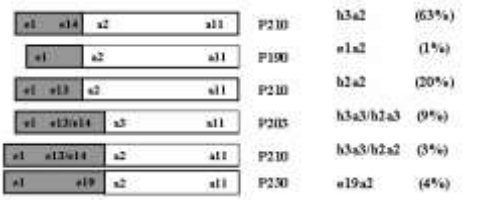
تشخیص فیوژن $BCR\text{-}ABL^{p210}$ کیت

RT-PCR کیفی یک مرحله‌ای:

Ref: APBCRP۲K۱

t(۹;۲۲)/*BCR-ABL*۱ یک اختلال کروموزومی شناخته شده در بیماران مبتلا به لنفوم میلوئیدی مزمن (CML) است. کروموزوم فیلادلفیا در برخی از بیماران مبتلا به ALL نوع B وجود دارد و به نام فیلادلفیا مثبت لنفوم میلوئیدی مزمن یا Ph+ ALL نیز شناخته می شود. این اختلال به ندرت در موارد لوسمی میلوئیدی حاد و لوسمی لنفوبلاستیک / آلنفوم نیز دیده می شود. فیوژن ژن BCR-ABL، بر روی کروموزوم مشتق شده ۲۲q۱۱ وجود دارد، یک رونوشت از mRNA ی BCR-ABL۱ کایمریک تولید می کند که سلول را وادار به تکثیر خارج از کنترل می سازد. در اکثر موارد CML، شکست های نقطه ای در ژن BCR، منجر به اتصال اگزون های شماره ۱۳ یا ۱۴ (e۱۳, e۱٤) به اگزون شماره ۲ (a۲) ABL۱ می شود که محصول آن یک پروتئین ۲۱۰ کیلودالتونی (p۲۱۰) به نام b۲a۲ یا b۳a۲ است. در موارد نادر، CML با یک mRNA نوع e۱۹-a۲ که در ارتباط با پروتئین p۲۳۰ است مشخص می شود. در Ph+ ALL ها، رونوشت mRNA ژن ABL۱, e۱-a۲ ، مجر به تولید پروتئین p۱۹۰ می شود. با این حال BCR-ABL۱ کایمریک، همواره با نوع بیماری مرتبط نیست، ، همانطور که با حضور Ph مثبت p۲۱۰ و مورد بسیار نادر از CML مثبت p۱۹۰ ذکر شده است. بنابراین ، نتایج مثبت حاصل از غربالگری (تشخیصی) برای mRNA ژن BCR-ABL۱ با نتایج بالینی و پاتولوژیک مرتبط است.



شکل شماره ۱، انواع مختلف رونوشت های فیوژن و فراوانی آنها در موارد CML

علاوه بر رونویسی مهمی که در بالا شرح داده شد، وقوع موارد نادر CML و Ph + ALL با یکدیگر می‌تواند منجر به وقوع اتصال متناوب شود که در نتیجه یک نوع رونویسی غیرعادی از BCR-ABL۱ نظیر b۳a۳ و موارد نادری که ممکن است در آن ۲ رونوشت فیوژن یافت شوند رخ دهد. با توجه به ماهیت ناهمگون ژنتیکی در CML ، این آزمایش‌ها، وقوع BCR-ABL۱ بسیار نادر و غیر معمول که سایر اگزون‌ها (به عنوان مثال ، نمونه های نادر) را درگیر می‌کنند را شناسایی نمی کند بنابراین به طور کامل اختصاصی نیست، اما می‌تواند انواع فیوژن های b۲a۲ و b۳a۲ را شناسایی می کند. بنابراین اگر از لحاظ بالینی، شک به CML با رونوشت BCR-ABL منفی وجود دارد، علاوه بر TaqMan کیفی تک مرحله ای بر اساس RT-PCR ، توصیه به استفاده از یک روش دوم مانند Conventional RT-PCR ، FISH یا مطالعات سیتوژنتیک مرسوم نیز می شود.

این کیت تنها برای مقاصد تشخیصی (IVD) برای تشخیص کیفی انواع متداول رونوشت های فیوژن $BCR\text{-}ABL^{p210}$ از جمله b۲a۲ و b۳a۲ در CML، ALL و AML ساخته شده است.

اصول انجام آزمایش:

شرکت AP-RAD، این کیت را برای تشخیص دقیق جابجایی بین کروموزوم ۹ و ۲۲ [t(۹;۲۲)] یا رونوشت های فیوژن $BCR\text{-}ABL^{p210}$ در خون محیطی یا آسپیره مغز استخوان بیماران مشکوک به CML، BP-ALL یا AML ارائه داده است.تمام RNA ها از نمونه خون یا مغز استخوان بیمار در زمان تشخیص استخراج شده و mRNA ها تبدیل به cDNA شده اند و همزمان با واکنش PCR با پروب TaqMan در همان لوله انجام می شود. گزارش‌دهی نتایج به صورت کیفی و به یکی از حالات ذیل خواهد بود؛

- رونویسی فیوژن ژن $BCR\text{-}ABL^{p210}$ تشخیص داده شده است.
- رونویسی فیوژن ژن $BCR\text{-}ABL^{p210}$ تشخیص داده نشده است.

محتویات کیت

شماره	محتویات	مقدار
۱	۲۴ میکروتیوب آماده برای استفاده در RT-PCR تک مرحله ای	۱۸ µl
۲	کنترل مثبت $BCR\text{-}ABL^{p210}$	۱۵ µl
۳	کنترل منفی	۱۵ µl

مواد و ابزار مورد نیاز

- هر نوع دستگاه تایید شده و تحت کنترل Real Time PCR با کانال سبز (FAM) و زرد (JOE، VIC، HEX).
- کیت استخراج RNA (در این کیت ارائه نشده است)
- تیپ ها (سر سمپلرها)
- میکروتوپ های ۰،۲ میلی لیتری عاری از DNase / RNase

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

۰۲۱-۲٦٤۲۲۳٦۲

Co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com

نگهداری و انتقال کیت

- بهتر است محتویات کیت را در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا تاریخ انقضا درج شده بر روی بسته بندی کیت نگهداری کرد. از انجماد و ذوب مکرر اجزاء کیت، که می‌تواند منجر به کاهش کیفیت تشخیصی کیت گردد پرهیزید نمایید..
- بهتر است این کیت در دمای کم تر از ۲۰- درجه سانتیگراد حمل شود. در بهترین حالت، مشروط بر اینکه شرایط نگهداری کیت از لحاظ دما در محدوده استاندارد باشد کیت تا تاریخ انقضای درج شده بر روی بسته بندی آن، پایدار است. (۲۰- تا ۵ ± درجه سانتی‌گراد)

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: درون یخچال

ثبات نمونه:

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

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.

هشدارها

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، سر سمپلرهای دارای فیلتر، دستکش یکبار مصرف و روپوش آزمایشگاهی تمیز باید در آزمایشگاه در دسترس باشد. شیوه انجام کار می‌بایست به گونه‌ای سازماندهی گردد که مخلوط و محصولات واکنش 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. میزهای کار آزمایشگاه، پیپت ها و روپوش‌های آزمایشگاهی باید به طور منظم نظافت شوند.

۴. **اکیدا توصیه** به استفاده از سر سمپلرهای دارای فیلتر آئروسل در طی انجام تمامی پروسه های آزمایش می شود. بسیار مهم است که هنگام کار با لوله‌های حاوی RNA یا DNA، دستکش‌ها را مرتبا تعویض کنید. پس از انجام PCR ، به منظور اجتناب از تخریب محصولات DNA در تعداد بالا می‌بایست درب لوله‌ها با احتیاط باز شوند.

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 دستکش-های یکبار مصرف استفاده کنید.

شناسه‌های فنی

توالی هدف: رونوشت فیوژن $BCR\text{-}ABL^{p210}$ حاصل از جابه‌جایی بین کروموزوم ۹ و ۲۲

ویژگی ها: این کیت منحصرا قادر به شناسایی انواع متداول رونوشت های فیوژن $BCR\text{-}ABL^{p210}$ یعنی (b۲a۲ و b۳a۲) در CML، ALL و AML است. ده مورد CML با استفاده از کیت RT-PCR کیفی تشخیص فیوژن $BCR\text{-}ABL^{p210}$ در مقایسه با Conventional RT-PCR آزمایش شدند و تطبیق ۱۰۰٪ نتایج حاصل شد. ده نمونه طبیعی و ده نمونه non-CML MPN شامل میلوفیبروز اولیه (PMF) و Essential Thrombocythemia (ET) با استفاده از این روش مورد بررسی قرار گرفت و هیچ واکنش مثبت کاذبی مشاهده نشد.

۰۲۱-۲۶۴۲۲۳۶۲
Co.ap-rad.com
order@co.ap-rad.com
تهران خیابان شریعتی خیابان شهید دستگردی (ظفر) بعد از خیابان شمس تبریزی ساختمان بهاران پلاک ۱۴۸ واحد ۱

حساسیت: آزمایش رقت پلاسمید های کنترل مثبت با فیوژن b۲a۲ تا میزان ۰,۵۶ copies µl تشخیص داده شد که این امر، نشان‌دهنده حساسیت خوب کیت است حتی در بیماران با اندک رونوشت فیوژن RNA که این حالت به خصوص در بیمارانی که تحت درمان قرار دارند، غیر معمول نیست.

کنترل کیفیت: در این آزمایش، NAGK (N-acetylglucosamine kinase) به عنوان یک کنترل داخلی در همان لوله انجام خواهد شد.

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 را می توان مورد استفاده قرار داد. 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 NanoDrop بررسی می‌شود.

TaqMan یک مرحله‌ای مبتنی برروش RT-PCR کیفی

RT-PCR تک 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 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 کنترل منفی، اضافه کنید.
۵. ۲ µl از RNA بیمار را به دو لوله ای که نام بیمار بر روی آن نوشته شده است اضافه کنید.
۶. ۲ µl کنترل مثبت به لوله دارای برچسب کنترل مثبت، اضافه کنید.
۷. مواد را با یکدیگر مخلوط کرده و برای مدت زمان کوتاهی بچرخانید.
۸. سپس آن را در دستگاه Real Time PCR قرار دهید و با توجه به دستورالعمل ذکر شده در برنامه واکنش حرارتی عمل کنید.

پروفایل واکنش حرارتی

	دما	زمان	چرخه
Reverse transcription, RT	۵۰°C	۱۰ دقیقه	۱
Initial activation	۹۵°C	۳ دقیقه	۱
Denaturation	۹۵°C	۱۰ ثانیه	۴۵
Annealing/Extension	۶۰°C	۳۰ ثانیه	

Run Settings	
Name	Gain
Green	٤
Yellow	۹

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.

- حضور منحنی سیگنال فلورسنت در کانال زرد که از خط ترشلد (آستانه) NAGK (کنترل داخلی) عبور می کند باید در تمامی لوله‌ها نمایان شود (ct:۲۰-۳۰) به جز لوله NTC، و نشان دهد که RT و واکنش PCR به درستی انجام می‌شوند.
- در لوله کنترل مثبت، مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت در کانال سبز که از خط ترشلد (آستانه) عبور می کند (ct: ۲۰-۳۰) به این معنی است که کنترل مثبت خوب است.
- در لوله های بیمار، مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت در کانال سبز (ct: ۲۰-۳۵) که از خط ترشلد (آستانه) عبور می کند به این معنی است که نتیجه مثبت است و باید به صورت زیر گزارش شود:

***BCR-ABL*^{p۲۱۰} Fusion Transcripts detected**

- در لوله های بیمار، مشاهده سیگنال فلورسنت در کانال سبز به صورت خط صاف و یا عدم عبور از خط ترشلد (آستانه) (or ct>٤٠) به این معنی است که نتیجه منفی است و باید به صورت زیر گزارش شود:

۰۲۱-۲٦٤۲۲۳٦۲
Co.ap-rad.com
order@co.ap-rad.com
تهران خیابان شریعتی خیابان شهید دستگردی (ظفر) بعد از خیابان شمس تبریزی ساختمان بهاران پلاک ۱۴۸ واحد ۱

BCR-ABL^{P210} Fusion Transcripts not detected

- در غیاب NAGK یا کنترل داخلی، فلورسنت در تمامی لوله ها (به غیر از لوله NTC) افزایش می یابد و نباید در نتیجه آزمایش گزارش شود.
- 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.

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 توضیحات

Batch Number	LOT
REF	REF
تاریخ تولید	
تاریخ انقضا	
مطالعه بروشور	
استفاده در ازمایشگاه تشخیص طبی	IVD
استفاده در ازمایشگاه تحقیقاتی	
شرایط نگه داری	
آدرس شرکت	

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

	Batch Number
	REF
	Expiry Date
	Read Pack

۰۲۱-۲۶۴۲۲۳۶۲
Co.ap-rad.com
order@co.ap-rad.com
تهران خیابان شریعتی خیابان شهید دستگردی (ظفر) بعد از خیابان شمس تبریزی ساختمان بهاران پلاک ۱۴۸ واحد ۱