کیت RT-PCR کیفی تک مرحله ای، تشخیص فیوژن t(15;17) PML-RARA

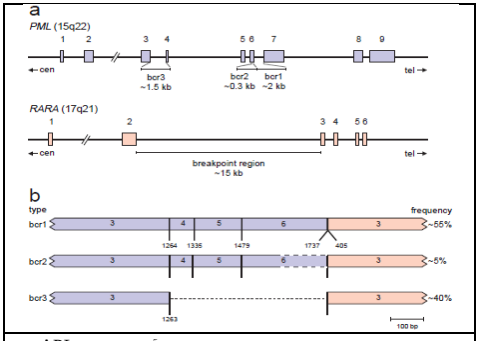
Ref: APPMLK1
(Investigation use only, IUO)

مقدمه:

t(15;17) با لو سمی پرومیلو سیتی حاد (APL) در ارتباط ا ست، یک زیر مجموعه متمایز AML با سیتومورفولوژی M3، که یک زیر گروه بالقوه بسیار خطرناک با احتمال مرگ و میر بالای میلوئیدی لوسمی حاد به علت اختلال انعقادی شدید است. دقت و سرعت در تشخیص از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است که با شروع به موقع درمان های کارآمد که می توانند APL را از حالت بسیار خطرناک با احتمال مرگ و میر بالا به یک لوسمی بسیار قابل درمان تبدیل کنند. بسته به اینکه شکست نقطه ای در PML ، در اینترون ۶ ، اگزون ۶ و یا اینترون ۳ اتفاق افتاده باشد ممکن است به ترتیب زیرگروه‌های رونویسی PML-RARa شامل سه ایزوفرم تولید شود (شکل ۱).

کیت RT-PCR کیفی تک مرحله‌ای PML-RARA شرکت توسعه و پژوهش امیرپیو ند می توا ند ت مامی ۳ نوع فیوژن از جم له ایزوفرم های (PML- bcr1 (RARalpha L or Long) / bcr2 (PML- RARalpha V or Variant) / bcr3 (PML- RARalpha S or short) را تشخیص دهد (٪۱۰۰ اختصاصی) . که به ترتیب ۵۵-۵۰٪ ، ۱۰-۵٪ و ۴۰-۳۰٪ موارد ابتلا را نشان می دهند.

این روش به طور مستقیم روی ۵۰۰-۱۰۰ نانوگرم RNA کار می کند، نیاز به کار چند مرحله ندارد، موجب کاهش خطر آلودگی و خطا می‌شود.



شکل ۱: انواع مختلف رونوشت های فیوژن و توالی آنها در بیماران APL

این کیت تنها برای مقاصد تحقیقاتی (IUO) برای تشخیص کیفی bcr1, bcr2 و bcr3 در فیوژن رونو شت *PML-RARA* در بیماران مبتلا به AML-M3 (هر دو نوع کلا سیک یا Hypergranular و Microgranular ویا Variant) تهیه شده است.

اصول انجام آزمایش:

شرکت توسعه و پژوهش امیرپیوند این کیت را برای تشخیص دقیق جابجایی بین کروموزوم ۱۵ و ۱۷ [t(15;17)] یا نسخه های فیوژن *PML-RARA* در خون محیطی یا آسپیره مغز استخوان بیماران مشکوک به ابتلا بهAML-M3 نوع کلاسیک یا واریانت ارائه داده است.

تمام RNA ها در زمان تشخیص از خون بیمار یا مغز استخوان استخراج شده و mRNA به صورت معکوس در cDNA رونویسی می شود و همزمان تحت PCR در واکنش تک مرحله‌ای TAQMAN در همان لوله قرار می گیرد. گزارش‌دهی نتایج به صورت کیفی خواهد بود؛

- mRNA PML-RARA مثبت: تشخیص داده شده است.
- mRNA PML-RARA منفی: تشخیص داده نشده است.

محتویات کیت:

شماره	محتویات	مقدار
۱	**مسترمیکس برای** bcr1 type (درب زرد)	۱۵۰ µl
	مسترمیکس برای bcr2 type (درب صورتی)	۱۵۰ µl
	مسترمیکس برای bcr3 type (درب سبز)	۱۵۰ µl
۲	**کنترل مثبت** t(15;17) *PML-RARA*	۱۵ µl
۳	**کنترل منفی** t(15;17) *PML-RARA*	۱۵ µl

مواد و ابزار مورد نیاز:

- هر نوع دستگاه بررسی و تایید شده PCR در زمان واقعی با کانال سبز (FAM) و زرد (JOE، VIC، HEX).
- کیت استخراج RNA (در این کیت ارائه نشده است)
- ظروف پلاستیکی از جمله سرسمپلر
- میکروتوپ های آزاد DNase / RNase ، ۰.۲ ملی لیتر.

انباشت ، نگهداری و انتقال کیت:

محتویات کیت را در دمای(۲۰±۵ □-) تا تاریخ انقضا درج شده بر روی بسته بندی کیت نگهداری و حمل کنید. از انجماد و ذوب مکرر اجزاء کیت، که می‌تواند منجر به کاهش کیفیت تشخیصی کیت گردد پرهیز نمایید.

نوع نمونه:

۵ میلی لیتر خون کامل و یا ۳ میلی لیتر آسپیره مغز استخوان را در لوله های (EDTA) جمع آوری کنید (حداقل: ۱ میلی لیتر خون کامل یا ۱ میلی لیتر مغز استخوان قابل قبول است).

- **به دلیل حفظ ثبات RNA ، می‌بایست نمونه ها ظرف مدت ۲۴ ساعت پس از جمع آوری، استخراج شوند.**

آماده سازی بیمار: هیچگونه آماده سازی مورد نیاز نیست، تنها می‌بایست نمونه، پیش از شروع هر گونه درمان جمع آوری گردد. اگر بیمار هرگونه داروی TKI دریافت می کند می‌بایست آزمایشگاه بالینی از آن مطلع گردد.

دمای نگهداری / انتقال: دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد (یخچال)

ثبات نمونه:

- در دمای محیط یا اتاق: ۱ ساعت
- درون یخچال (۲-۸ درجه سانتیگراد): ۲۴ ساعت

شرایط عدم پذیرش نمونه:

- سرم یا پلاسما
- نمونه های جمع آوری شده در لوله ضد انعقادی غیر از EDTA.
- نمونه های به شدت همولیز شده.
- نمونه های منجمد یا لخته شده

شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند

ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

021-26422362

Co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com

AP-RAD
شرکت پژوهش و توسعه امیر پیوند

موارد احتیاطی عمومی:

۱. کیفیت نمونه RNA از اهمیت بالایی برخوردار است و می‌تواند نتایج آزمایش را تحت تأثیر قرار دهد. به منظور به حداقل رساندن تخریب RNA توسط ریبونوکلئاز، توصیه می‌شود بلافاصله پس از جمع آوری نمونه، استخراج RNA آغاز گردد. هنگام کار با RNA، به منظور پیشگیری از آلودگی ریبونوکلئاز از طریق دست، همیشه از دستکش استفاده کنید.

۲. RT-PCR روش بسیار حساسی است. بنابراین، می‌بایست جهت جلوگیری از دریافت نتایج مثبت کاذب ناشی از آلودگی با RNA، cDNA یا سایر محصولات PCR، اقدامات احتیاطی انجام گیرد. مجموعه ای از میکروپیپت‌ها، سرسمپلرهای دارای فیلتر آئروسل، دستکش یکبار مصرف و روپوش آزمایشگاهی تمیز باید در آزمایشگاه در دسترس باشد.

۳. تعویض دستکش‌ها هنگام دست زدن به میکروتیوب‌های حاوی RNA یا cDNA ،امری ضروری است. پس از انجام PCR باید میکروتیوب ها با احتیاط باز شوند تا از ریختن محصولاتی که تکثیر یافته اند جلوگیری شود.

ایمنی:

- پیش از انجام آزمایش، دستورالعمل را به صورت کامل مطالعه کنید.
- قبل از انجام آزمایش از ضدعفونی بودن محل انجام تست اطمینان حاصل کنید.
- تمامی نمونه‌ها را عفونی در نظر بگیرید.
- در تمام مراحل انجام آزمایش، از محافظ چشم و دستکش‌های یکبار مصرف استفاده کنید.

شناسه‌های فنی:

توالی هدف: فیوژن رونوشت *PML-RARA* حاصل از جابه‌جایی بین کروموزوم ۱۵ و ۱۷

اختصاصیت: این کیت به طور انحصاری قادر به تشخیص انواع متداول و ایزوفرم‌های (bcr1, bcr2 و bcr3) رونوشت‌های فیوژن *PML-RARA* در AML-M3 است. ده مورد AML-M3 (شامل انواع کلاسیک و واریانت) با استفاده از تشخیص کیفی فیوژن *PML-RARA* ، با روش RT-PCR یک مرحله‌ای در مقایسه با کانونشنال RT-PCR و تطبیق ۱۰۰٪ نتایج حاصل می‌شود. ده نمونه طبیعی و ده نمونه Non-AML M3 با استفاده از این روش مورد بررسی قرار گرفت و هیچ واکنش مثبت کاذب مشاهده نشد.

حساسیت: آزمایش رقت کنترل مثبت پلاسمید با فیوژن bcr1 با قابلیت تشخیص تا ۰/۰۱ copy/ µl نشان‌دهنده حساسیت بالا حتی در بیماران با رونویسی فیوژن RNA کم وجود دارد ، به ویژه در بیمارانی که درمان شده است، طبیعی است.

کنترل کیفیت: در این آزمایش، NAGK (N-acetylglucosamine kinase) به عنوان یک کنترل داخلی یا تکثیر ژن در همان لوله انجام خواهد شد و باید موجب افزایش در هر لوله‌ای به جز NTC در کانال زرد شود.

تخلیص اسید نوکلئیک:

RNA را می توان به طور مستقیم از نمونه خون محیطی جمع‌آوری شده در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA و یا آ سپیره مغز ا ستخوان به و سیله کیت‌های ا ستخراج RNA معتبر و یا روش های دستی استخراج کرد. بافی کت و گرانولوسیت‌ها را میتوان مورد استفاده قرار داد. کیفیت RNA استخراج شده می‌بایست خوب باشد و با استفاده از بیوفوتومتر یا نانودراپ بررسی شود.

TaqMan تک مرحله‌ای مبتنی بر روش RT-PCR کیفی:

RT-PCR یک مرحله‌ای به روش زیر انجام می شود.

۱. به ترتیب میکروتیوب‌های آماده استفاده را به صورت دوتایی برای هر بیمار و به صورت تکی برای کنترل مثبت، کنترل منفی و بدون الگو (NTC) مرتب و برچسب‌گذاری کنید.

توجه: *برای دستیابی به نتایج قابل اعتماد و دقیق ، تاکید بر تکرار انجام دو PCR برای هر بیمار می‌شود.*

۲. تمام میکرو تیوب ها را برروی رک سرد قرار دهید.

۳. ۱۸ µl مسترمیکس به تمامی میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.

۴. ۲ µl آب مقطر استریل به میکروتیوب NTC اضافه کنید.

۵. ۲ µl کنترل منفی به لوله دارای برچسب کنترل منفی، اضافه کنید.

۶. ۲ µl از RNA بیمار را به دو میکروتیوبی که نام بیمار بر روی آن نوشته شده است اضافه کنید.

۷. ۲ µl کنترل مثبت به میکروتیوب دارای برچسب کنترل مثبت، اضافه کنید.

۸. مواد را با یکدیگر مخلوط کرده و برای مدت زمان کوتاهی اسپین کنید.

۹. سپس آن را در د ستگاه Real Time PCR قرار دهید و برنامه را همانگونه که در برنامه واکنش حرارتی ذکر شده است اجرا کنید.

پروفایل واکنش حرارتی:

	cycles	Time	Temperature
Reverse transcription, RT	50 ºC	10 min	**1**
Initial activation	95 ºC	3 min	**1**
Denaturation	95 ºC	10 sec	**45**
Annealing/extension	60 ºC	30 sec*	

* FAM برای *PML-RARA* ، JOE برای NAGK (کنترل داخلی) تنظیم شود.

Run Settings	
Name	**Gain**
Green **(PML-RARA)**	5.33
Yellow **(NAGK or internal control)**	9.33

تجزیه و تحلیل داده ها و گزارش:

نتایج با استفاده از نرم افزار دستگاه‌های Real Time PCR با مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت که از خط Threshold(آستانه) عبور میکند و مطابق دستورالعمل-های دستگاه تفسیر می شود.

- مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت در کانال زرد که از خط آستانه کنترل داخلی (cDNA NAGK) عبور می کند باید در تمامی لوله‌ها نمایان شود (ct:20-30) به جز لوله NTC، و نشان دهد که RT و واکنش PCR به درستی انجام شده اند، در غیر اینصورت واکنش باید تکرار شود.
- در لوله کنترل مثبت (برای همه انواع bcr)، مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت در کانال سبز که از خط آستانه عبور می کند (ct: 20-30) به این معنی است که کنترل مثبت خوب است.
- در لوله های بیمار(برای همه انواع bcr)، مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت در کانال سبز (ct: 20-35) که از خط آستانه عبور می کند به این معنی است که نتیجه مثبت است و باید به صورت زیر و مطابق جدول گزارش شود:

Patient's Positive sets	bcr1 + bcr2 + bcr3	bcr2 + bcr3	bcr3
Interpretation	PML-RARA L or Long	PML-RARA V or Variant*	PML-RARA S or Short

***PML-RARA* Fusion Transcripts detected**

شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند

ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

021-26422362

Co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com

- در لوله های بیمار، مشاهده سیگنال فلورسنت در کانال سبز به صورت خط صاف و یا عدم عبور از خط آستانه (or Ct>40) به این معنی است که نتیجه منفی است و باید به صورت زیر گزارش شود:

***PML-RARA* Fusion Transcripts not detected**

- در صورت وجود هر گونه افزایش فلورسنت در لوله NTC در هر دو کانال سبز و زرد می‌بایست آزمایش تکرار شده و مشکوک به بروز آلودگی است.
- در صورت وجود هر گونه افزایش فلورسنت در کنترل نرمال در کانال سبز، می‌بایست آزمایش تکرار شده و مشکوک به بروز آلودگی است.

نکات مورد توجه:

می‌بایست به تمام یافته های بالینی، داده های آزمایشگاهی، پارامترهای هماتولوژی نظیر CBC ، مورفولوژی و فلوسایتومتری در تفسیر و اتخاذ تصمیم توجه شود.

محدودیت ها:

- نمونه های BM به دلیل داشتن بالاترین حساسیت، ترجیح داده می شوند.
- عملکرد ضعیف RNA منجر به دریافت نتیجه منفی کاذب، بیشتر در نمونه خون محیطی، خواهد شد.
- جابجایی های مربوط به ژن های دیگر یا سایر ژن‌های مرتبط شناسایی نمی شوند.

دفع ضایعات:

- برای دفع ضایعات به قوانین مصوب وزارت بهداشت توجه کنید.
- در صورتی که ضایعات منشا انسانی یا حیوانی داشته باشند به عنوان مواد خطرناک زیستی شناخته شده و باید با احتیاط دفع گردند. در هنگام استفاده و یا دفع نمونه ها از اقدامات احتیاطی عمومی استفاده کنید.

علائم و توضیحات	
سری ساخت	LOT
شماره رفرنس	REF
تاریخ تولید	
تاریخ انقضا	
مطالعه بروشور	
استفاده در موارد تشخیصی و بالینی	IVD
استفاده در موارد تحقیقاتی	IUO
شرایط نگهداری	
آدرس شرکت	

جهت ارتباط با واحد پشتیبانی با شماره ۲۶۴۲۲۹۴۰-۰۲۱ تماس بگیرید.

شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند

ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

021-26422362

Co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com