

کیت RT-PCR کیفی یک مرحله‌ای تشخیص فیوزن t(12;21)(p13;q22) ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)

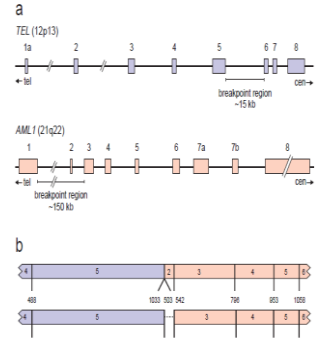
Ref: APETVA
(Investigation Use Only, IUO)

مقدمه:

این جابجایی، قابل تشخیص توسط سیتوژنتیک کانوشنال نبوده و بیشترین بازاریابی در ALL کودکان را تشکیل می‌دهد. تقریباً ۲۵٪ از ALL کودکان قابل مشاهده است. اکثر بیماران مبتلا در زمان تشخیص بین ۱ تا ۱۲ سال سن داشته و پیک آن بین ۲ تا ۵ سال است. در همه موارد، به ویژه ALL و pre-B-ALL، و ندرتا در pro-B ALL؛ ایمونوفنوتیپ precursor-B مشاهده می‌شود.

علاوه بر این، این بیماران در هنگام تشخیص با کمبود WBC ($> 50000/1$) مشخص می‌شوند. جالب توجه است که اکثریت قریب به اتفاق بیماران دارای محتوای DNA غیر hyper diploidy (شاخص = 1 DNA) بوده، بیشتر آنها دارای نشانگر میلوئیدی هستند و اکثریت (۸۰-۷۰٪) حذف آلل TEL allele non-rearranged را نشان می‌دهد. تاکنون t(12;21) در T-ALL یا AML یافت نشده است. مرکز در لوسمی نوزادان (سن کمتر از ۱ سال) تعریف نشده و فراوانی آن در بیماران لوسمی بزرگسالان کم است ($> 2\%$).

مطالعات، نتایج مطلوبی را برای t(12;21) در بیماران که جوابشان مثبت می‌شود گزارش کرده‌اند، در هر دو نوع مطالعه گذشته نگر و مطالعات آینده نگر پیگیری نسبتاً کم بوده است.



شکل ۱، نمودار شناختی ساختار آیزون این ژن‌ها هی TEL، AML1، و درگیر در t(12;21)(p13;q22)

این کیت تنها برای مقاصد تحقیقاتی (IUO) برای تشخیص کیفی فیوزن ETV6-RUNX1 در موارد ALL تهیه شده است.

اصول انجام آزمایش:

شرکت توسعه و پژوهش امیرپیوند این کیت را برای تشخیص دقیق جابجایی بین کروموزوم ۱۲ و ۲۱ [t(12;21)] با نسخه‌های فیوزن ETV6/RUNX1 در خون محیطی یا اسپیره مغز استخوان بیماران مشکوک به ابتلا به BP-ALL ارائه داده است.

تمام RNA ها در زمان تشخیص از خون بیمار یا مغز استخوان استخراج شده و mRNA به صورت معکوس cDNA سنتز می‌شود و همزمان در همان لوله در واکنش تک مرحله‌ای PCR. TaqMan می‌شود. گزارش نتایج به صورت کیفی و به یکی از حالات ذیل خواهد بود:

- ETV6/RUNX1 mRNA مثبت: تشخیص داده شده است.
- ETV6/RUNX1 mRNA منفی: تشخیص داده نشده است.

محتویات کیت:

شماره	محتویات	مقدار
۱	مسترمیکس آماده برای استفاده در RT-PCR تک مرحله‌ای	۴۵۰ μ l
۲	کنترل مثبت ETV6/RUNX1	۱۵ μ l
۳	کنترل منفی	۱۵ μ l

مواد و ابزار مورد نیاز:

- هر نوع دستگاه تایید شده و تحت کنترل Real Time PCR با کانال سبز (FAM) و زرد (HEX + VIC + JOE).
- کیت استخراج RNA (در این کیت ارائه نشده است)
- مواد پلاستیکی از جمله سرسرمپلرها، میکروتوب های ۰.۲ میلی لیتری عاری از DNase / RNase

شرایط نگهداری و انتقال کیت:

محتویات کیت را در دمای (-20°C) تا تاریخ انقضا درج شده بر روی بسته بندی کیت نگهداری و حمل کنید. از یخچاد 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 اسپیره 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 می‌کند 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 یخخته شده

موارد احتیاطی عمومی:

TaqMan یک مرحله‌ای مبتنی بر روش RT-PCR کیفی:

1. 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 ریبونوکلازها، توصیه می‌شود بلافاصله پس از جمع آوری نمونه، استخراج RNA آغاز گردد. هنگام کار با RNA، به منظور پیشگیری از آلودگی ریبونوکلاز از طریق دست، همیشه از دستکش استفاده کنید.
 2. 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 میکروپیت‌ها، سرمیلرها، دارای فیلتر آئروسول، دستکش یکبار مصرف و روپوش آزمایشگاهی تمیز باید در آزمایشگاه در دسترس باشد.
 3. تمویض دستکش‌ها هنگام دست زدن به میکروتیوب‌های حاوی RNA یا cDNA، امری ضروری است. پس از انجام PCR باید میکروتیوب‌ها با احتیاط باز شوند تا از ریختن محصولاتی که تکثیر یافته اند جلوگیری شود.
- توجه:** برای دستیابی به نتایج قابل اعتماد و دقیق، تاکید بر تکرار انجام و PCR برای هر بیمار می‌شود.
1. 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.
 2. تمام میکرو تیوب‌ها را بر روی رک سرد قرار دهید.
 3. ۱۸ µl مستر میکس به تمامی میکروتیوب‌های نام گذاری شده اضافه کنید.
 4. ۲ µl آب مقطر استریل به میکروتیوب NTC اضافه کنید.
 5. ۲ µl کنترل منفی به لوله دارای برچسب کنترل منفی، اضافه کنید.
 6. ۲ µl از RNA بیمار را به دو میکروتیوبی که نام بیمار بر روی آن نوشته شده است اضافه کنید.
 7. ۲ µl کنترل مثبت به میکروتیوب دارای برچسب کنترل مثبت، اضافه کنید.
 8. مواد را با یکدیگر مخلوط کرده و برای مدت زمان کوتاهی اسپین کنید.
 9. سپس آن را در دستگاه Real Time PCR قرار دهید و برنامه را همانگونه که در برنامه واکنش حرارتی ذکر شده است اجرا کنید.

بروفاایل واکنش حرارتی:

چرخه	زمان	دما
۱	۱۰ دقیقه	۵۰°C
۱	۳ دقیقه	۹۵°C
۴۵	۱۰ ثانیه	۹۵°C
	۳۰ ثانیه	۶۰°C

*FAM برای *ETV6-RUNX1*، JOE برای NAGK (کنترل داخلی) تنظیم شود.

Run Settings	
Name	Gain
Green	4
Yellow	9

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 می کند و مطابق دستورالعمل‌های دستگاه تفسیر می شود.

- مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت در کانال زرد که از خط آستانه کنترل داخلی عبور می کند باید در تمامی لوله‌ها نمایان شود (20-30 Ct) به جز لوله NTC و کنترل مثبت نشان دهد که RT و واکنش PCR درستی انجام شده اند، در غیر اینصورت واکنش باید تکرار شود.
- در لوله کنترل مثبت، مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت در کانال سبز که از خط آستانه عبور می کند (20-30 Ct) به این معنی است که کنترل مثبت خوب است.

شناسه‌های فنی:

توالی هدف: رونوشت فیوژن *ETV6-RUNX1* حاصل از جابه‌جایی بین کروموزوم ۱۲ و ۲۱

اختصاصیت: این کیت به طور انحصاری قادر به تشخیص رونوشت فیوژن *ETV6/RUNX1* است. پنچ مورد ALL با استفاده از تشخیص کیفی فیوژن *ETV6/RUNX1*، با روش RT-PCR تک مرحله‌ای در مقایسه با کانونشال RT-PCR و تطبیق ۱۰۰٪ نتایج حاصل می‌شود. پنچ نمونه طبیعی و پنچ نمونه ALL دارای (9:22) t و یا دیگر جابه‌جایی‌ها با استفاده از این روش مورد بررسی قرار گرفت و هیچ واکنش مثبت کاذبی مشاهده نشد.

حساسیت: آزمایش رقت کنترل مثبت پلاسمید با فیوژن *ETV6/RUNX1* با قابلیت تشخیص تا ۱.۳ copy/µl نشان دهنده حساسیت بالا حتی در بیماران با رونویسی فیوژن RNA کم وجود دارد، به ویژه در بیمارانی که درمان شده اند، طبیعی است.

کنترل کیفیت: در این آزمایش، NAGK (N-acetylglucosamine kinase) به عنوان یک کنترل داخلی با ژن housekeeping در همان لوله تکثیر می شود که به جز NTC باید در همه لوله‌ها در کانال زرد افزایش یابد.

تخلیص نوکلئیک اسید:

RNA را می‌توان به طور مستقیم از نمونه خون محیطی جمع‌آوری شده در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA و یا اسپیره مغز استخوان به وسیله کیت‌های استخراج RNA معتبر و یا روش‌های دستی استخراج کرد. باقی‌گت و گرانولوسیت‌ها را می‌توان مورد استفاده قرار داد. کیفیت RNA استخراج شده می‌بایست خوب باشد و با استفاده از بیوفوتومتر یا نانودراپ بررسی شود.

• در لوله های بیمار، 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 گزارش شود:

ETV6-RUNX1 Fusion Transcripts detected

• 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:

ETV6-RUNX1 Fusion Transcripts not detected

• در صورت وجود هر گونه افزایش فلورسنت در لوله NTC در هر دو کانال سبز و زرد می بایست آزمایش تکرار شده و مشکوک به بروز آلودگی است.

• در صورت وجود هر گونه افزایش فلورسنت در کنترل نرمال در کانال سبز، می بایست آزمایش تکرار شده و مشکوک به بروز آلودگی است.

نکات مورد توجه:











می بایست به تمام یافته های بالینی، داده های آزمایشگاهی، پارامترهای هماتولوژی نظیر CBC و اسپیره مغز استخوان و مورفولوژی در تفسیر و اتخاذ تصمیم توجه شود.

تداخل:

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

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.

علامه و توضیحات	
	سری ساخت
	شماره رفرنس
	تاریخ تولید
	تاریخ انقضا
	مطالعه بروشور
	استفاده در موارد تشخیصی و بالینی
	استفاده در موارد تحقیقاتی
	شرایط نگهداری
	آدرس شرکت
علامه خطر	
	

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