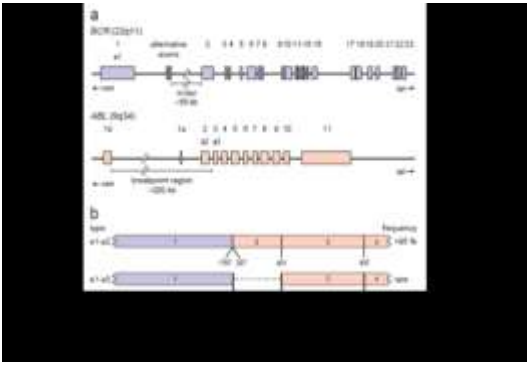
نام کیت: کیت **RT-PCR** کیفی یک مرحله‌ای، تشخیص فیوژن ***BCR-ABL*^{p190}**

Reference: APBCRP1K1

زمینه و اصول:

کروموزوم فیلادلفیا (Ph)، علاوه بر اینکه مشخصه CML است ، تقریباً در ۵ ٪ از کودکان مبتلا به ALL و در ۵۰-۲۰٪ از افراد بالغ مبتلا به ALL به تدریج با افزایش سن مشاهده می‌شود.

در حقیقت، در حالی که تقریبا در ۴۰٪ Ph+ ALL چینش مولکولی مشابه CML را نشان می‌دهد ، در ۶۰٪ باقیمانده موارد Ph+ ALL جابه‌جایی نوکلوئوتیدی BCR در مناطق به اصطلاح "منطقه گروهی نقطه انفصال جزئی" (m-bcr) بین دو اگزون جایگزین و اگزون ۲ (شکل ۱a) مشاهده می‌شود. تقریبا تمام نقاط انفصال در ژن ABL در منطقه اینترون بزرگ (| ۲۰۰ کیلوبایت) بین اگزون ABL ، ۱b و اگزون ۲ واقع شده است (همچنین به آن اگزون a۲ نیز گفته می شود). در اثر شکست های نقطه ای در m-bcr ، تنها اولین اگزون ژن BCR (که به آن اگزون e۱ نیز گفته می شود) به اگزون ۲ ABL (اتصال e۱-a۲) متصل می‌شود (شکل ۱b). این اتفاق منجر به تولید پروتئین BCR-ABL با وزن مولکولی ۱۹۰ کیلو دالتون (p۱۹۰ BCR/ABL) می شود. اگرچه رونوشت e۱-a۲ عمدتا با ALL همراه است، موارد پراکنده CML که فقط این نوع رونوشت را دارند نیز گزارش شده است.



این کیت تنها برای مقاصد تحقیقاتی (IUO) برای تشخیص کیفی فیوژن BCR-ABLp۱۹۰ در ALL و موارد نادر CML تهیه شده است.

اصول انجام آزمایش:

شرکت توسعه و پژوهش امیرپیوند این کیت را برای تشخیص دقیق جابجایی بین کروموزوم ۹ و ۲۲ [t(۹;۲۲)] یا نسخه های فیوژن BCR-ABLp۱۹۰ در خون محیطی یا آسپیره مغز استخوان بیماران مشکوک به ابتلا به CML یا BP-ALL 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. گزارش-دهی نتایج به صورت کیفی خواهد بود؛
- mRNA ژن BCR-ABLp۱۹۰ مثبت / شناسایی شده است
- منفی / مشاهده نشده است.

محتویات کیت:

شماره	محتویات	مقدار
۱	۲۴ میکروتیوب آماده برای استفاده برای RT-PCR تک مرحله ای	۱۸ µl
۲	کنترل مثبت *BCR-ABL*^{p190}	۱۵ µl
۳	کنترل منفی	۱۵ µl

مواد و ابزار مورد نیاز:

- هر نوع دستگاه بررسی و تایید شده PCR در زمان واقعی با کانال سبز (FAM) و زرد (HEX ،VIC JOE).
- 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:

- این کیت را می‌توان در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا تاریخ انقضا ذکر شده بر روی بسته بندی کیت نگهداری کرد. از انجماد و

تهران - خیابان شریعتی- خیابان شهید دستگردی (ظفر) - بعد از خیابان شمس تبریزی- ساختمان بهاران - پلاک ۱۴۸ - واحد ۱

۰۲۱-۲۶۴۲۲۳۶۲

Co.ap-rad.com

order@co.ap.com

دفریز مکرر اجزاء کیت، که می‌تواند موجب کاهش کیفیت تشخیصی کیت شود ، بپرهیزید.

- توصیه می‌شود این کیت در درجه حرارت کم تر از ۲۰- درجه سانتیگراد حمل شود. بهترین شرایط نگهداری کیت در دمای استاندارد است. (۲۰- درجه سانتی‌گراد + ۵ درجه سانتی‌گراد)

نوع نمونه:

- ۵ میلی لیتر از خون کامل و یا ۳ میلی لیتر آسپیره مغز استخوان را در لوله ((EDTAجمع آوری کنید (حداقل: ۱ میلی لیتر خون کامل یا ۱ میلی لیتر مغز استخوان مورد قبول است).
- به دلیل حفظ ثبات RNA ، می بایست نمونه ظرف مدت ۲۴ ساعت پس از جمع آوری، استخراج شود.

آماده سازی بیمار:

هیچگونه آماده سازی مورد نیاز نیست، اما می‌بایست نمونه قبل از شروع هر گونه درمان جمع آوری گردد. می‌بایست آزمایشگاه از دریافت هر گونه درمان TKI مطلع گردد.

انباشت ، نگهداری و انتقال نمونه:

درون یخچال

ثبات نمونه:

- در دمای اتاق: ۱ ساعت
- در یخچال (۲-۸ درجه سانتیگراد): ۲۴ ساعت
- منجمد: غیرقابل پذیرش است

شرایط عدم پذیرش نمونه:

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

هشدارها

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

۲. RT-PCR روشی بسیار حساس است. بنابراین، می‌بایست اقدامات احتیاطی جهت جلوگیری از دریافت نتایج مثبت کاذب ناشی از آلودگی با محصولات RNA، cDNA یا سایر محصولات PCR از سایر نمونه ها انجام شود. مجموعه ای از میکروپیپت‌ها، سر سمپلرهایی با توانایی جلوگیری از پخش آئروسل، دستکش یکبار مصرف و روپوش آزمایشگاهی تمیز باید در تمامی شرایط در آزمایشگاه در دسترس بوده و مورد استفاده قرار گیرد . شیوه انجام کار می‌بایست به گونه‌ای سازماندهی گردد که مخلوط و محصولات فقط در جهت اتاق Master Mix به اتاق cDNA ، به اتاق PCR و سپس به اتاق الکتروفورز حرکت کند. هرگز مخلوط یا محصولات واکنش را در جهتی خلاف آن چه ذکر شد حرکت ندهید.

۳. تمامی سطوح و تجهیزات آزمایشگاه و همچنین پیپت ها و روپوش‌های آزمایشگاهی باید به طور منظم تمیز شوند.

۴. استفاده از سر سمپلرهایی با توانایی جلوگیری از پخش آئروسل در طی انجام تمامی پروسه اکیدا توصیه می شود. بسیار مهم است که هنگام حمل لوله‌های حاوی RNA یا DNA، دستکش‌ها را تعویض کنید. پس از انجام PCR، می‌بایست به منظور اجتناب از تخریب قطعات DNA در تعداد بالا درب لوله‌ها با احتیاط باز شود.

ایمنی:

- قبل از انجام آزمایش دستورالعمل را به صورت کامل خوانده و از فهمیدن تمامی مراحل اطمینان حاصل کنید.
- در تمامی طول زمان انجام آزمایش روشهای معمول آسپتیک را در نظر داشته باشید.
- تمامی نمونه‌ها را عفونی در نظر بگیرید.
- در تمام مراحل آزمایش، از محافظ چشم و دستکش‌های یکبار مصرف استفاده کنید.

شناسه‌های فنی:

توالی هدف: رونوشت فیوژن BCR-ABLp۱۹۰ حاصل از جابه‌جایی بین کروموزوم ۹ و ۲۲

تهران - خیابان شریعتی- خیابان شهید دستگردی (ظفر) - بعد از خیابان شمس تبریزی- ساختمان بهاران - پلاک ۱۴۸ - واحد ۱

۰۲۱-۲۶۴۲۲۳۶۲

Co.ap-rad.com

order@co.ap.com

ویژگی ها:

این کیت به طور انحصاری قادر به تشخیص رونوشتهای فیوژن BCR-ABLp۱۹۰ در ALL و CML است. پنج مورد ALL با استفاده از تشخیص کیفی فیوژن BCR-ABLp۱۹۰ ، با روش RT-PCR یک مرحله‌ای در مقایسه با Conventional RT-PCR و تطبیق ۱۰۰٪ نتایج حاصل می‌شود. ده نمونه طبیعی و ده نمونه CML دارای BCR-ABLp۱۹۰ t(۹;۲۲) با استفاده از این روش مورد بررسی قرار گرفت و هیچ واکنش مثبت کاذب مشاهده نشد.

حساسیت:

آزمایش رقت کنترل مثبت پلاسمید با فیوژن BCR-ABL p۱۹۰ با قابلیت تشخیص تا ۰،۵۶ نشان‌دهنده حساسیت بالا حتی در بیماران با رونویسی فیوژن RNA کم وجود دارد ، به ویژه در بیمارانی که درمان شده‌اند، 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 آسپیره مغز استخوان به وسیله کیت‌های استخراج RNA معتبر و یا روش های Homebrew ، استخراج کرد. بافی کت و گرانولوسیت‌ها می توانند مورد استفاده قرار گیرند. کیفیت RNA استخراج شده می‌بایست خوب باشد (با توجه به غلظت و خلوص، ۲،۰ – ۱،۸ :OD۲۶۰/۲۸۰) و با استفاده از بیوفوتومتر یا نانو قطره بررسی می‌شود.

TaqMan تک مرحله‌ای مبتنی برروش RT-PCR

کیفی:

RT-PCR تک مرحله‌ای به روش زیر انجام می شود:

۱. میکروتیوب‌های آماده برای استفاده را به صورت جفت برای بیمار و به صورت تکی برای کنترل مثبت، کنترل منفی و بدون الگو (NTC) به ترتیب مرتب و برچسب‌گذاری کنید.
توجه: برای دستیابی به نتایج قابل اعتماد و دقیق ، تاکید برتکرار انجام PCR برای هر بیمار می‌شود.
۲. تمام میکرو تیوب ها را در رک سرد قرار دهید.
۳. ۲ µl آب مقطر استریل به لوله علامت‌گذاری شده NTC اضافه کنید.
۴. ۲ µl کنترل منفی به لوله دارای برچسب اضافه کنید.
۵. ۲ µl از RNA بیمار را به لوله‌های تکرار علامت گذاری شده اضافه کنید.
۶. ۲ µl کنترل مثبت به لوله دارای برچسب اضافه کنید.
۷. مواد را با یکدیگر مخلوط کرده و برای مدت زمان کوتاهی بچرخانید.
۸. سپس آن را در دستگاه RT-PCR قرار دهید و با توجه به دستورالعمل ذکر شده در برنامه واکنش حرارتی عمل کنید.

پروفایل واکنش حرارتی

	دما	زمان	چرخه
رونویسی معکوس RT	۵۰°C	۱۰ دقیقه	۱
فعال سازی اولیه	۹۵°C	۳ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۵°C	۱۰ ثانیه	۴۵
انیلینگ/گسترش	۶۰°C	۳۰ ثانیه	

Run Settings	
Name	Gain
Green	٤
Yellow	٩

تجزیه و تحلیل داده ها و گزارش:

نتایج با استفاده از نرم افزار دستگاه‌های Real Time PCR با مشاهده منحنی فلورسانس با خط ترشلد (آستانه) و مطابق دستورالعمل‌های دستگاه تفسیر می شود.

- مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت در کانال زرد و عبور از خط ترشلد (آستانه) cDNA NAGK (کنترل داخلی)با شناسایی

تهران - خیابان شریعتی- خیابان شهید دستگردی (ظفر) - بعد از خیابان شمس تبریزی- ساختمان بهاران - پلاک ۱۴۸ - واحد ۱

۰۲۱-۲۶۴۲۲۳۶۲

Co.ap-rad.com

order@co.ap.com

(ct:۲۰-۳۰) در تمامی لوله‌ها ، به جز لوله کنترل ، و در نظر گرفتن اینکه RT و PCR به درستی انجام می‌شود.

- مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت در کانال سبز و عبور از خط ترشلد (آستانه) (ct: ۲۰-۳۰) در لوله کنترل مثبت که به این معنی است که کنترل مثبت خوب است.
- مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت در کانال سبز (ct: ۲۰-۳۵) خط آستانه در لوله های بیمار به این معنی است - نتیجه مثبت است و باید به صورت زیر گزارش شود:

BCR-ABLp۱۹۰ Fusion Transcripts detected

- مشاهده سیگنال فلورسنت در کانال سبز به صورت خط صاف و یا عدم عبور از خط ترشلد (آستانه) (or ct>۴۰) در لوله های بیمار به این معنی است که نتیجه منفی است و باید به صورت زیر گزارش شود:

BCR-ABLp۱۹۰ Fusion Transcripts not detected

- در غیاب NAGK یا کنترل داخلی، فلورسنت در هر لوله) به غیر از (NTC بالا رفته و در نتیجه نباید گزارش شود.
- در صورت وجود هر گونه افزایش فلورسنت در NTC در هر دو کانال سبز و زرد، می بایست آزمایش تکرار شده و مشکوک به آلودگی است .
- در صورت وجود هر گونه افزایش فلورسنت در کنترل عادی در کانال سبز، می بایست آزمایش تکرار شده و مشکوک به آلودگی است.

تداخل:

هیچ گونه تداخلی با سایر ترانسلوکیشن ها مشاهده نشد. (سنجش اختصاصیت)

نکات مورد توجه

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

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 نشانه ها:

Batch Number	LOT
Ref Number	REF
تاریخ تولید	
تاریخ انقضا	
مطالعه بروشور	
استفاده در آزمایشگاه تشخیص طبی	IVD
استفاده در آزمایشگاه تحقیقاتی	IUO
شرایط نگهداری	
آدرس شرکت	

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

تهران - خیابان شریعتی- خیابان شهید دستگردی (ظفر) - بعد از خیابان شمس تبریزی- ساختمان بهاران - پلاک ۱۴۸ - واحد ۱

۰۲۱-۲۶۴۲۲۳۶۲

Co.ap-rad.com

order@co.ap.com