

راهنمای کیت

HPV HR RQ3

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۲/۱

جهت تشخیص ۱۴ تایپ پرخطر و ۲ تایپ کم خطر ویروس پاپیلومای انسانی
به روش Real-Time PCR
جهت کار با دستگاه StepOne
مخصوص تحقیقات

 24 (Cat# HPVHR3RQ24)

 48 (Cat# HPVHR3RQ48)

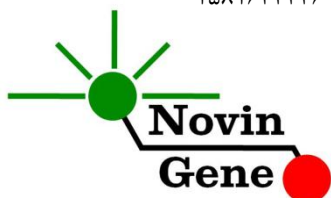
 96 (Cat# HPVHR3RQ96)

 NG-WI-ASL-36-201

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶



فهرست مندرجات:

۱. مقدمه.....	۳
۲. حیطه کاربرد.....	۳
۳. اطلاعات زمینه ای.....	۳
۴. اساس آزمایش.....	۴
۵. محتویات کیت.....	۴
۶. مدل های بسته بندی.....	۵
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت.....	۵
۸. محدودیت کاربرد.....	۵
۹. سایر موارد مورد نیاز.....	۶
۱۰. احتیاط و نکات لازم.....	۶
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن.....	۷
۱۲. استخراج DNA.....	۷
۱۳. کنترل داخلی.....	۸
۱۴. دستورکار PCR و مراحل آزمایش.....	۸
۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها.....	۱۰
۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene.....	۱۰
۱۷. تنظیم دستگاه StepOne.....	۱۲
۱۸. تنظیم سایر دستگاه ها.....	۱۲
۱۹. آنالیز نتایج Rotor-Gene.....	۱۳

۲۰. آنالیز نتایج StepOne.....	۱۷
۲۱. میزان حساسیت.....	۲۲
۲۲. روش امحاء.....	۲۲
۲۳. پشتیبانی فنی.....	۲۲
۲۴. اطلاعات تماس.....	۲۲
۲۵. منابع.....	۲۳
۲۶. توضیحات برچسب.....	۲۳

۱. مقدمه

کیت HPV HR RQ3 جهت تشخیص ۱۴ تایپ پرخطر و ۲ تایپ کم خطر ویروس پاپیلومای انسانی به روش Real-Time PCR طراحی شده است. در این روش، DNA به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین میکس این کیت حاوی سری ثانویه ای از پرایمرها و پروب جهت شناسایی یک توالی سنتتیک به عنوان کنترل داخلی می‌باشد. کنترل داخلی از گزارش منفی کاذب ناشی از استخراج نامناسب و یا مهار PCR جلوگیری می‌کند. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

۲. حیطه کاربرد

کیت HPV HR RQ3 امکان بررسی نمونه بیمار جهت تشخیص ۱۴ تایپ پرخطر (۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶ و ۶۸) و ۲ تایپ کم خطر (۶ و ۱۱) ویروس پاپیلومای انسانی را با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت برای استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

ویروس پاپیلومای انسانی (Human Papilloma Virus, HPV)، متعلق به خانواده پاپیلوماویریده (Papillomaviridae) است. این ویروس فاقد غشا بوده و ژنوم آن متشکل از DNA دو رشته ای به طول حدود هشت هزار جفت باز می‌باشد. بیش از ۱۵۰ تایپ انواع ویروس HPV تا کنون شناسایی شده است. عفونت مخاط دستگاه تناسلی با این ویروس به عنوان اصلی ترین عامل ابتلا به سرطان رحم در نظر گرفته می‌شود. بر اساس مطالعات انجام شده، ویروس‌های این خانواده به سه دسته پر خطر (High-Risk)، کم خطر (Low-Risk) و بی خطر (No-Risk) تقسیم می‌شوند. در

حال حاضر ۱۴ تایپ ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶ و ۶۸ به عنوان پرخطر و ۶ تایپ ۶، ۱۱، ۴۲، ۴۳، ۴۴ و ۵۳ به عنوان کم خطر دسته بندی می شوند.

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی عامل عفونی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز Polymerase Chain Reaction/PCR انجام می شود. طی این واکنش بخشی از ژنوم عامل عفونی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب های فلورسنت قابل تشخیص می گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می توان وجود عامل عفونی را در نمونه تشخیص داد، بدون آنکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول واکنش با روش هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

۵. محتویات کیت

این کیت شامل یک این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک فلش کارت و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
HPV HR1 Mix	میکس آماده برای PCR*	۴۸۰ میکرولیتر
HPV HR2 Mix	میکس آماده برای PCR*	۴۸۰ میکرولیتر
HPV HR3 Mix	میکس آماده برای PCR*	۴۸۰ میکرولیتر
HPV HR4 Mix	میکس آماده برای PCR*	۴۸۰ میکرولیتر
Pos Ctrl	شاهد مثبت	۱۰۰ میکرولیتر
Neg Ctrl	شاهد منفی	۱۰۰ میکرولیتر

۲۰۰ میکرولیتر	آب مخصوص PCR	Water
---------------	--------------	-------

۱*، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست و چهار، چهل و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می باشد.

۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰- درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند. از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آنها می شود. همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه ای و آموزش دیده طراحی شده است.
- تمامی مراحل کار بایستی مطابق دفترچه راهنمای کامل کیت انجام شود و هرگونه تغییری در آن منجر به بروز خطا در نتایج می گردد.
- از محتویات کیت نباید پس از گذشت تاریخ انقضای درج شده روی کیت استفاده نمود.
- در صورت تغییر رنگ لیبل حرارتی (به صورتی یا قرمز) حتی به صورت جزئی کیت نباید مورد استفاده قرار گیرد.

- این کیت تنها برای مصارف تحقیقاتی طراحی شده و برای تشخیص طبی (IVD) مورد تایید نمی‌باشد.

۹. سایر موارد مورد نیاز

- برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:
- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA
- تیوب ۱/۵ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۱۰. احتیاط و نکات لازم

- برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:
- **هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.**
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می‌باشند. هر یک از سه فضای فوق

باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.

- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- هنگام استفاده، مواد کیت را روی یخ خرد شده نگه دارید تا کاملاً ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگه داری کنید. از استفاده از یخ های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک آلومینیوم از پیش سرد شده گذاشته، و از گذاشتن آنها بر روی یخ خرد شده خودداری کنید.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش با این کیت، می تواند پاپ اسمیر یا سایر نمونه های مشابه باشد که حاوی میزان کافی از سلول های مخاطی دهانه یا گردن رحم است. نمونه را می توان برای مدت کمتر از ۸ ساعت در یخچال و برای زمان های طولانی تر در فریزر یا دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. نمونه در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیترو و ویروس در آن ثابت می ماند.

۱۲. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه روش ها و کیت های مختلفی در دسترس می باشند. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می کنیم:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat# 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۱۳. کنترل داخلی

برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار واکنش و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، این کیت حاوی کنترل داخلی می‌باشد. به این منظور پرایمرها و پروب مخصوص یک ژن انسانی به HR1 Mix افزوده شده است که در صورت عملکرد مناسب باید به تولید فلورسانس با تابش نارنجی (ROX) و CT بین ۲۰ تا ۳۰ منجر شود. برای توضیحات بیشتر به بخش آنالیز رجوع کنید.

۱۴. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

کیت محتوی ۴ نوع میکس متفاوت می‌باشد که هر میکس بین ۳ تا ۶ تایپ ویروس پاپیلوما را تشخیص می‌دهد. بنابراین هر نمونه باید با تمامی ۴ میکس کیت آزمایش شود تا امکان تشخیص ۱۶ تایپ مورد نظر ویروس پاپیلوما فراهم شود. ابتدا تمامی لوله‌ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

چهار سری لوله مخصوص PCR، هر سری برای یکی از میکس‌های PCR روی بلوک سرد بگذارید. در هر سری علاوه بر یک لوله برای هر یک از نمونه‌ها، ۳ لوله نیز برای شاهد‌های مثبت و منفی، و نمونه آب یا NTC در نظر بگیرید. به عنوان مثال برای آزمایش ۵ نمونه، به ۲۰ لوله برای نمونه‌ها و ۱۲ لوله برای شاهد‌ها نیاز داریم که مجموعاً ۳۲ لوله خواهد بود که به صورت ۴ سری ۸ تایی مرتب شده‌اند.

به هر یک از لوله‌های سری اول ۲۰ میکرولیتر از **HPV HR1 Mix** اضافه کنید.

به هر یک از لوله‌های سری دوم ۲۰ میکرولیتر از **HPV HR2 Mix** اضافه کنید.

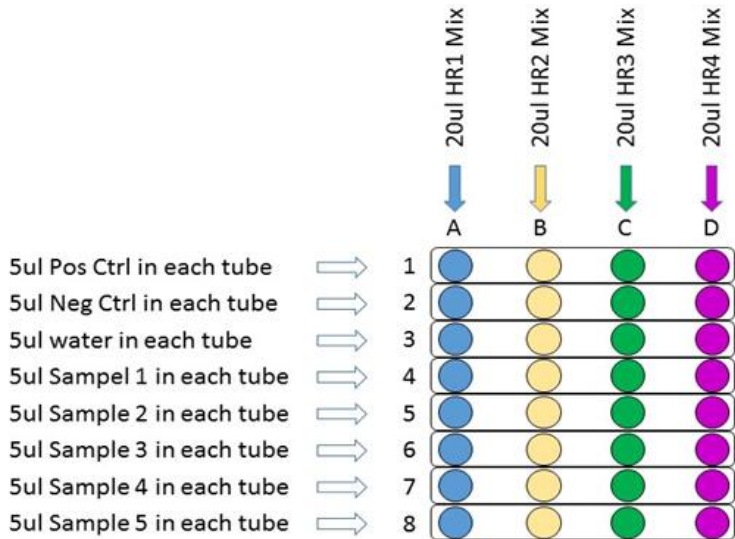
به هر یک از لوله‌های سری سوم ۲۰ میکرولیتر از **HPV HR3 Mix** اضافه کنید.

به هر یک از لوله‌های سری چهارم ۲۰ میکرولیتر از **HPV HR4 Mix** اضافه کنید.

سپس ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده، **شاهد** یا آب به هر لوله اضافه کنید به این منظور یک لوله در هر سری را برای هر نمونه یا شاهد در نظر بگیرید.

درپوش لوله‌ها را ببندید. سپس آن‌ها را مطابق شماره‌ها داخل دستگاه قرار دهید. توجه: در صورت استفاده از دستگاه **StepOne** لوله‌ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید. توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

چیدمان تیوب ها به طور خلاصه در تصویر ۱ نشان داده شده است.



تصویر ۱. چیدمان میکروتیوب ها و اضافه نمودن میکس، شاهد ها و نمونه های بیماران

۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت HPV RQ3 جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است.

۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

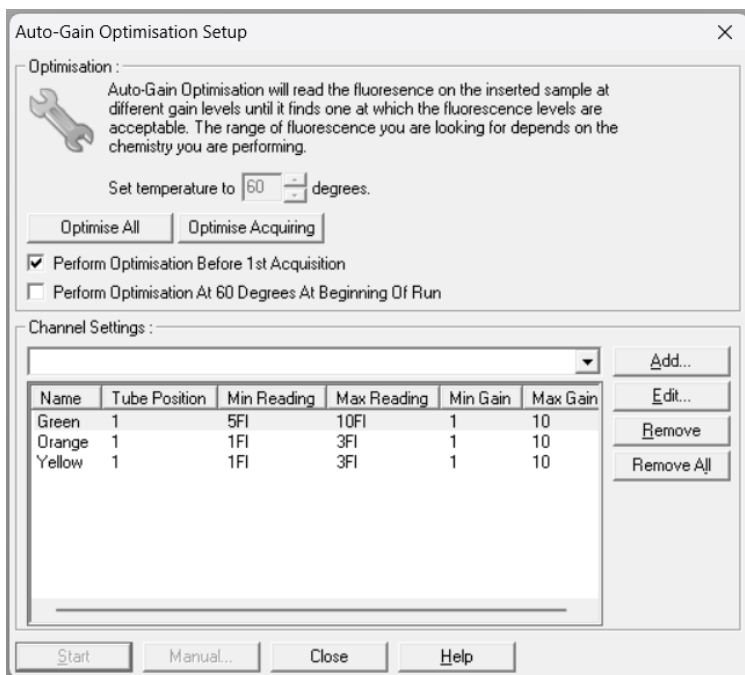
ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق بزنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

HPV HR RQ3 (V2.1)

فایل تمپلیت HPV HR RQ3 را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل HPV HR RQ3 0.1 یا HPV HR RQ3 0.2 را با توجه به نوع لوله استفاده شده انتخاب کنید.

نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منوی نرم افزار، گزینه View، سپس Gain Optimisation را انتخاب کنید. در پنجره باز شده در Auto-Gain Optimisation Setup ابتدا گزینه Optimise Acquiring را بزنید. تنظیمات را دقیقاً مطابق تصویر زیر برای همه ی کانال ها انجام دهید. Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس HPV HR1 باشد). گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را فعال کنید و پنجره را ببندید.



در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در پوشه مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای شاهد ها Positive Control و برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۷. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل فلش کارت همراه کیت را انتخاب کنید. (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. شاهد ها به همراه پنج نمونه از پیش تعریف شده اند. شاهد ها و تعداد نمونه مورد نظر را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای این کار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می‌توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می‌توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز اضافه کنید و نام نمونه ها را نیز مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۸. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را با سایر دستگاه های Real-Time PCR استفاده می‌کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 3 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

اندازه‌گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ‌های FAM و VIC و ROX تنظیم شود.

توجه داشته باشید که HPV HR Mix فاقد ROX به عنوان نرمال کننده است. لذا گزینه استفاده از این رنگ به عنوان نرمال کننده (normalizer) باید غیرفعال باشد.

۱۹. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Quantitation Analysis را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره auto find threshold دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. مراحل بالا را برای کانال‌های Yellow و Orange تکرار کرده و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. برای تفسیر نتایج ابتدا به جدول زیر توجه کنید. این جدول نشان می‌دهد که هر یک از میکس‌های ۱ تا ۴، در هر یک از کانال‌های فلورسانس کدام تایپ را تشخیص می‌دهند.

	Green	Yellow	Orange
HR1 Mix	16	6/11	Albumin
HR2 Mix	18	39	59
HR3 Mix	31/33	52/58	56/66
HR4 Mix	35/45	51	68

با توجه به جدول بالا نتایج را اینگونه می‌توان تفسیر نمود:

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می‌شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی و CT کمتر از ۴۰ باشد. در غیاب

منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود. همچنین CT بالاتر از ۴۰ نیز مثبت محسوب نمی شود.

همچنین، کنترل داخلی نمونه همیشه باید مثبت باشد یعنی نمونه باید با میکس ۱ در کانال نارنجی همواره مثبت و دارای CT بین ۲۰ تا ۳۰ باشد. در غیر اینصورت یعنی چنانچه نمونه با میکس ۱ در کانال نارنجی منفی باشد یا CT آن بالاتر از ۳۰ باشد، جواب نامعتبر است و آزمایش باید تکرار شود.

نتیجه منفی: در صورتیکه نمونه فقط در **کانال نارنجی** و با میکس ۱ مثبت باشد و با بقیه میکس ها در تمامی کانال ها منفی باشد، نمونه **منفی** می باشد.

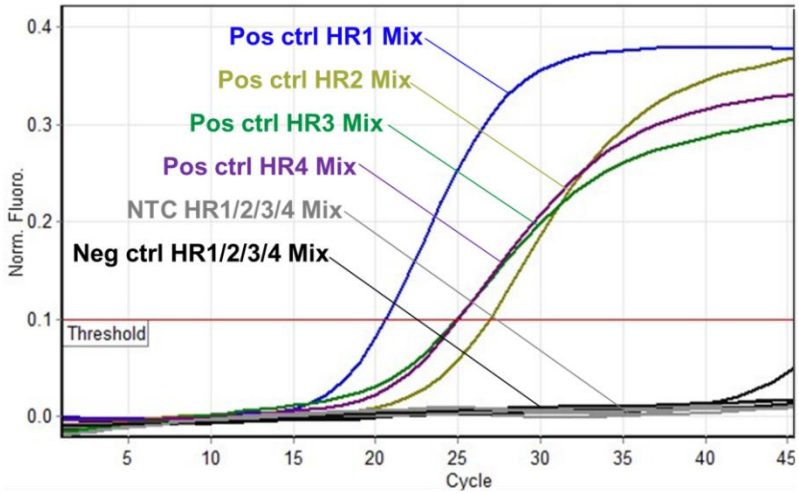
نتیجه مثبت: در صورتیکه نمونه در کانال نارنجی با میکس ۱ با CT حدود ۲۰ تا ۳۰ مثبت باشد، آنگاه:

- در صورتی که نمونه در **کانال سبز** و با میکس ۱ مثبت باشد، برای HPV16 مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال زرد** و با میکس ۱ مثبت باشد، برای HPV6 یا HPV11 مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال سبز** و با میکس ۲ مثبت باشد، برای HPV18 مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال زرد** و با میکس ۲ مثبت باشد، برای HPV39 مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال نارنجی** و با میکس ۲ مثبت باشد، برای HPV59 مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال سبز** و با میکس ۳ مثبت باشد، برای HPV31 یا HPV33 مثبت می باشد.

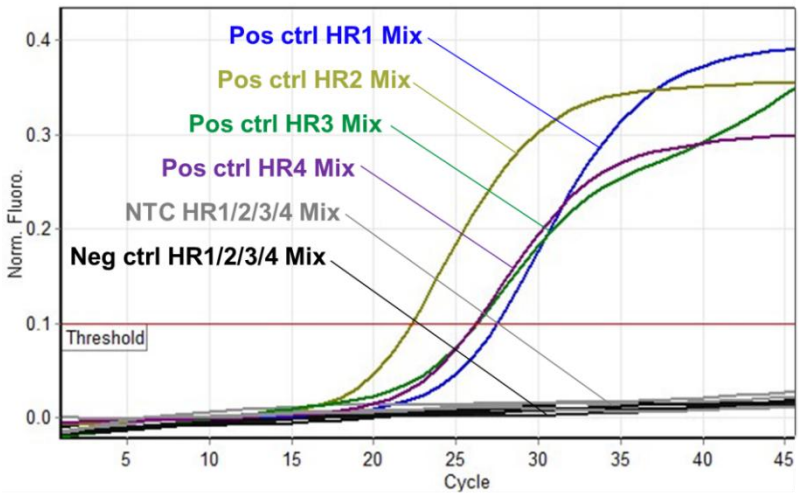
- در صورتی که نمونه در **کانال زرد** و با میکس ۳ مثبت باشد، برای **HPV52** یا **HPV58** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال نارنجی** و با میکس ۳ مثبت باشد، برای **HPV56** یا **HPV66** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال سبز** و با میکس ۴ مثبت باشد، برای **HPV35** یا **HPV45** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال زرد** و با میکس ۴ مثبت باشد، برای **HPV51** مثبت می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال نارنجی** و با میکس ۴ مثبت باشد، برای **HPV68** مثبت می‌باشد.

توضیحات بالا به صورت خلاصه در جدول زیر نشان داده شده اند:

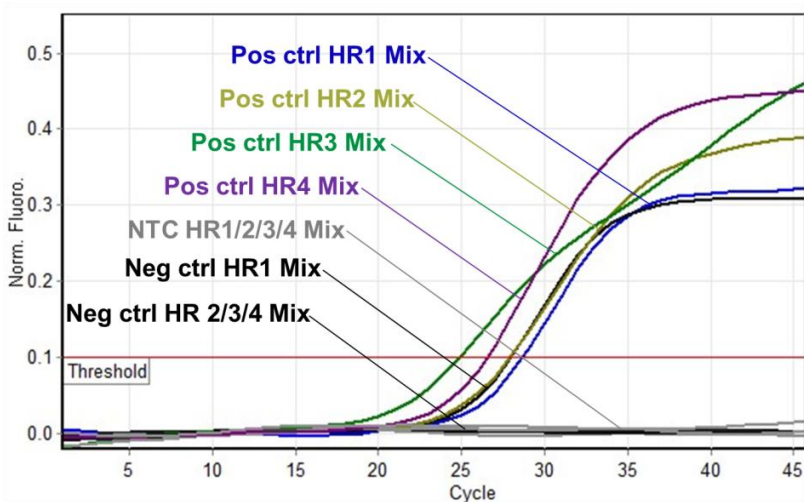
	Green	Yellow	Orange	Result
HR1 Mix	+	-	IC	Pos: HPV16
HR1 Mix	-	+	IC	Pos: HPV6 or 11
HR2 Mix	+	-	-	Pos: HPV 18
HR2 Mix	-	+	-	Pos HPV39
HR2 Mix	-	-	+	Pos: HPV59
HR3 Mix	+	-	-	Pos: HPV31 or 33
HR3 Mix	-	+	-	Pos: HPV52 or 58
HR3 Mix	-	-	+	Pos: HPV56 or 66
HR4 Mix	+	-	-	Pos: HPV35 or 45
HR4 Mix	-	+	-	Pos: HPV51
HR4 Mix	-	-	+	Pos: HPV68



شکل ۱. منحنی شاهدها در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. منحنی شاهدها در کانال زرد دستگاه روتورژن



شکل ۳. منحنی شاهدها در کانال نارنجی دستگاه روتورژن

۲۰. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای FAM آستانه (threshold) را روی ۱۰۰۰، برای VIC آستانه را روی ۱۰۰۰ و برای ROX آستانه را روی ۵۰۰ قرار دهید. برای مشاهده گراف مورد انتظار شاهدها و کنترل داخلی تصاویر ۴ تا ۶ را ملاحظه فرمایید. برای تفسیر نتایج ابتدا به جدول زیر توجه کنید. این جدول نشان می دهد که هر یک از میکس های ۱ تا ۴، در هر یک از کانال های فلورسانس کدام تایپ را تشخیص می دهند.

	FAM	VIC	ROX
HR1 Mix	16	6/11	Albumin
HR2 Mix	18	39	59
HR3 Mix	31/33	52/58	56/66
HR4 Mix	35/45	51	68

با توجه به جدول صفحه قبل، نتایج را این طور می توان تفسیر نمود:

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی و CT کمتر از ۴۰ باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود. همچنین CT بالاتر از ۴۰ نیز مثبت محسوب نمی شود.

همچنین، کنترل داخلی نمونه همیشه باید مثبت باشد یعنی نمونه باید با میکس ۱ در کانال ROX همواره مثبت و دارای CT بین ۲۰ تا ۳۰ باشد. در غیر اینصورت یعنی چنانچه نمونه با میکس ۱ در کانال ROX منفی باشد یا CT آن بالاتر از ۳۰ باشد، جواب نامعتبر است و آزمایش باید تکرار شود.

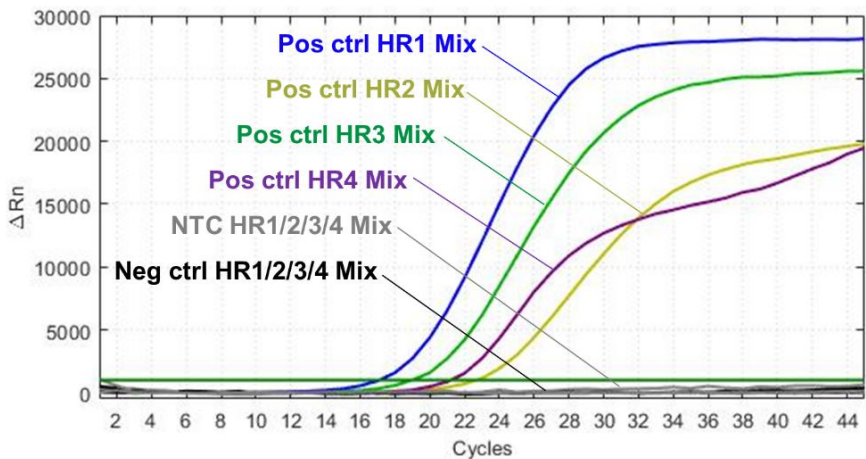
نتیجه منفی: در صورتیکه نمونه فقط در **کانال ROX** و با میکس ۱ مثبت باشد و در تمامی موارد دیگر منفی باشد، نمونه **منفی** می باشد.

نتیجه مثبت: در صورتیکه نمونه در کانال ROX با میکس ۱ با CT حدود ۲۰ تا ۳۰ مثبت باشد، آنگاه:

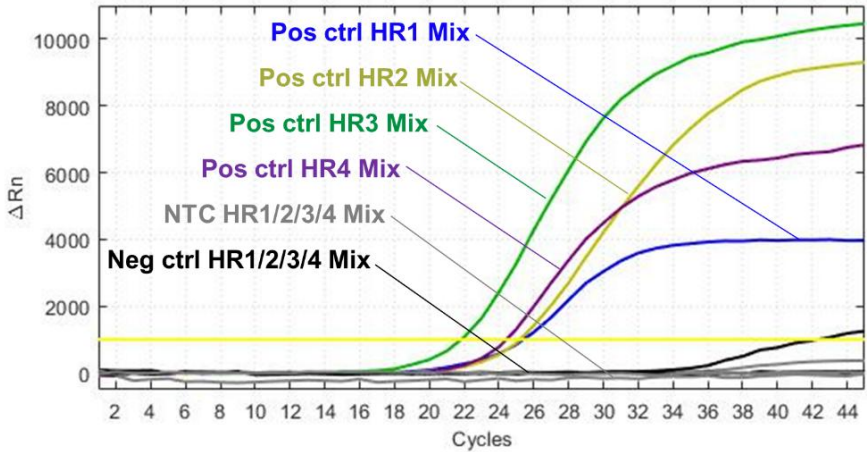
- در صورتی که نمونه در **کانال FAM** و با میکس ۱ مثبت باشد، برای **HPV16** مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال VIC** و با میکس ۱ مثبت باشد، برای **HPV6** یا **HPV11** مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال FAM** و با میکس ۲ مثبت باشد، برای **HPV18** مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال VIC** و با میکس ۲ مثبت باشد، برای **HPV39** مثبت می باشد.
- در صورتی که نمونه در **کانال ROX** و با میکس ۲ مثبت باشد، برای **HPV59** مثبت می باشد.

- در صورتی که نمونه در **کانال FAM** و با میکس ۳ مثبت باشد، برای **HPV31** یا **HPV33** مثبت می باشد.
 - در صورتی که نمونه در **کانال VIC** و با میکس ۳ مثبت باشد، برای **HPV52** یا **HPV58** مثبت می باشد.
 - در صورتی که نمونه در **کانال ROX** و با میکس ۳ مثبت باشد، برای **HPV56** یا **HPV66** مثبت می باشد.
 - در صورتی که نمونه در **کانال FAM** و با میکس ۴ مثبت باشد، برای **HPV35** یا **HPV45** مثبت می باشد.
 - در صورتی که نمونه در **کانال VIC** و با میکس ۴ مثبت باشد، برای **HPV51** مثبت می باشد.
 - در صورتی که نمونه در **کانال ROX** و با میکس ۴ مثبت باشد، برای **HPV68** مثبت می باشد.
- همچنین توضیحات بالا به صورت خلاصه در جدول صفحه بعد نشان داده شده اند:

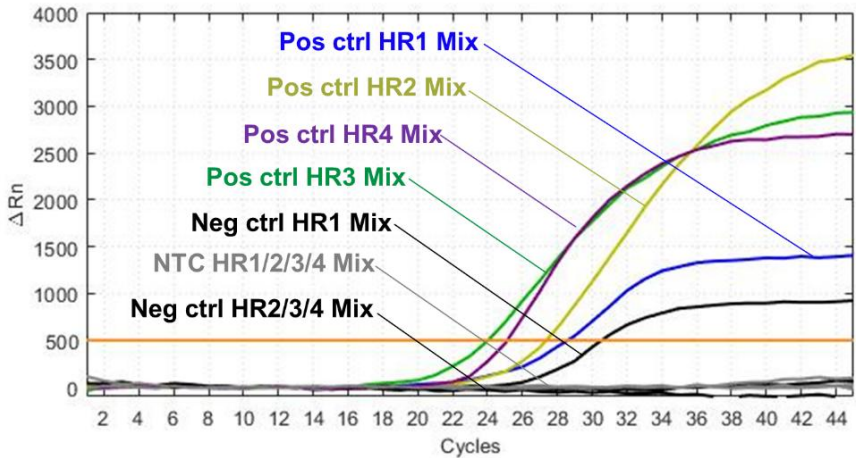
	Green	Yellow	Orange	Result
HR1 Mix	+	-	IC	Pos: HPV16
HR1 Mix	-	+	IC	Pos: HPV6 or 11
HR2 Mix	+	-	-	Pos: HPV 18
HR2 Mix	-	+	-	Pos HPV39
HR2 Mix	-	-	+	Pos: HPV59
HR3 Mix	+	-	-	Pos: HPV31 or 33
HR3 Mix	-	+	-	Pos: HPV52 or 58
HR3 Mix	-	-	+	Pos: HPV56 or 66
HR4 Mix	+	-	-	Pos: HPV35 or 45
HR4 Mix	-	+	-	Pos: HPV51
HR4 Mix	-	-	+	Pos: HPV68



شکل ۴. منحنی شاهدها در کانال FAM دستگاه استپ وان



شکل ۵. منحنی شاهدها در کانال VIC دستگاه استپ وان



شکل ۶. منحنی شاهدها در کانال ROX دستگاه استپ وان

۲۱. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم پاپیلوما ویروس انسانی تایپ ۱۶ بررسی شده و معادل ۵۰ کپی در میکرولیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیترو ویروس در نمونه بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیترو نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

۲۲. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی یا شیمیایی بوده و می توان آنها را مستقیماً به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه های عفونی آزمایشگاه را در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت حداقل یک شبانه روز قرار دهید و سپس آنها را به سطل زباله منتقل کنید.

۲۳. پشتیبانی فنی

برای ارتباط با بخش پشتیبانی فنی می توانید با شماره تلفن یا آدرس ایمیل زیر تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

۲۴. اطلاعات تماس

شرکت نوین ژن پارس ویرا

آدرس: تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶
تلفن تماس:

۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com

۲۵. منابع

- Crosbie, E.J., Einstein, M.H., Franceschi, S. and Kitchener, H.C., 2013. Human papillomavirus and cervical cancer. The Lancet, 382(9895), pp.889-899.
- Harden, M.E. and Munger, K., 2017. Human papillomavirus molecular biology. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 772, pp.3-12.
- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212 .
- Ramírez-Fort, M.K., Khan, F., Rady, P.L. and Tying, S.K. eds., 2014. Human Papillomavirus. Karger Medical and Scientific Publishers.

۲۶. توضیحات برچسب

دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید		تولید کننده		جهت مصارف پژوهشی	RUO
تاریخ انقضاء		تعداد <n> آزمون کافی		کدبهر (شماره بچ)	LOT
محدوده دمایی	 -30°C / -10°C	شماره سریال	SN	شماره کاتالوگ	REF

برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی
www.novingene.com مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.

HPV HR RQ3 Kit Manual

Autumn 2025, Version 2.1

For Real-Time PCR Detection of 14 High Risk and 2 Low Risk
Human Papilloma Virus (HPV) Types

For use with StepOne

For Research use only

 24 (Cat# HPVHR3RQ24)

 48 (Cat# HPVHR3RQ48)

 96 (Cat# HPVHR3RQ96)

 NG-WI-ASL-36-201

RUO



NovinGene ParsVira

No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

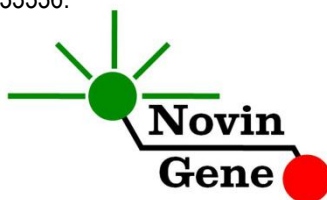


Table of Contents

1. Introduction.....	3
2. Intended Use	3
3. Background Information	3
4. Test Principle.....	3
5. Kit Contents.....	4
6. Packaging models	4
7. Storage and Stability	4
8. Product Use Limitations.....	4
9. Additionally Required Materials	5
10. General Precautions	5
11. Specimen, Storage and Transport	6
12. DNA Isolation.....	6
13. Internal Control (IC)	6
14. PCR Protocol	7
15. Programming Rotor-Gene.....	8
16. Devices and software.....	9
17. Programming StepOne	9
18. Programming Other Machines	10

19. Data Analysis: Rotor-Gene	10
20. Data Analysis: StepOne	14
21. Sensitivity.....	18
22. Disposal Method	18
23. Technical Support.....	18
24. Contact Information.....	19
25. References	19
26. Symbols	19

1. Introduction

HPV HR RQ3 kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting 14 High Risk Types and 2 Low Risk Types of HPV virus. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit. HPV HR1 Mix also contains a different series of primers and probes for the detection of a housekeeping gene such as Internal Control (IC). IC prevents false negative results due to failure in extraction.

This kit is intended for Research Use Only!

2. Intended Use

The HPV HR RQ3 kit is intended for detection of HPV DNA including 14 High Risk Types of 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68 and 2 Low Risk Types of 6 and 11. Detection is accomplished by polymerase chain reaction and is applicable with Rotor-Gene or StepOne machines.

3. Background Information

Human Papilloma Virus (HPV) is a non-enveloped double stranded DNA virus from papillomaviridae family. There are about 150 different types of HPV. HPV infection is considered the main cause of cervical cancer and has been linked to more than 99% of all cases. According to data linking HPV infection to cervical cancer, HPV types have been divided into three groups of High-Risk, Low-Risk and No-Risk. Currently 14 types of 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68 are considered High-Risk and 6 types considered Low-Risk including 6, 11, 42, 43, 44 and 53.

4. Test Principle

The pathogen is detected using PCR, where primers specific to the target genome amplify its unique sequence. Real-Time PCR

facilitates the detection of the amplified product through fluorescent-labeled probes. Therefore, monitoring fluorescence provides a means for detecting the target without requiring post-amplification analysis. This eliminates the possibility of PCR product contamination.

5. Kit Contents

The kit contains a manual, a flash card and the following reagents:

Label	Content	Quantity
HPV HR1 Mix	PCR Master mix*	480 µl
HPV HR2 Mix	PCR Master mix*	480 µl
HPV HR3 Mix	PCR Master mix*	480 µl
HPV HR4 Mix	PCR Master mix*	480 µl
Pos Ctrl	Positive Control	100 µl
Neg Ctrl	Negative Control	100 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits.

6. Packaging models

The kit is available in 24, 48, and 96 reactions of 25 microliters.

7. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiration date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws more than 3 times to prevent reduced sensitivity.

8. Product Use Limitations

- This kit is intended to be used only by specially instructed and trained personnel.

- The user manual should strictly be followed, and any modification will invalidate the results.
- The kit and its contents should not be used past the expiration date on the package.
- The kit and its contents should not be used if there is any sign of pink or red color on the Warm Mark label.
- This kit is for Research use only and is not validated for IVD (in vitro diagnostics) applications.

9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipettors and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

10. General Precautions

To prevent false results, always pay attention to the following points:

- **Treat all samples as potentially infectious.**
- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the master-mix is aliquoted into tubes, and c) Reaction preparation area for addition of extracted DNA to the tubes.

- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components on ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

11. Specimen, Storage and Transport

Pap-smear or collection of cervicovaginal cells can be used for DNA extraction. Sample should be shipped at +4°C and upon receipt should be stored at +4°C for a few hours or aliquoted and stored at -20°C for up to a few weeks.

12. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend the following:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

13. Internal Control (IC)

To examine DNA extraction quality as well as the presence of PCR inhibitors and to prevent false negative results, primers and probe for an *Internal Control* (a housekeeping gene) is included in HPV HR1 Mix. With a proper sample, successful DNA extraction and PCR, Internal control should generate a CT of 20-30. Refer to the analysis section for more details.

14. PCR Protocol

This kit contains 4 different PCR mixes, each for detection of 3 to 6 HPV types. Therefore, each sample should be examined with all 4 mixes.

First, thaw the reagents on ice completely followed by a brief mixing and a quick spin. Place 4 series of tubes on cold block. Each series should include one tube for each sample plus three for positive control, negative control and no template control (NTC).

For example, for examining 5 samples, 20 tubes for samples and 12 tubes for controls are required. So, a total of 32 tubes are arranged in 4 series of 8 tubes.

Pipette 20µl of HPV HR1 Mix to each of PCR tubes in the first series.

Pipette 20µl of HPV HR2 Mix to each of PCR tubes in the second series.

Pipette 20µl of HPV HR3 Mix to each of PCR tubes in the third series.

Pipette 20µl of HPV HR4 Mix to each of PCR tubes in the forth series.

Then add 5ul of extracted DNA, Pos Ctrl, Neg ctrl or water to each tube.

consider the first tube in each series for the first sample, second tube in each series for the second sample and continue respectively for the remaining samples or for the controls.

See Diagram 1 for details.

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are capped securely. Place tubes in the machine.

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

Note: If using RotorGene attach the locking ring.

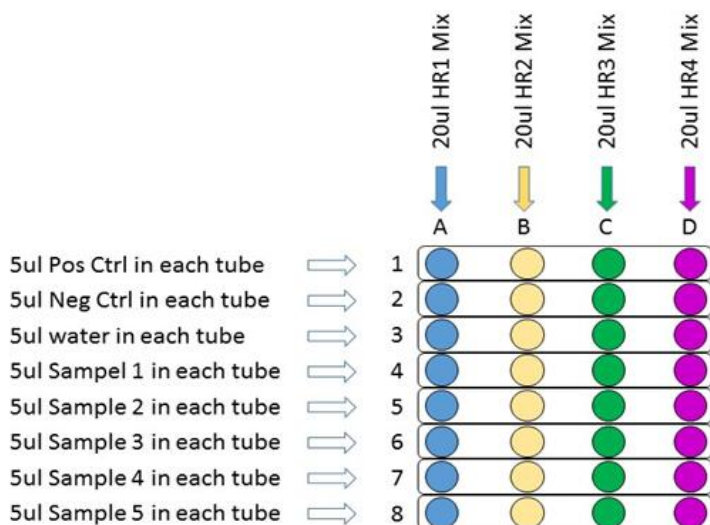


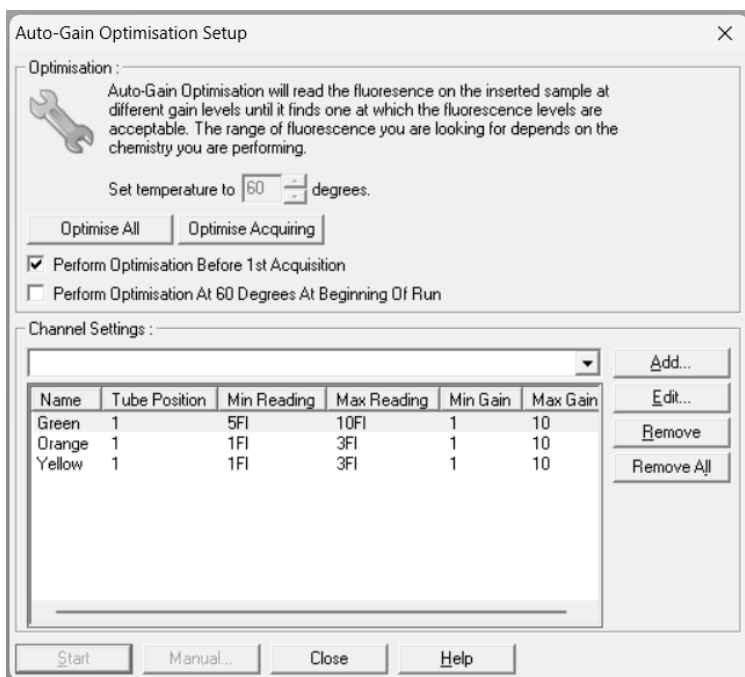
Diagram 1. Tubes setup for Mixes and samples.

15. Programming Rotor-Gene

Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the HPV HR RQ3 template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); HPV HR RQ3 0.1 is for strip tubes and HPV HR RQ3 0.2 is for 0.2ml tubes. Program starts.

Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation. Adjust the setting according to the below image. Make sure to set the Tube Position to number 1 for all channels (note that Tube number 1 should contain HPV HR1 Mix).



Click on the Start button (the Green button on the top menu). On the pop-up window, click Start again and save the program on desired location.

16. Devices and software

The HPV RQ3 kit is designed to work with Rotor-Gene and StepOne.

17. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set-Up menu, click Template (provided in the flash card, or accessible by kit QR code). Click on Plate Setup. Controls and few samples are defined. You may change plate set up using right click options (copy, paste, clear). You may also add/remove samples or change sample name

on “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment on desired location. Instrument will start shortly.

18. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 3 min	1 cycle
2	95°C x 15 sec	45 cycles
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM, VIC and ROX dyes.

Please note that HPV HR Mixes does not contain ROX dye as normalizer!

19. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure that in the sample menu, the Positive controls have been defined as “Positive control”. Patient samples are defined as “unknown” and Negative control or no template control as “Negative Control” or “NTC” respectively.

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on the Analysis menu and then under Quantitation tab double click on Cycling A. Green. Close the pop-up window for Automatic Threshold and set the threshold at 0.1.

Repeat the above for Cycling A. Yellow and Orange. Figures 1, 2 and 3 represent typical graphs for Rotor-Gene machine. To interpret the results, please, note the following table. It shows each of the 4 mixes, detects which of the HPV in each channel.

	Green	Yellow	Orange
HR1 Mix	16	6/11	Albumin
HR2 Mix	18	39	59
HR3 Mix	31/33	52/58	56/66
HR4 Mix	35/45	51	68

According to the above table, results can be interpreted as below:

Note that a sample is considered Positive only if it has a log phase and sigmoid graph with a CT less than 40. In the absence of log phase and a sigmoid graph and with a CT of above 40, sample cannot be considered as Positive.

Please note that, for a valid result, each sample should be positive in Orange channel with CT of 20-30. When a sample is Negative in Orange channel or has a CT above 30, results are not valid and test should be repeated.

Negative Result: A sample is **Negative** if it is **only** positive with **HR1 Mix** in **Orange** channel and remains negative for all other mixes-channels combinations.

Positive Result: If a sample is positive with HR1 Mix in **Orange** channel with CT of 20-30, then:

- It is **Positive for HPV16** if it is positive in **Green** channel with **HR1 Mix**.
- It is **Positive for HPV6 or 11** if it is positive in **Yellow** channel with **HR1 Mix**.
- It is **Positive for HPV18** if it is positive in **Green** channel with **HR2 Mix**.
- It is **Positive for HPV39** if it is positive in **Yellow** channel with **HR2 Mix**.

- It is **Positive for HPV59** if it is positive in **Orange** channel with **HR2 Mix**.
- It is **Positive for HPV31 or 33** if it is positive in **Green** channel with **HR3 Mix**.
- It is **Positive for HPV52 or 58** if it is positive in **Yellow** channel with **HR3 Mix**.
- It is **Positive for HPV56/66** if it is positive in **Orange** channel with **HR3 Mix**.
- It is **Positive for HPV35 or 45** if it is positive in **Green** channel with **HR4 Mix**.
- It is **Positive for HPV51** if it is positive in **Yellow** channel with **HR4 Mix**.
- It is **Positive for HPV68** if it is positive in **Orange** channel with **HR4 Mix**.

The above results are summarized in following Table 1:

	Green	Yellow	Orange	Result
HR1 Mix	+	-	IC	Pos: HPV16
HR1 Mix	-	+	IC	Pos: HPV6 or 11
HR2 Mix	+	-	-	Pos: HPV 18
HR2 Mix	-	+	-	Pos HPV39
HR2 Mix	-	-	+	Pos: HPV59
HR3 Mix	+	-	-	Pos: HPV31 or 33
HR3 Mix	-	+	-	Pos: HPV52 or 58
HR3 Mix	-	-	+	Pos: HPV56 or 66
HR4 Mix	+	-	-	Pos: HPV35 or 45
HR4 Mix	-	+	-	Pos: HPV51
HR4 Mix	-	-	+	Pos: HPV68

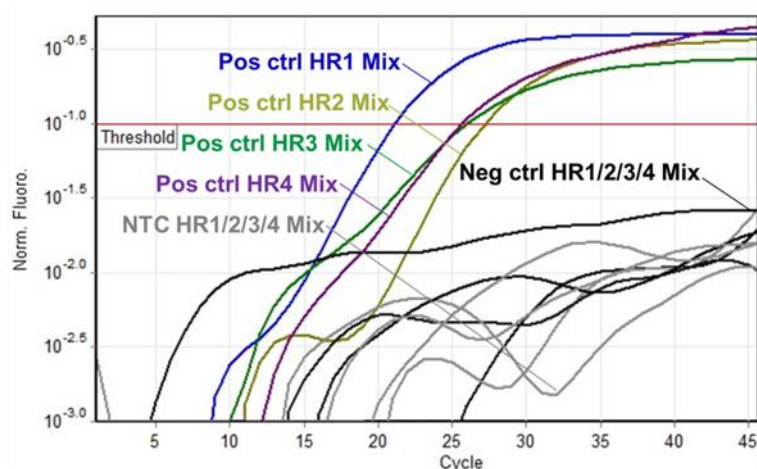


Fig 1. Typical HPV HR graph in Green channel for Rotor-Gene

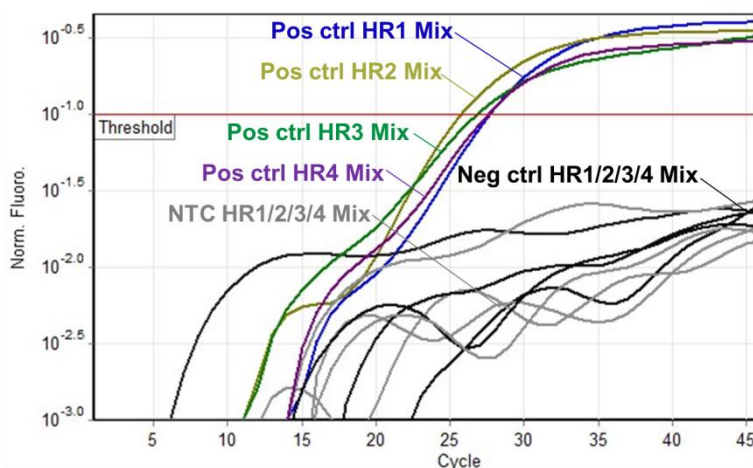


Fig 2. Typical HPV HR graph in Yellow channel for Rotor-Gene

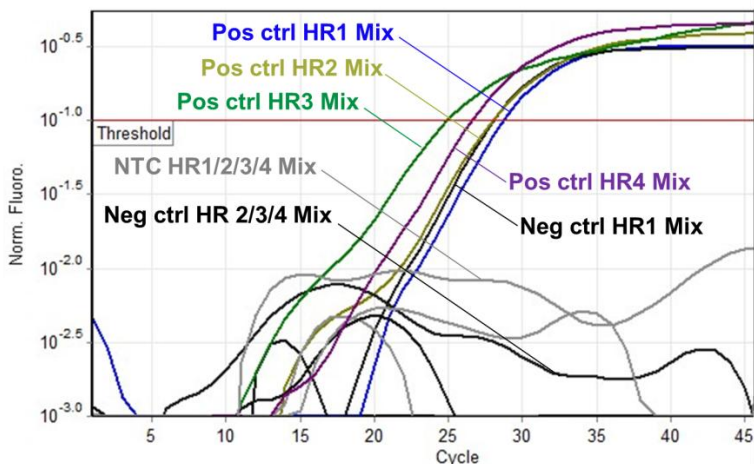


Fig 3. Typical HPV HR graph in Orange channel for Rotor-Gene

20. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on Analyze and set the threshold for FAM and VIC at 1000 and at 500 for ROX. To interpret the results, please, note the following table. It shows each of the 4 mixes, detects which of the HPV in each channel.

	FAM	VIC	ROX
HR1 Mix	16	6/11	Albumin
HR2 Mix	18	39	59
HR3 Mix	31/33	52/58	56/66
HR4 Mix	35/45	51	68

According to the above table, results can be interpreted as below:

Note that a sample is considered Positive only if it has a log phase and sigmoid graph with a CT less than 40. In the

absence of log phase and a sigmoid graph and with a CT of above 40, sample cannot be considered as Positive.

Please note that, for a valid result, each sample should be positive in ROX channel with CT of 20-30. When a sample is Negative in ROX channel or has a CT above 30, results are not valid, and test should be repeated.

Negative Result: A sample is **Negative** if it is **only** positive with **HR1 Mix** in **ROX** channel and remains negative for all other mixes-channels combinations.

Positive Result: If a sample is positive with HR1 Mix in **Orange** channel with CT of 20-30, then:

- It is **Positive for HPV16** if it is positive in **FAM** channel with **HR1 Mix**.
- It is **Positive for HPV6 or 11** if it is positive in **VIC** channel with **HR1 Mix**.
- It is **Positive for HPV18** if it is positive in **FAM** channel with **HR2 Mix**.
- It is **Positive for HPV39** if it is positive in **VIC** channel with **HR2 Mix**.
- It is **Positive for HPV59** if it is positive in **ROX** channel with **HR2 Mix**.
- It is **Positive for HPV31 or 33** if it is positive in **FAM** channel with **HR3 Mix**.
- It is **Positive for HPV52 or 58** if it is positive in **VIC** channel with **HR3 Mix**.
- It is **Positive for HPV56/66** if it is positive in **ROX** channel with **HR3 Mix**.
- It is **Positive for HPV35 or 45** if it is positive in **FAM** channel with **HR4**.

- It is **Positive for HPV51** if it is positive in **VIC** channel with **HR4 Mix**.
- It is **Positive for HPV68** if it is positive in **ROX** channel with **HR4 Mix**.

The above results are summarized in following Table:

	FAM	VIC	ROX	Result
HR1 Mix	+	-	IC	Pos: HPV16
HR1 Mix	-	+	IC	Pos: HPV6 or 11
HR2 Mix	+	-	-	Pos: HPV 18
HR2 Mix	-	+	-	Pos HPV39
HR2 Mix	-	-	+	Pos: HPV59
HR3 Mix	+	-	-	Pos: HPV31 or 33
HR3 Mix	-	+	-	Pos: HPV52 or 58
HR3 Mix	-	-	+	Pos: HPV56 or 66
HR4 Mix	+	-	-	Pos: HPV35 or 45
HR4 Mix	-	+	-	Pos: HPV51
HR4 Mix	-	-	+	Pos: HPV68

Figures 4, 5 and 6 represent typical graphs for StepOne machine.

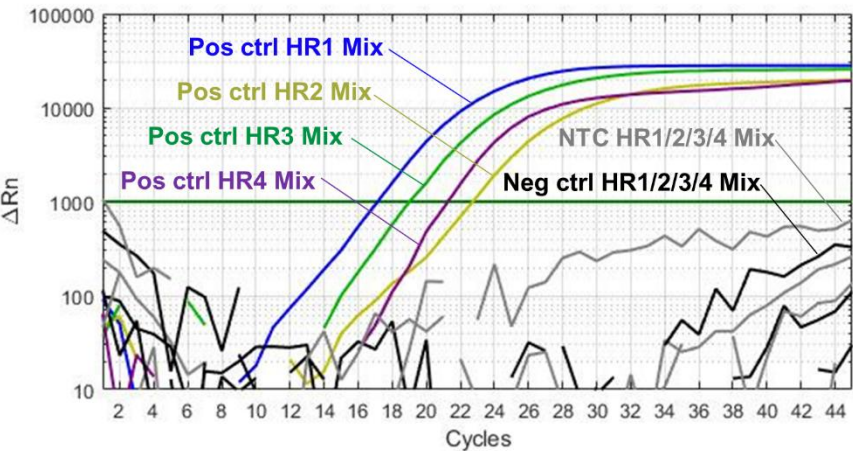


Fig 4. Typical HPV HR graph in FAM channel for StepOne

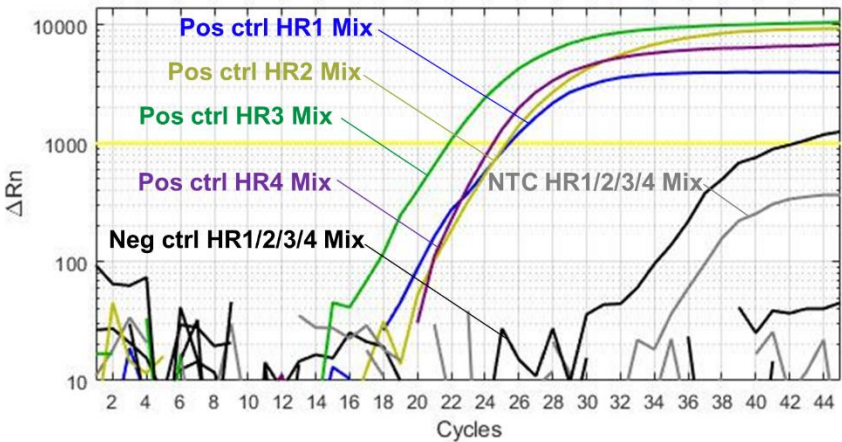


Fig 5. Typical HPV HR graph in VIC channel for StepOne

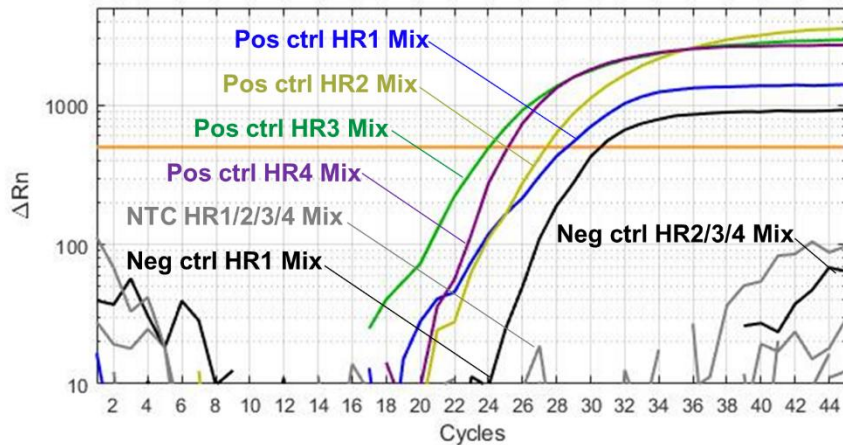


Fig 6. Typical HPV HR graph in ROX channel for StepOne

21. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the cloned HPV 16 target and the detection limit was determined as 50 copies/ μ l.

22. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special treatment before disposal and can be directly discarded. Infectious specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

23. Technical Support

For technical support, contact us via

Phone: +98 993-6223241

Email: info@novingene.com

24. Contact Information

NovinGene ParsVira

Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

Tel: +98 21 88837393

+98-990 11813124






Email: info@novingene.com

Website: www.novingene.com

25. References

- Crosbie, E.J., Einstein, M.H., Franceschi, S. and Kitchener, H.C., 2013. Human papillomavirus and cervical cancer. The Lancet, 382(9895), pp.889-899.
- Harden, M.E. and Munger, K., 2017. Human papillomavirus molecular biology. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 772, pp.3-12.
- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212 .
- Ramírez-Fort, M.K., Khan, F., Rady, P.L. and Tyring, S.K. eds., 2014. Human Papillomavirus. Karger Medical and Scientific Publishers.

26. Symbols

RUO Research use only	 Manufacturer	 Consult instructions for use
LOT Lot number	 Content sufficient for <n> tests	 Use-by date
REF Catalogue number	SN Serial number	 Temperature limit

For more information and resources please visit our website; www.novingene.com

