راهنمای کیت تشخیص

BCR ABL1 Quantitative Detection kit (RUO-48 Test)

(P190, P210 & P230)

شرکت رادمان تشخیص پارس

REF: RTP057

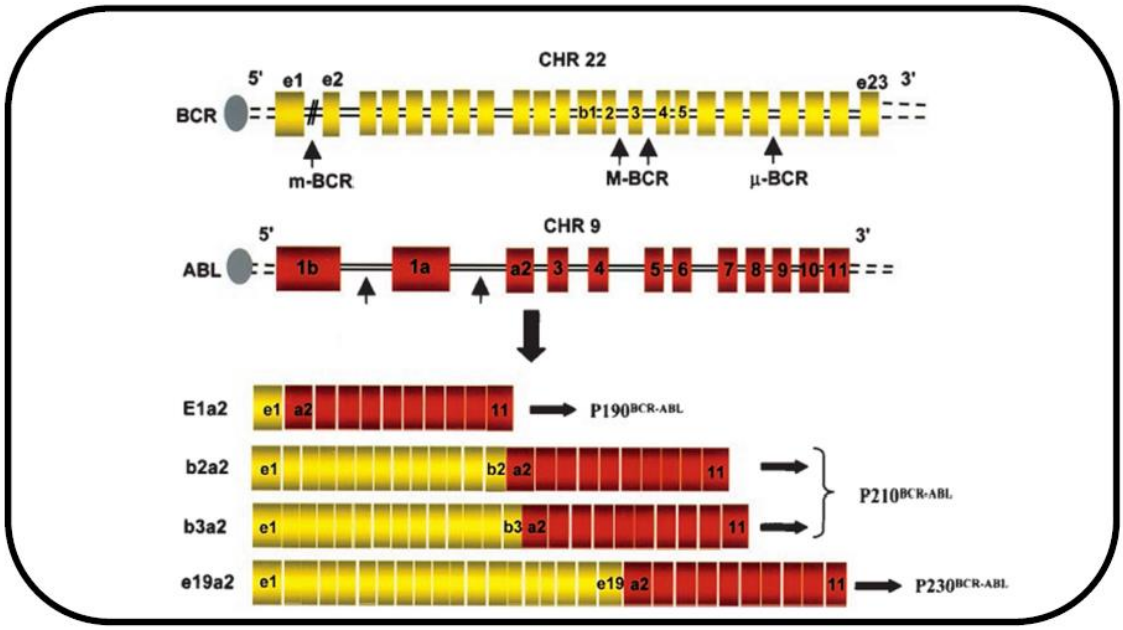
❖ مقدمه

بیماری سرطان خون، لوسمی یا لوکمیا به تکثیر غیر طبیعی و بی رویه سلول های گلبول سفید خون گفته می شود. تکثیر خارج از کنترل سلول های گلبول سفید خون در عملکرد نرمال این سلول ها تاثیر منفی می گذارد. همچنین لوکمیا به صورت رقابتی جلوی تولید سایر سلول های خونی از جمله گلبول قرمز و پلاکت را می گیرد که می تواند مولد کم خونی (آنمی) و ترومبوسیتوپنیا[1] باشد.

لوکمیا به چهار زیر گروه acute myelogenous leukemia (AML) ، acute lymphoblastic leukemia (ALL) ، chronic lymphocytic leukemia (CLL) و chronic myeloid leukemia (CML) طبقه بندی می شود. لوکمیا میلوئیدی مزمن (CML) با افزایش بی رویه تکثیر سلول های بنیادی میلوئیدی ایجاد می شود. از نظر ژنتیکی این نقص بدلیل وقوع جابجایی از نوع نوترکیبی کروموزومی متقارن بین بازوی بلند کروموزوم های شماره 9 و 22 می باشد t(9:22)(q34;q11) که در نهایت این نوترکیبی سبب ایجاد کروموزومی به نام فیلادلفیا می گردد. بدنبال این جا به جایی همولوگ تیروزین کینازی ژن ABL1 روی کروموزوم 9 در کنار ناحیه ی شکست دسته ی ژنی BCR روی کروموزوم 22 قرار می گیرد که سبب کد شدن بی رویه و غیر قابل کنترل تیروزین کیناز می گردد. بسته به اینکه ناحیه شکسته ژن ABL1 در کدام ناحیه دسته ی ژنی BCR قرار بگیرد سه نوع رونوشت با طول های مختلف ایجاد می گردد:

شایع ترین نوع رونوشت فیوژن BCR-ABL1، رونوشتP210 BCR-ABL می باشد که منجر به تولید پروتئین فیوژن به نام P210 Major BCR-ABL1 با وزن 210 کیلو دالتون می گردد. در گونه های کمیاب CML و گونه های شایع AML، جا به جایی، منجر به ایجاد رونوشت P190 BCR-ABL و بیان پروتئین فیوژن P190 Minor BCR-ABL1 با وزن 190 کیلو دالتون می گردد. نوع سوم رونوشت فیوژن BCR-ABL1 که در جمعیت های بسیار نادر CML و AML مشاهده می گردد، P230 BCR-ABL می باشد که در نهایت منجر به تولید پروتئین 230 کیلو دالتونی با نام P230 Micro BCR-ABL1 می شود. شکل زیر جایگاه های شکست ژنی در نواحی ژنی BCR و ABL1 و همچنین رونوشت های متعددی که از این فیوژن ایجاد می گردد را نشان می دهد.

[1] Thrombocytopenia



❖ انواع روش های بررسی پاسخ بیماری به درمان با مهارکننده های تیروزین کینازی[2] (TKIs)

روش ها و تکنیک های تشخیصی نقش کلیدی در کنترل بیماری لوکمیا CML دارند از این رو از دیرباز تکنیک های متعددی با دقت و حساسیت های گوناگون به این منظور مورد استفاده قرار می گرفته است. پیشرفت های اخیر منجر به استفاده از تکنیک هایی با حساسیت بالا، همانند روش های مبتنی بر سیتوژنتیک، تکنیک هیبریداسیون درجا با فلورسنت[3] (FISH) و سنجش کمی رونوشت های BCR-ABL1 با تکنیک Real-Time PCR جهت ارزیابی پاسخ به درمان گشته است.

پیشرفت درمان در بیمارانی که مرحله ی اول درمان با مهارکننده های تیروزین کینازی را دریافت کرده اند با روش های مختلفی که در ذیل به آن اشاره شده است، با حساسیت بالا ارزیابی می شود.

از ابتدایی ترین روش ها، بررسی پاسخ کامل خونی[4] (CHR) از طریق نرمالایز کردن شمارش سلول های خونی و سایز طحال می باشد. این آزمایش هر دو هفته یکبار تا زمان تایید انجام می گیرد و سپس هر سه ماه یکبار تکرار می گردد. هدف، رسیدن به بهترین و کامل ترین پاسخ خونی طی یک تا سه ماه پس از آغاز درمان است.

روش بعدی، تکنیک پاسخ های سیتوژنتیکی است. این روش شایع ترین روش بررسی پاسخ به درمان در بیماران CML می باشد. در این روش میزان پاسخ به درمان با سنجش شدت متافاز در کروموزوم های مغز استخوان و شمارش کروموزوم های فیلادلفیا مورد ارزیابی قرار می گردد. پاسخ کامل سیتوژنتیکی زمانی حاصل می گردد که بیمار هیچگونه متافاز مثبت در کروموزوم فیلادلفیا نداشته باشد.

---

[2] Tyrosine Kinase Inhibitors
[3] Fluorescence In Situ Hybridization
[4] Complete Hematological Response

با گذشت زمان و اهمیت حساسیت بالای روش های مولکولی، تکنیک سنجش ارزیابی پاسخ حاد مولکولی[5] (MMR) و پاسخ عمیق مولکولی[6] (MR) به منظور سنجش کمی کاهش میزان رونوشتBCR-ABL1 در خون بیمار ابداع گردید. اولین سطح ارزیابی پاسخ به درمان در مقیاس مولکولی، با اندازه گیری 3-log کاهش در میزان رونوشت BCR-ABL1 نسبت به حد طبیعی (0.1%≤ BCR-ABL1 در مقیاس بین المللی) صورت می گیرد.

نتایج حاصل از مطالعات بیشتر بر روی روش های پاسخ به درمان در بیماران CML، منجر به ارزیابی در سطوح دقیق تر پاسخ های مولکولی براساس مقیاس بین المللی گشته است که شامل MR4، MR4.5 و MR5 می باشد.

- MR4 با اندازه گیری 4-log کاهش در میزان رونوشت BCR-ABL1 نسبت به حد طبیعی (0.01% BCR-ABL1≤ در مقیاس بین المللی) سنجش می شود.
- MR4.5 با اندازه گیری 4.5-log کاهش در میزان رونوشت BCR-ABL1 نسبت به حد طبیعی (0.0032% BCR-ABL1≤ در مقیاس بین المللی) سنجش می شود.
- MR5 با اندازه گیری 5-log کاهش در میزان رونوشت BCR-ABL1 نسبت به حد طبیعی (0.001% BCR-ABL1≤ در مقیاس بین المللی) سنجش می شود.

جدول زیر به صورت خلاصه انواع روش های ارزیابی پاسخ به درمان با مهارکننده های تیروزین کینازی را در بیماران CML نشان می دهد.

LOG Reduction	BCR-ABL1% International Scale	Response
0	100%	Mean Value at Diagnosis
-1	10%	Complete Hematological Response (CHR)
-2	1%	Complete Cytogenetic Response (CCyR)
-3	0.1%	Major molecular response (MMR/MR3)
-4	0.01%	Deep molecular response (MR4)
-4.5	0.0032%	Deep molecular response (MR4.5)
-5	0.001%	Deep molecular response (MR5)

جدول 1

[5] Major Molecular Response
[6] Dep Molecular Response

❖ حیطه کاربرد

کیت RTP BCR ABL1 Quantitative کیت تشخیصی جهت شناسایی کمی سه رونوشت BCR-ABL1 (p210, p190, p230) در نمونه های گرفته شده از مغز استخوان و خون با استفاده از تکنیک Real-Time PCR می باشد. اساس کیت دو مرحله ای بوده که در مرحله ی نخست رونوشت برداری معکوس[7] از نمونه RNA انجام گرفته و بدنبال آن تکثیر و شناسایی رونوشت های Major (p210)، Minor (p190) و Micro (p230) صورت می گیرد.

کیت RTP BCR ABL1 Quantitative از معدود کیت های سنجش کمی رونوشت BCR-ABL1 می باشد که با دارا بودن یک کالیبراتور ثانویه در راستای ارزیابی نتایج نسبت به مقیاس بین المللی (MMR Calibrator (Cal)) امکان گزارش شدت پاسخ مولکولی بیمار به درمان با مهارکننده های تیروزین کینازی را میسر می سازد.

❖ محتویات کیت

- **اجزای مربوط به مرحله رونوشت برداری معکوس**

محتویات	حجم
BCR ABL1 QT RT Mix	384 µL
BCR ABL1 QT Enzyme Mix	72 µL
BCR ABL1 QT Primer Mix	240 µL
BCR ABL1 QT Enhancer Mix	24 µL
BCR ABL1 QT cDNA Control	30 µL
BCR ABL1 QT MMR-Calibrator	30 µL

جدول 2

[7] Reverse Transcription

- **اجزای مربوط به مرحله ی شناسایی کیفی رونوشت های BCR-ABL1**

محتویات	توضیح محتویات	حجم
BCR ABL1 QT Master Mix (2x)	مخلوط مستر میکس مورد نیاز برای PCR	480 µL x 4
BCR ABL1 QT (P210) Primer & Probe Mix 1	پرایمر و پروب مخصوص شناسایی Major-BCR-ABL1	24 µL
BCR ABL1 QT (P190) Primer & Probe Mix2	پرایمر و پروب مخصوص شناسایی Minor - BCR-ABL1	24 µL
BCR ABL1 QT (P230) Primer & Probe Mix3	پرایمر و پروب مخصوص شناسایی Micro - BCR-ABL1	24 µL
ABL1 QT Primer & Probe Mix4	پرایمر و پروب مخصوص شناسایی ABL1	24 µL
Standards BCR-ABL1 and ABL1	STD 1 (1.00 X 10^6 copies/ 5 µl) STD 2 (1.00 X 10^5 copies/ 5 µl) STD 3 (1.00 X 10^4 copies/ 5 µl) STD 4 (1.00 X 10^3 copies/ 5 µl) STD 5 (1.00 X 10^2 copies/ 5 µl) STD 6 (1.00 X 10^1 copies/ 5 µl)	30 µL هر استاندارد
BCR ABL1 QT RNase Free water	RNase Free water	1000 µL

جدول 3

❖ **شرایط نگهداری کیت**

- تمامی اجزای کیت می بایست در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری شوند. در صورت نگهداری در این شرایط تا زمان تاریخ انقضای مندرج بر روی ویال ها، کیت قابل استفاده می باشد.
- از ذوب و انجماد کردن مکرر اجزای کیت جدا خودداری نمایید. در صورت نیاز به استفاده مکرر، پیشنهاد می شود محلول ها را بسته به میزان مورد نیاز در هر بار استفاده در ویال های جداگانه در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری کنید. اینکار در حفظ کیفیت و حساسیت کیت نقش موثری دارد.

- نتایج کنترل کیفی نشان می دهد اجزای کیت قابلیت سه مرتبه متوالی ذوب و انجماد را دارند. از ذوب و انجماد محلول ها بیش از سه مرتبه جدا خودداری کنید.
- کلیه اجزای کیت تا تاریخ انقضا درج شده بر روی محصول پایدار می باشند و در نتیجه پس از گذشت تاریخ انقضا از این محصول استفاده نشود.

نتایج مطلوب و صحیح از طریق استفاده دقیق طبق دستورالعمل استفاده از کیت بدست می آید، هر گونه تخلف از این دستورالعمل می تواند منجر به بدست آمدن جواب های نامعتبر شود.

❖ موارد مورد نیاز جهت انجام واکنش که در داخل کیت تعبیه نشده اند

- پیپت در اندازه های مختلف
- سمپلر و سر سمپلر فیلتر دار در سایز های مختلف
- ویال های میکروسانترفیوژ استریل در اندازه های 1/5 و 2 میلی لیتر
- هود لامینار
- دستگاه Real-Time PCR
- دستگاه ورتکس-اسپین
- کیت استخراج RNA
- ویال های مخصوص دستگاه PCR
- هات پلیت

❖ دستگاه های سازگار با کیت RTP BCR ABL1 Quantitative

کیت RTP BCR ABL1 Quantitative قابل استفاده با انواع مختلف دستگاه Real-Time PCR روتوری و پیلیتی می باشند، در پایین به تعدادی از این دستگاه ها اشاره شده است :

- Applied Biosystems™ 7500 series
- Applied Biosystems™ QuantStudio® series
- Rotor-Gene Q
- Bio-Rad CFX96, CFX384
- Roche - LightCycler® 480/480 II and COBAS z 480
- Line gene K Real-Time PCR
- AriaMx Real-Time PCR

❖ استخراج RNA

جهت استخراج RNA می توان از انواع کیت های موجود در بازار استفاده نمود. لیکن پیشنهاد ما استفاده از کیت زیر است:

کمپانی سازنده	کیت پیشنهادی	نوع نمونه
رادمان تشخیص پارس	RTP Total Blood Extraction kit	خون و مغز استخوان

- با توجه به اهمیت نقش کیفیت و خلوص RNA استخراج شده در عملکرد کیت پیشنهاد می گردد، حتما پیش از آغاز ارزیابی موتاسیون، کیفیت و خلوص RNA با دستگاه اسپکتروفوتومتر سنجیده شود.
- میزان A260/A280 می بایست بین 1/7 تا 2/0 باشد، مقادیر کمتر از این مقدار نشان دهنده وجود آلودگی پروتئینی است.
- برای انجام آزمایش غلظت نمونه RNA می بایست 1µg باشد.
- بدلیل حساسیت بالای RNA و امکان تجزیه و شکسته شدن آن توصیه می گردد به محض استخراج، مراحل سنتز cDNA و شناسایی رونوشت ها انجام شود.
- RNA استخراج شده جهت نگهداری طولانی مدت می بایست در دمای 80- درجه سانتیگراد نگهداری شود.

❖ مراحل انجام واکنش Real-Time PCR

- **مرحله رونوشت برداری معکوس**

در این مرحله از RNA نمونه ، cDNA سنتز می گردد.

- **آماده سازی مخلوط واکنش**
  - در ابتدا ویال های حاوی RT Mix و Primer Mix را به دمای محیط رسانیده و سپس به مدت 10 ثانیه ورتکس کنید.
  - ویال های حاوی Enzyme Mix و Enhancer Mix را به آرامی پیپتاژ نمایید. به هیچ عنوان این دو ویال را ورتکس نکنید.
  - می توانید ویال ها را به مدت کوتاهی سانتریفیوژ نمایید تا تمامی محتویات در کف ویال جمع گردد.

سپس جهت آماده سازی مخلوط واکنش مطابق جدول زیر عمل نمایید:

معرف	حجم (1 RXN)
RT Mix	8 µL
Enzyme mix	1.5 µL
Primer mix	5 µL
Enhancer mix	0,5 µL
Total reaction volume	15 µL

جدول 4

- پس از مخلوط نمودن مقادیر بالا، ویال را به خوبی پیپتاژ و برای 10 مرتبه سر و ته نمایید.

- دقت کنید در این مرحله به هیچ عنوان ویال را ورتکس نکنید.
- سپس مخلوط واکنش مستر میکس را به ویال های 0.2ml مخصوص واکنش PCR و مطابق جدول زیر منتقل نمایید.

Reagent	PCR Tube (Sample)	PCR Tube (cDNA Control)	PCR Tube (IS-Calibrator RNA Control)
Prepared Reaction Mix	15 µl	15 µl	15 µl
sample RNA	10 µl (1µg)	-	-
cDNA Control	-	10 µl	-
MMR-Calibrator RNA	-	-	10 µl
Total	25 µl	25 µl	25 µl

جدول 5

- سپس جهت اطمینان از مخلوط شدن اجزای واکنش ویال ها را چند بار سر و ته نموده و سانتریفیوژ نمایید.
- در ادامه، جهت انجام واکنش سنتز cDNA ویال های را در دستگاه PCR قرار دهید.
- توجه نمایید که ویال های استاندارد، حاوی DNA استاندارد می باشند و نیازی به انجام مرحله رونوشت برداری معکوس ندارند. پس مستقیما در مرحله qPCR مورد استفاده قرار می گیرند.

❖ برنامه زمانی و دمایی دستگاه

مطابق جدول زیر پروفایل دمایی و زمانی دستگاه را تنظیم کنید.

مرحله	زمان	دما (°C)	چرخه
1	10 دقیقه	25	1
2	60 دقیقه	47	1
3	5 دقیقه	70	1

جدول 6

- پس از اتمام مرحله PCR ویال ها را به مدت 10 ثانیه سانتریفیوژ نمایید. cDNA سنتز شده را تا زمان انجام qPCR در دمای 70- درجه سانتیگراد نگهداری کنید.

مرحله سنجش کیفی رونوشت های BCR-ABL1

- **آماده سازی مخلوط واکنش**

- در ابتدا ویال های حاوی(2x) BCR ABL1 QT Master Mix و پرایمر-پروب ها را به دمای محیط برسانید. سپس ویال های حاوی پرایمر-پروب را به مدت 10 ثانیه ورتکس کنید.
- ویال BCR ABL1 QT Master Mix (2x) را به آرامی پیپتاژ نمایید. به هیچ عنوان این ویال را ورتکس نکنید.
- سپس با یک سانتریفیوژ 10 ثانیه ای محتویات ویال ها را در کف ویال جمع کنید.

مطابق جدول زیر مخلوط واکنش را آماده نمایید.

معرف	Tube1	Tube2	Tube3	Tube4
BCR ABL1 QT Master Mix (2x)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
BCR ABL1 QT (P230) Primer & Probe Mix 1	1 µl	-	-	-
BCR ABL1 QT (P190) Primer & Probe Mix 2	-	1 µl	-	-
BCR ABL1 QT (P210) Primer & Probe Mix3	-	-	1 µl	-
ABL1 QT Primer & Probe Mix4	-	-	-	1 µl
RNase free Water	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
Total	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

جدول 7

- جهت اطمینان از مخلوط شدن اجزای واکنش ویال ها را چند بار سرو ته و پیپتاژ نمایید.
- مخلوط واکنش مستر میکس را به ویال های 0.2ml مخصوص واکنش PCR منتقل کنید.
- دقت نمایید که هر نمونه می بایست به صورت جداگانه در تمامی 4 ویال مخلوط مسترمیکس اضافه گردد.
- از 4 ویال مخلوط مسترمیکس بالا، یک سری برای کنترل منفی نیز آماده نموده و به میزان 5 µl آب Nuclease Free به آن ها اضافه نمایید.
- از cDNA نمونه به میزان 5 µl به هر 4 ویال مسترمیکس مربوط به نمونه اضافه نمایید.
- از cDNA کنترل به میزان 5 µl به هر 2 ویال مسترمیکس حاوی پرایمر-پروب ABL1 و پرایمر-پروب P210 اضافه نمایید.
- از ویال cDNA سنتز شده از MMR-Calibrator RNA به میزان 5 µl به هر 2 ویال مسترمیکس حاوی پرایمر-پروب ABL1 و پرایمر-پروب P210 اضافه نمایید.

- سپس جهت اطمینان از مخلوط شدن اجزای واکنش ویال ها را چند بار سرو ته نموده و سانتریفیوژ کنید.
- در ادامه جهت انجام واکنش PCR ویال های را در دستگاه Real-Time PCR قرار دهید.

❖ استاندارد های کیت

- استاندارد های کیت با تکنیک مبتنی بر پلاسمید طراحی شده اند که به منظور کاهش میزان مغایرت، پلاسمیدهای تکی شامل توالی هدف BCR-ABL1 و ABL1 می باشند. میزان غلظت کپی نامبر های پلاسمید ها با ERM®- AD623 ، یک روش مرجع برای ارزیابی و اندازه گیری میزان رونوشت های تولید شده BCR-ABL1، کالیبر و قابل ردیابی می باشد.
- کیت دارای 6 ویال استاندارد شامل 6 رقت سریالی از 10^1 کپی نامبر تا 10^6 کپی نامبر از رونوشت BCR-ABL1 و 4 ویال استاندارد شامل 4 رقت سریالی از 10^1 تا 10^4 کپی نامبر از رونوشت ABL1 می باشد. دقت کنید جهت اطمینان از دقت و صحت گراف استاندارد[8] می بایست 4 رقت سریالی برای ABL1 و 6 رقت سریالی برای BCR-ABL1 به صورت دوتایی در هر ران دستگاه استفاده شود.

❖ آماده سازی مخلوط واکنش برای استانداردها

- مطابق جدول زیر، 6 ویال واکنش برای استاندارد های BCR-ABL1 آماده کنید.

معرف	STD1 (10^6 Copies)	STD2 (10^5 Copies)	STD3 (10^4 Copies)	STD4 (10^3 Copies)	STD5 (10^2 Copies)	STD6 (10^1 Copies)
BCR ABL1 QT Master Mix (2x)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10µl
BCR ABL1 QT (P210) Primer & Probe Mix 1	1 µl	1 µl	1µl	1 µl	1 µl	1 µl
Standards	5 µl	5µl	5µl	5 µl	5 µl	5 µl
RNase free Water	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
Total reaction volume	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

جدول 8

[8] Standard Curve

- مطابق جدول زیر، 4 ویال واکنش برای استاندارد های ABL1 آماده کنید.

معرف	STD1 (10^6 Copies)	STD2 (10^5 Copies)	STD3 (10^4 Copies)	STD4 (10^3 Copies)
BCR ABL1 QT Master Mix (2x)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
ABL1 Primer & Probe Mix	1 µl	1 µl	1µl	1 µl
Standards	5 µl	5µl	5µl	5 µl
RNase free Water	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
Total reaction volume	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

جدول 9

جدول زیر به طور خلاصه نحوه آماده سازی ویال های واکنش برای نمونه ها، کنترل ها و استانداردها را نشان می دهد.

	Tube1 (Major BCR-ABL1)	Tube2 (Minor BCR-ABL1)	Tube3 (Micro BCR-ABL1)	Tube4 (ABL1)
Samples	N	N	N	N
NTC	1	1	1	1
Standards	6	-	-	4
cDNA Control	1	-	-	1
MMR Calibrator	1	-	-	1
No. of Reactions	N+9	N+1	N+1	N+7

جدول 10

❖ **برنامه زمانی و دمایی دستگاه**

مطابق جدول زیر پروفایل دمایی و زمانی دستگاه را تنظیم کنید.

مرحله	دما به درجه سانتیگراد	زمان	خوانش فلورسنت	چرخه ها
1	94	10 دقیقه	-	1
2	94	15 ثانیه	-	45
	60	60 ثانیه	دارد	

جدول 11

کانال های دستگاه را مطابق جدول زیر انتخاب نمایید.

Detection	Detector Name	Reporter	Quencher
BCR-ABL1	BCR-ABL1	FAM	None
ABL1	ABL1	FAM	None

Passive Reference Dye-ROX

جدول 12

❖ **تنظیمات نرم افزار دستگاه (تعیین Threshold)**

S. No.	Applied Bi system	Threshold value range
1	FAM	0.1-0.5

جدول 13

با توجه به اینکه تعیین Absolute threshold Value در هر ران واکنش، بسته به نوع دستگاه و مدل و کالیبراسیون متفاوت است، در صورتیکه دستگاه Real-Time مورد استفاده Applied Biosystem نمی باشد، خواهشمند است جهت تنظیم مناسب برای نخستین بار، با تیم پشتیبانی مولکولی شرکت رادمان تشخیص پارس تماس حاصل فرمایید.

Cutoff:

واکنش در 45 سیکل انجام می گیرد لیکن نباید هر گونه تکثیر پس از سیکل37 به عنوان نمونه ی مثبت در نظر گرفت به این دلیل Cutoff واکنش Ct 37 می باشد.

❖ **تفسیر داده ها:**

- **آنالیز نتایج کیفی**

تفسیر	تکثیر BCR ABL1 (P230)	تکثیر BCR ABL1 (P190)	تکثیر BCR ABL1 (P210)	تکثیر ABL1	وضعیت
نمونه برای جابجایی BCR ABL1 (P210) مثبت است. (Major Translocation)	_	_*	+	+	1
نمونه برای جابجایی BCR ABL1 (P190) مثبت است. (Minor Translocation)	_	+	_	+	2
نمونه برای جابجایی BCR ABL1 (P230) مثبت است. (Micro Translocation)	+	_	_**	+	3
نمونه برای انواع جابجایی های BCR-ABL1 منفی است.	_	_	_	+	4
نمونه تجزیه و شکسته شده است و می بایست نمونه گیری و استخراج تکرار شود.	_	_	_	+ (تعداد رونوشت کمتر از 10،000 کپی)	5
بدلیل وجود مهار کننده های PCR می بایست آزمایش مجدد انجام شود.	_	_	_	_	6

جدول 14

* بدلیل وجود اگزون 1 در نمونه های مثبت BCR ABL1 (P210) ، احتمال تاخیر در تکثیر رونوشت BCR ABL1 (P190) در حضور میزان بالایی از رونوشت BCR ABL1 (P210) وجود دارد.

**بدلیل وجود نواحی اتصال پرایمر مشترک، در نمونه های با میزان بالای رونوشت BCR ABL1 (P230) ، احتمال تاخیر در تکثیر رونوشت BCR ABL1 (P210) (تکثیر در سیکل های بالاتر) وجود دارد.

❖ آنالیز نتایج کمی

آنالیز کمی نتایج با استفاده از روش گراف استاندارد (Standard Curve)، بدست آمده از نتایج Ct نمونه های استاندارد محاسبه می شود. با کمک Standard Curve تعداد کپی نامبر های (CN) رونوشت فیوژن BCR-ABL1 و ژن کنترلی ABL1 را می توان محاسبه نمود. دقت کنید که حداقل 4 رقت سریالی برای ایجاد Stanndard curve مورد نیاز است اما بهترین نتیجه از استفاده از 6 رقت سریالی برای رونوشت های BCR-ABL1 و 4 رقت سریالی برای رونوشت ABL1 حاصل می گردد.

با توجه به اینکه استاندارد ها 10 برابر رقیق شده هستند، standard curve باید دارای ویژگی های زیر باشد:

slope -3.2 to -3.6

R2 > 0.98

در نظر داشته باشید چنانچه R2 > 0.95 باشد، شیب نمودار در بازه ی 3.2- تا 3.6- نیز قابل قبول است.

مقادیر برای نمونه های مورد بررسی با واحد copies/ µL در ستون نتایج در کانال FAM دستگاه برای BCR-ABL1 و ABL1 قابل مشاهده است. لیکن پیش از آغاز محاسبات ابتدا به نکات زیر دقت کنید.

1- جهت جلوگیری از نتایج منفی کاذب ناشی از کیفیت پایین نمونه RNA، دقت کنید که حتما تعداد کپی نامبر برای رونوشت ABL1 نمونه ها بالاتر یا مساوی 10000 باشد. چنانچه از این مقدار کمتر باشد نتایج قابل ارزیابی نیستند.
2- هیچگونه تکثیری در نمونه های کنترل منفی نباید مشاهده شود. هر گونه تکثیر گویای آلودگی با نمونه است.
3- ویال مربوط به cDNA Control به منظور ارزیابی انجام درست مراحل رونوشت برداری معکوس و مراحل تکثیر رونوشت های ABL1 وMajor BCR ABL1 می باشد. چنانچه تکثیر در آن مشاهده نشد، نتایج واکنش فاقد اعتبار است.

❖ محاسبه ی کپی نامبر نرمال شده (NCN)

محاسبه ی NCN با استفاده از تعداد کپی رونوشت ژن کنترلی ABL1 (ABL1 CN) و تعداد کپی رونوشت فیوژن BCR-ABL1 (BCR ABL1 CN) ، حاصله از نتایج آزمایش، طبق فرمول زیر انجام می گیرد.

$$\text{NCN}\ (100\%) = \frac{\text{BCR ABL1 CN}}{\text{ABL1 CN}} \times 100$$

❖ کنترل کیفیت نتایج NCN% کالیبراتور

درصد NCN مربوط به کالیبراتور ثانویه MMR Calibrator مطابق فرمول زیر محاسبه می شود

$$\text{Cal NCN\% (obtained)} = \frac{\text{BCR ABL1 CN (MMR Calibrator)}}{\text{ABL1 CN (MMR Calibrator)}} \times 100$$

نتایج NCN% مربوط به MMR Calibrator ، بدست آمده از تکثیر با کیت RTP BCR ABL1 Quantitative می بایست در بازه ی درج شده بر روی لیبل کیت باشد در غیر این صورت مقادیر NCN قابل تبدیل به مقیاس بین المللی نمی باشند.

❖ تبدیل نتایج به مقیاس بین المللی (IS)

کیت RTP BCR ABL1 Quantitative جهت ارزیابی کمی جا به جایی کروموزومی BCR ABL1 ، بر اساس اولین پنل مرجع ژنتیکی بین المللی سازمان بهداشت جهانی[9] با روش RQ-PCR (NIBSC code: 09/138) کالیبر شده است. سازمان بهداشت جهانی در سال 2009 به کمک کمیته متخصصین ECBS، مقدار جدیدی برای درصد BCR ABL1/ABL1 مشخص نمودند. پس از کالیبر شدن کیت با روش استاندارد سازمان بهداشت جهانی، درصد کپی نامبر نرمال شده برای کالیبراتور ثانویه تحت عنوان Cal NCN% assigned تعیین گردید که بر روی ویال کالیبراتور ثانویه MMR Calibrator درج گردیده است.

نتایج حاصل از محاسبات را مطابق فرمول زیر به درصد کپی نامبر نرمال شده نمونه با استاندارد جهانی تبدیل نمایید.

$$\text{IS NCN\% (sample)} = \frac{\text{NCN\% (sample)} \times \text{Cal NCN\% (assigned)}}{\text{Cal NCN\% (obtained)}}$$

به این نکته دقت داشته باشید که کیت RTP BCR ABL1 Quantitative detection تنها برای رونوشت فیوژن Major P21 BCR ABL1 کالیبر شده است. چنانچه نمونه مورد آزمایش برای رونوشت های Minor P190 BCR ABL1 و Micro P230 BCR ABL1 مثبت باشد، نتایج تنها می تواند به صورت NCN% گزارش شود.

❖ سنجش میزان پاسخ شدید مولکولی (MMR) به درمان با مهار کننده های تیروزین کینازی

Case	IS NCN% of Sample	ABL1 Copies	MMR status	Remarks
1	>0.1%	<10000	Inconclusive	Poor Quality Sample
2	>0.1%	>10000	No MMR	Major Molecular Response not Achieved
3	≤0.1%	<10000	Inconclusive	Poor Quality Sample
4	≤0.1%	>10000	MMR (MR3)	Major Molecular Response achieved with ≥3-log reduction from IRIS baseline

جدول 15

[9] First WHO International Genetic Reference Panel

❖ **سنجش میزان پاسخ عمیق مولکولی (DMR) به درمان با مهار کننده های تیروزین کینازی**

Case	IS NCN% of Sample	ABL1 Copies	DMR status	Remarks
1	≤0.01%	<10000	Inconclusive	Poor Quality Sample
2	>0.01%	>10000	No MMR	Major Molecular Response not Achieved
3	≤0.01%	10000-31999	DMR-4	Deep Molecular Response achieved with ≥4-log reduction from IRIS baseline
4	≤0.0032%	32000-99999	DMR-4.5	Deep Molecular Response achieved with ≥4.5-log reduction from IRIS baseline
5	≤0.001%	≥100000	DMR-5	Deep Molecular Response achieved with ≥5-log reduction from IRIS baseline

جدول 16

❖ **سنجش میزان پاسخ عمیق مولکولی (DMR) در شرایط بیماری شناسایی نشده**

Case	BCR ABL1 Copies	ABL1 Copies	DMR status	Remarks
1	Not Detected	<10000	Inconclusive	Poor Quality Sample
2	Not Detected	10000-31999	DMR-4	Deep Molecular Response achieved with ≥4-log reduction from IRIS baseline
3	Not Detected	32000-99999	DMR-4.5	Deep Molecular Response achieved with ≥4.5-log reduction from IRIS baseline
4	Not Detected	≥100000	DMR-5	Deep Molecular Response achieved with ≥5-log reduction from IRIS baseline

جدول 17

❖ **ارزیابی عملکرد کیت**

- کمترین حد شناسایی موتاسیون (LOD) : کمتر از 3 کپی نامبر از رونوشت فیوژن BCR ABL1
- آستانه بلانک (LOB) : 0.94 کپی نامبر از رونوشت BCR ABL1
- حساسیت بالینی: 97.78 درصد
- اختصاصیت بالینی: 98.82 درصد
- میزان پیش بینی مثبت[10]: 98.88 درصد
- میزان پیش بینی منفی[11]: 97.67 درصد

❖ **توصیه های لازم جهت رفع خطاهای احتمالی در Real-Time PCR**

راهکارهای احتمالی	دلایل احتمالی	خطای احتمالی
- تکرار واکنش با مواد جدید - پیپتاژ ویال کنترل مثبت در آخرین مرحله - ضدعفونی کردن محل انجام آزمایش و تمامی وسایل	- وقوع آلودگی در حین آماده سازی نمونه ها و یا در حین واکنش PCR	مشاهده تکثیر در نمونه ی کنترل منفی
- ذوب کردن و یا ورتکس ناکافی ویال کنترل مثبت/استانداردها - بررسی تمامی مراحل انجام کار بخصوص بررسی احتمال خطای سرسمپلر - بررسی شرایط نگهداری و تاریخ انقضای مندرج بر روی لیبل ویال کنترل مثبت/استاندارد ها و استفاده از ویال جدید - چک کردن پروفایل دمایی داده شده به دستگاه بر طبق دستورالعمل داخل کیت	- عدم استفاده صحیح از کنترل مثبت/استانداردها - عدم اضافه نمودن و یا اضافه کردن ناکافی کنترل مثبت/استاندارد ها - شرایط نگهداری نامناسب کنترل مثبت و یا استفاده از کنترل مثبت/استاندارد های تاریخ مصرف گذشته - تنظیم اشتباه پروفایل دمایی و زمانی دستگاه	عدم مشاهده تکثیر در نمونه کنترل مثبت و استاندارد ها

جدول 18

[10] Positive Predictive Value
[11] Negative Predictive Value

❖ هشدار های عمومی و تخصصی لازم در استفاده از کیت

- پیش از آغاز آزمایش از کالیبر بودن تمام تجهیزات اطمینان حاصل کنید.
- تمامی مواد را پیش از آغاز واکنش در دمای محیط ذوب و سپس کمی سانتریفوژ کنید.
- RNA نمونه استخراج شده را در دمای 20 - درجه سانتیگراد نگهداری نمایید و در حین انجام آزمایش بر روی کول رک[12] قرار دهید.
- بدلیل پایداری کم RNA، توصیه می شود بلافاصله پس از استخراج، cDNA سنتز شود. در صورت نگهداری برای مدت طولانی RNA ستخراج شده در دمای -70 درجه سانتیگراد نگهداری گردد.
- از کیفیت جمع آوری نمونه و استخراج آن پیش از آغاز آزمایش اطمینان حاصل نمایید. ترجیحا نمونه خون تازه باشد. از نمونه های خونی یخ رده بدلیل کیفیت پایین RNA استفاده نکنید.
- پیش از آغاز، محل انجام آزمایش را با محلول ضدعفونی کننده مناسب، ضدعفونی نمایید.
- تمامی مراحل انجام آزمایش بایستی زیر هود لامینار، ورک استیشن استریل انجام گردد.
- با توجه به اهمیت تاثیر کاربر متخصص در عملکرد کیت و نتایج حاصل از آن، از افراد با سابقه، متخصص و آموزش دیده جهت انجام تست کمک بگیرید.
- در صورت تعداد کپی نامبر رونوشت موتانت پایین تر از آستانه ی شناسایی کیت احتمال ایجاد نتیجه منفی کاذب وجود دارد.
- جهت تشخیص قطعی، نتایج حاصل از کیت می بایست همراه با سایر بررسی های بالینی مورد ارزیابی قرار گردد.
- تمامی نمونه ها باید به صورت بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند. پرسنل آزمایشگاه باید ملزومات پوشش حرفه ای و محافظ را رعایت کنند (شامل دستکش های یکبار مصرف، عینک محافظ، گان و یا روپوش آزمایشگاه). شستشوی دست ها قبل و بعد از شروع کار باید انجام شود. دستکش ها بعد از هر نمونه باید تعویض شوند تا از ایجاد آلودگی جلوگیری شود.
- جهت تشخیص قطعی، نتایج حاصل از کیت می بایست همراه با سایر بررسی های بالینی مورد ارزیابی قرار گردد.
- پروسه آزمایش باید مطابق با پروتکل فوق انجام شود.
- این محصول بعد از گذشتن تاریخ مصرف نباید استفاده شود.

[12] Cool rak