و Applied Biosystems

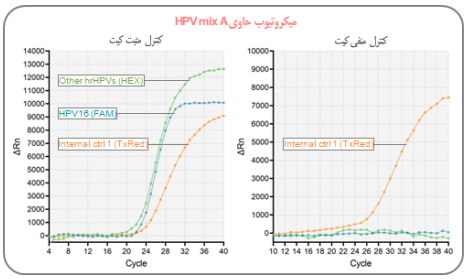
سیکل	مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (ثانیه)
۱ x	فعال شدن آنزیم پلیمراز	۹۵	۳۰۰
۴۰ x	باز شدن رشته‌های DNA الگو	۹۵	۱۵
	جفت شدن پرایمرها	۵۵	۱۵
	سنتز رشته های جدید	۷۲	۳۰ *
۱ x	خنک شدن	۲۵	۳۰

* خوانش فلوروسنت در کانال‌های FAM، HEX و Texas red در این مرحله انجام شود و در صورت نیاز Passive reference dye (ROX) در حالت خاموش قرار داده شود.

آنالیز نتایج

- بعد از انجام PCR، هر نمونه‌ی بیمار باید بصورت مجزا مورد بررسی و آنالیز قرار گیرد. پیشنهاد می‌شود جهت بدست آوردن مقادیر دقیقتر Ct، ترشهلد (آستانه) از حالت اتومات خارج شود و خط ترشهلد (Threshold line) بصورت دستی تنظیم شود.
- منحنی‌های مشاهده شده برای هر کدام از کانال‌ها باید بصورت تک تک مورد بررسی قرار گیرند. ممکن است بلند بودن ارتفاع یک منحنی در یک کانال باعث دیده نشدن منحنی کانال دیگر (مخصوصا کانال HEX) شود. با بررسی تک به تک منحنی‌های هر کانال یا تنظیم Scale محور Y نمودار بصورت مجزا، این مسئله برطرف می‌شود.
- منحنی‌های مشاهده شده برای هر کانال باید به‌شکل سیگموئیدی و یا دارای فاز لگاریتمی باشند.
- در هر یک از سه کانال FAM، HEX و Texas red مقادیر Ct کمتر از ۳۴ بعنوان نتیجه‌ی مثبت و مقادیر بزرگتر از ۳۴ بعنوان نتیجه‌ی منفی نظر گرفته شوند.
- نتایج مثبت، تاییدکننده‌ی قطعی عفونت با پاپیلوماویروس پرخطر و نتایج منفی رد کننده قطعی عفونت با پاپیلوماویروس پرخطر نیست و جواب‌های تست حاضر باید در ترکیب با یافته‌های بالینی، شرح حال بیمار و اطلاعات اپیدمیولوژیکی بکار گرفته شوند تا به نتیجه‌ی قطعی رسید.
- کنترل کیفی با استفاده از نتایج حاصل از کنترل‌های مثبت و منفی موجود در کیت انجام شود (شکل روبرو):





- تفسیر نتایج بر اساس جدول‌های زیر انجام شود:

تفسیر نتایج حاصل از چاهک حاوی HPV mix A	Texas red	HEX	FAM
وجود ژنوم تیپ پرخطر HPV16 در نمونه (جواب تست مثبت است)	±	-	+
وجود ژنوم حداقل یکی از تیپ‌های دیگر پرخطر مانند HPV31، HPV39، HPV51، HPV58، HPV59 و HPV68 در نمونه (جواب تست مثبت است)	±	+	-
عدم وجود تیپ‌های پرخطر پاپیلوماویروس انسانی در نمونه (جواب تست منفی است)	±	-	-
وجود همزمان ژنوم HPV16 و حداقل یکی از تیپ‌های دیگر پرخطر مانند HPV31، HPV39، HPV51، HPV58، HPV59 و HPV68 در نمونه (جواب تست مثبت است)	±	+	+
نمونه‌گیری یا استخراج ژنوم بدرستی انجام نشده است و یا احتمال حضور مهارکننده در نمونه وجود دارد (جواب تست نامعتبر است)	-	-	-

تفسیر نتایج حاصل از چاهک حاوی HPV mix B	Texas red	HEX	FAM
وجود ژنوم تیپ پرخطر HPV18 (جواب تست مثبت است)	+	-	±
وجود ژنوم حداقل یکی از تیپ‌های دیگر پرخطر مانند HPV33، HPV35، HPV45، HPV52، HPV56 و HPV66 (جواب تست مثبت است)	-	+	±
عدم وجود تیپ‌های پرخطر پاپیلوماویروس انسانی (جواب تست منفی است)	-	-	±
وجود همزمان ژنوم HPV18 و حداقل یکی از تیپ‌های دیگر پرخطر مانند HPV33، HPV35، HPV45، HPV52، HPV56 و HPV66 (جواب تست مثبت است)	+	+	±
نمونه‌گیری یا استخراج ژنوم بدرستی انجام نشده است و یا احتمال حضور مهارکننده در نمونه وجود دارد (جواب تست نامعتبر است)	-	-	-

ارزیابی عملکرد

ویژگی آنالیتیکال:

جهت ارزیابی Reactivity، ۱۴ژنوتیپ پرخطر پاپیلوماویروس انسانی (شامل HPV16 ،HPV18، HPV31، HPV33، HPV35، HPV39، HPV45، HPV51، HPV52، HPV56، HPV58، HPV59، HPV66 و HPV68) مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج حاکی از شناسایی این ژنوتایپ‌ها توسط کیت Delta hrHPV Real-time PCR بود. به‌منظور ارزیابی Cross-reactivity، تیپ‌های کم خطر مثل HPV6، HPV11 و HPV44 و همچنین برخی پاتوژن‌های دستگاه تناسلی مانند *Lactobacillus Acidophilus*، *Enterococcus faecalis*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و *Candida albicans* مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که هیچکدام از میکروارگانیسم‌های مورد بررسی با عملکرد کیت تداخلی ندارند و نتایج مثبت کاذب حاصل نمی‌شود. بعلاوه، به منظور بررسی تاثیر مداخله کننده های داخلی و خارجی بالقوه بر روی عملکرد کیت، تعداد شش نمونه مثبت (از نظر وجود HPV) و شش نمونه منفی جمع آوری گردید و مایع به دو گروه مساوی از نظر تقسیم شد. گروه اول به عنوان کنترل (حاوی هیچ مداخله گر بالقوه) و گروه دوم به عنوان گروه تست (حاوی مداخله کننده های بالقوه داخلی یا خارجی) درنظر گرفته شد. مداخله‌گرهای داخلی شامل لکوسیت، خون کامل و موکوس سرویکال و مداخله‌گرهای خارجی شامل لوبریکانت، کلوتریمازول و استیک اسید بودند. مقایسه‌ی نتایج بین گروه های تست و کنترل هیچ گونه تفاوت معنا داری را نشان نداد و نتایج حاکی از عدم تاثیر مداخله‌گرهای آزمایش شده بر نتایج حاصل بود.

حساسیت آنالیتیکال:

به منظور بررسی حساسیت آنالیتیکال جهت شناسایی ژنوتیپ‌های ۱۶ و ۱۸ (پلاسمید حاوی نواحی هدف با غلظت تعیین شده) توسط کیت Delta hrHPV Real-time PCR، غلظت‌های 1×10^6 copies/reaction از ژنوتیپ‌های مربوطه با ضریب رقت ۱ به ۱۰ رقیق شد (۸ سریال رقت). ارزیابی در هر رقت به صورت ۲۰ بار تکرار (در آزمایشات مختلف) انجام شد. کپی نامبری که در آن حداقل ۱۹ بار نتیجه آزمایش مثبت ارزیابی اعلام گردد به عنوان LOD کیت برای ژنوتیپ‌های ۱۶ یا ۱۸ در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از آزمایشات نشان داد که LOD تست حاضر معادل رقت پنجم یعنی تعداد با ۱۰۰ copies/reaction است.

عملکرد بالینی:

DNA ژنومی تعداد ۱۷۰ نمونه‌ی بالینی بررسی شده از قبل با استفاده از یک کیت تجاری معتبر (شامل ۷۰ نمونه‌ی مثبت از نظر وجود HPV و ۱۰۰ نمونه‌ی منفی) با استفاده از کیت Delta hrHPV Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج ارزیابی بالینی در زیر آورده شده است:

تشخیص ویروس با استفاده از کیت استاندارد	تعداد	تشخیص با استفاده از کیت Delta		حساسیت (PPA)	اختصاصیت (NPA)
		مثبت	منفی		
مثبت از نظر وجود HPV	۷۰	۶۹	۱	۹۸/۵٪	۹۹٪
منفی از نظر وجود HPV	۱۰۰	۱	۹۹		

- صحت عملکرد (Accuracy) کیت حاضر در مقایسه با یک کیت استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که صحت تست حاضر معادل ۹۸/۷۵ درصد می‌باشد.

دقت:

به منظور ارزیابی دقت درون آزمایشی (Repeatability)، آزمایشات در پنج روز کاری و حداقل سه بار تکرار برای هر نمونه بوسیله کیت Delta hrHPV Real-time PCR بر روی نمونه‌ی ژنوتیپ ۱۶ با دو غلظت کم و زیاد و همچنین یک نمونه‌ی منفی انجام گردید. با توجه به آنالیز آماری، تفاوت معناداری بین تکرارهای مختلف با غلظت‌های بالا و پایین از DNA پاپیلوماویروس مشاهده نشد که نشان از Repeatability مناسب کیت می‌باشد. جهت ارزیابی دقت برون آزمایشی (Reproducibility)، آزمایشات در پنج روز کاری و حداقل سه بار تکرار برای هر نمونه بوسیله دو لات نامبر از کیت مورد نظر بر روی نمونه‌ی ژنوتیپ ۱۶ با دو غلظت کم و زیاد با استفاده از دو دستگاه و دو اوپراتور متفاوت انجام گردید. با توجه به آنالیز آماری، تفاوت معناداری بین تکرارهای مختلف برای دو لات نامبر متفاوت با غلظت‌های بالا و پایین از DNA پاپیلوماویروس در دو دستگاه متفاوت با دو اپراتور مختلف مشاهده نشد که نشان از Reproducibility مناسب کیت می‌باشد.

پایداری:

جهت ارزیابی In use stability، با استفاده از کیت Delta hrHPV Real-time PCR که سه مرتبه تحت فریز و دفریز شدن قرار گرفته بود، دو نمونه با دو غلظت مشخص از ژنوتیپ ۱۶ مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور ارزیابی پایداری تسریع شده از فرمول تغییر یافته آرنیوس استفاده شد. برای این منظور، از دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به عنوان دمای شوک، دمای ۲۰- درجه سانتیگراد به عنوان دمای نگهداری طبیعی، و ضریب تخریب ۲ استفاده گردید. برای این منظور، با استفاده از کیتی که تا مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شده بود، دو نمونه با دو غلظت مشخص از ژنوتیپ ۱۶ مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از ریل تایم پی سی آر روزهای مختلف با یکدیگر مقایسه شدند. جهت ارزیابی Transport stability کیت مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت بر روی یخ خشک قرار داده شد. سپس، دو نمونه با دو غلظت مشخص از ژنوتیپ ۱۶ با استفاده از کیت مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به آنالیزهای انجام شده و عدم مشاهده اختلاف معنادار در بین گروه‌های مختلف در طی آزمایشات مختلف می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که کیت Delta hrHPV Real-time PCR از نظر انواع پایداری در شرایط تعیین شده در این آزمایشات مناسب است.

آدرس: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز رشد فناوری
شماره تماس: ۰۳۱۹۱۰۱۰۶۵۱ ۰۹۱۲۵۵۸۷۸۵۸
وبسایت: www.deltabiotechno.com

REF کاتالوگ نامبر | LOT لات نامبر | IVD جهت تشخیص بالینی | محدوده دمای نگهداری
حاوی دستورالعمل | تعداد تست‌ها | تاریخ انقضا | تاریخ تولید