# راهنمای کیت تشخیص

# RTP BCR ABL1 Qualitative Detection kit (RUO-48 Test)

(P190, P210 & P230)

شرکت رادمان تشخیص پارس

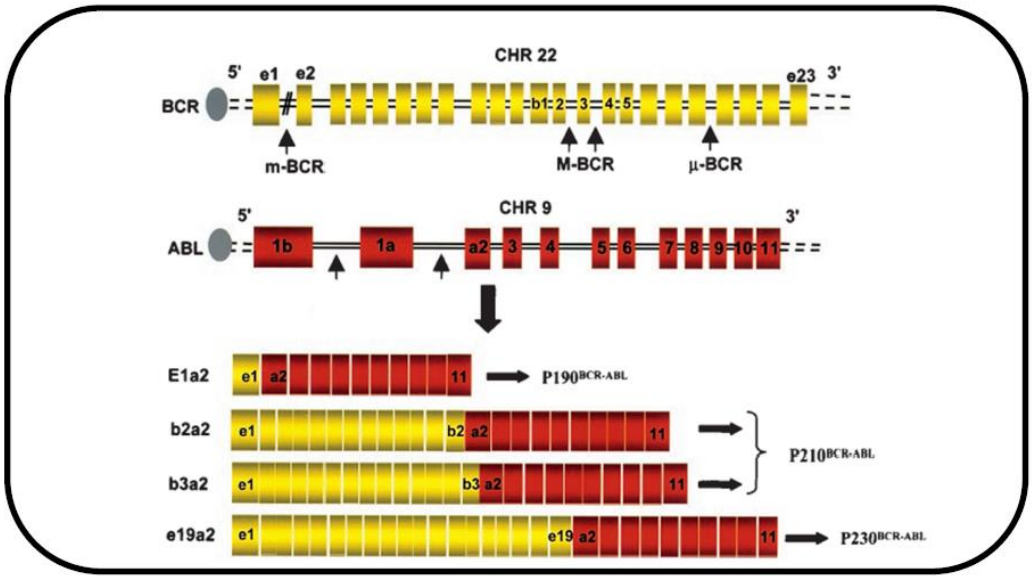
REF: RTP056

## ❖ 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 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 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 ABL1روی 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، رونوشت P210 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 P210 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.




## ❖ حیطه کاربرد

کیت RTP BCR ABL1 Qualitative Detection یک کیت تشخیصی جهت شناسایی کیفی سه رونوشت BCR-ABL1 (p230, p190 ,p210) 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[1] از نمونه RNA انجام گرفته و بدنبال آن تکثیر و شناسایی رونوشت های Major (p210)، Minor (p190) و Micro (p230) صورت می گیرد.

## ❖ محتویات کیت

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

| محتویات | حجم |
|---|---|
| BCR ABL1 QL RT Mix | 384 µL |
| BCR ABL1 QL Enzyme Mix | 48 µL |
| BCR ABL1 QL Primer Mix | 240 µL |
| BCR ABL1 QL Enhancer Mix | 24 µL |
| BCR ABL1 QL cDNA Control | 30 µL |

جدول 1

[1] Reverse Transcription

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

| محتویات | توضیح محتویات | حجم |
|---|---|---|
| BCR ABL1 QL Master Mix (2x) | مخلوط مستر میکس مورد نیاز برای PCR | 480 µL x 4 |
| BCR ABL1 QL (P210) Primer & Probe Mix 1 | پرایمر و پروب مخصوص شناسایی Major-BCR-ABL1 | 24 µL |
| BCR ABL1 QL (P190) Primer & Probe Mix2 | پرایمر و پروب مخصوص شناسایی Minor -BCR-ABL1 | 24 µL |
| BCR ABL1 QL (P230) Primer & Probe Mix3 | پرایمر و پروب مخصوص شناسایی Micro -BCR-ABL1 | 24 µL |
| ABL1 QL Primer & Probe Mix4 | پرایمر و پروب مخصوص شناسایی ABL1 | 24 µL |
| BCR ABL1 QL Positive Control(PC) | Positive Control | 200 µL |
| BCR ABL1 QL RNase Free water | RNase Free water | 1500 µL |

جدول 2

❖ **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 Qualitative Detection**

کیت RTP BCR ABL1 Qualitative Detection 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

❖ **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 RNA 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 این مقدار نشان دهنده وجود آلودگی پروتئینی است.
- برای انجام آزمایش غلظت نمونه RNA می بایست 1 µg 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) |
|---|---|
| BCR ABL1 QL RT Mix | 8 µL |
| BCR ABL1 QL Enzyme Mix | 1 µL |
| BCR ABL1 QL Primer Mix | 5 µL |
| BCR ABL1 QL Enhancer Mix | 0,5 µL |
| Total reaction volume | 15 µL |

جدول 3

- 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 (Control) |
|---|---|---|
| Prepared Reaction Mix | 14.5 µl | 14.5 µl |
| sample RNA | 10.5 µl (10µg) | - |
| cDNA Control | - | 10 µl |
| RNAase free water | - | 0.5 µl |
| Total | 25 µl | 25 µl |

جدول 4

- سپس جهت اطمینان از مخلوط شدن اجزای واکنش ویال ها را چند بار سر و ته نموده و سانتریفیوژ نمایید.
- سپس جهت انجام واکنش سنتز cDNA ویال های را در دستگاه PCR قرار دهید.

❖ **برنامه زمانی و دمایی دستگاه**

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

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

جدول 5

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 QL 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 QL 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.

حال مطابق جدول زیر مخلوط واکنش را آماده نمایید.

| معرف | Tube1 | Tube2 | Tube3 | Tube4 |
|---|---|---|---|---|
| BCR ABL1 QL Master Mix (2x) | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl |
| BCR ABL1 QL (P230) Primer & Probe Mix 1 | 1 µl | - | - | - |
| BCR ABL1 QL (P190) Primer & Probe Mix2 | - | 1 µl | - | - |
| BCR ABL1 QL (P210) Primer & Probe Mix3 | - | - | 1 µl | - |
| ABL1 QL 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 6

- سپس جهت اطمینان از مخلوط شدن اجزای واکنش ویال ها را چند باز سرو ته و پیپتاژ نمایید.
- سپس 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، 3 سری برای کنترل مثبت ، کنترل منفی وcDNA کنترل نیز آماده نمایید.
- از cDNA نمونه به میزان 5 µl به هر 4 ویال مسترمیکس مربوط به نمونه اضافه نمایید.
- از ویال کنترل مثبت به میزان 5 µl به هر 4 ویال مسترمیکس مربوط به کنترل مثبت اضافه نمایید.
- برای کنترل منفی 5 µl آب Nuclease Free به هر 4 ویال مسترمیکس مربوط به کنترل منفی اضافه نمایید.
- برای cDNA کنترل به میزان 5 µl به هر 4 ویال مسترمیکس مربوط به cDNA کنترل اضافه نمایید.
- سپس جهت اطمینان از مخلوط شدن اجزای واکنش ویال ها را چند باز سرو ته نموده و سانتریفیوژ نمایید. سپس جهت انجام واکنش PCR ویال های را در دستگاه Real-Time PCR قرار دهید.

- جدول زیر به طور خلاصه نحوه آماده سازی ویال های واکنش را نشان می دهد.

| | Tube1 | Tube2 | Tube3 | Tube4 |
|---|---|---|---|---|
| Samples | N | N | N | N |
| Positive Control | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NTC | 1 | 1 | 1 | 1 |
| cDNA Control | 1 | 1 | 1 | 1 |
| No. of Reactions | N+3 | N+3 | N+3 | N+3 |

جدول 7

### ❖ 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 8

کانال های دستگاه را مطابق جدول زیر انتخاب نمایید.

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

Passive Reference Dye-ROX

جدول 9

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

| S. No. | Applied Biosystem | Threshold value range |
|---|---|---|
| 1 | FAM | 0.1-0.5 |

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 PCR 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.

❖ **تفسیر داده ها**

- **آنالیز واکنش های مربوط به کنترل مثبت و منفی**

| کنترل ها | Ct در کانال FAM | تفسیر داده |
|---|---|---|
| کنترل منفی | هر گونه Ct | - آلودگی: آزمایش دوباره تکرار شود. امکان آنالیز نتایج نمونه وجود ندارد. |
| کنترل مثبت | 18±4 | - تست درست انجام شده و امکان ارزیابی نتایج نمونه وجود دارد<br>- اشتباهی در نحوه ی ست آپ واکنش و یا ست آپ PCR رخ داده و امکان آنالیز نتایج نمونه وجود ندارد. |
| نمونه ها | 18≤Ct≤27 | - تست درست انجام شده و امکان ارزیابی نتایج نمونه وجود دارد. |
| | Ct>27 | - اشتباهی در نحوه ی ست آپ واکنش و یا ست آپ PCR رخ داده و امکان آنالیز نتایج نمونه وجود ندارد. |

جدول 10

**نمونه مورد آزمایش**: جهت اطمینان از کیفیت مناسب نمونه، در تمامی نمونه های مورد آزمایش می بایست در ویال شماره 4 (مربوط به ژن کنترلی ABL1) منحنی تکثیر در سیکل زیر 27 مشاهده گردد. چنانچه منحنی تکثیر در ویال شماره 4 در برخی نمونه ها مشاهده نشد میتواند به یکی از دلایل زیر باشد:

1- وجود اتانول و یا نمک در نمونه استخراج شده که بدلیل استخراج نادرست RNA می باشد.
2- انجام نادرست مرحله ی رونوشت برداری معکوس و یا qPCR

**کنترل cDNA**: وجود cDNA کنترل، امکان ارزیابی کیفیت انجام مرحله رونوشت برداری معکوس و تکثیر ژن کنترلی ABL1 را میسر می نماید. چنانچه منحنی تکثیر در ویال شماره 4 (ABL1) در سیکل پایین تر از 27 مشاهده نگردد، نتایج واکنش فاقد اعتبار بوده و قابل ارزیابی نمی باشد. چنانچه در ویال های 1، 2 و 3 تکثیری مشاهده شد نشان دهنده ی تکثیر کاذب و آلودگی بین ویال هاست.

**Cutoff**: واکنش در 45 سیکل انجام می گیرد لیکن نباید هر گونه تکثیر پس از سیکل 34 به عنوان نمونه ی مثبت در نظر گرفت به همین دلیل Cutoff واکنش Ct 34 می باشد.

❖ **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 11

* بدلیل وجود اگزون 1 در نمونه های مثبت P210 BCR-ABL1 ، 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.

❖ **ارزیابی عملکرد کیت**

- کمترین حد شناسایی موتاسیون (LOD): 10 کپی نامبر از رونوشت فیوژن BCR-ABL
- آستانه بلانک (LOB): سیکل 40 ( Ct 40)
- حساسیت بالینی: 97.78 درصد
- اختصاصیت بالینی: 98.82 درصد
- میزان پیش بینی مثبت[2]: 98.88 درصد
- میزان پیش بینی منفی[3]: 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<br>- پیپتاژ ویال کنترل مثبت در آخرین مرحله<br>- 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 |
| - دقت در اضافه کردن تمامی مواد مورد نیاز در ویال<br>- بررسی تمامی مراحل انجام کار بخصوص بررسی احتمال خطای سرسمپلر<br>- درج نام نمونه ها روی تمامی ویال های 1/5ml میکروسانتریفیوژ و ویال PCR<br>- بررسی شرایط نگهداری و تاریخ انقضای مندرج بر روی لیبل ویال کنترل مثبت و استفاده از ویال جدید<br>- چک کردن پروفایل دمایی داده شده به دستگاه دستورالعمل داخل کیت | - درست کردن اشتباه مخلوط واکنش<br>- عدم اضافه نمودن و یا اضافه کردن ناکافی کنترل مثبت<br>- اضافه کردن اشتباه DNA نمونه در ویال کنترل مثبت<br>- شرایط نگهداری نامناسب کنترل مثبت و یا استفاده از کنترل مثبت تاریخ مصرف گذشته<br>- تنظیم اشتباه پروفایل دمایی و زمانی دستگاه | عدم مشاهده تکثیر در نمونه کنترل مثبت |

جدول 12

[2] Positive Predictive Value
[3] Negative Predictive Value

❖ **هشدار ها:**

- 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.
- 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.
- RNA نمونه استخراج شده را در دمای 20 - درجه سانتیگراد نگهداری نمایید و در حین انجام آزمایش بر روی کول رک[۴] قرار دهید.
- 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.

از کیفیت جمع آوری نمونه و استخراج آن، پیش از آغاز آزمایش اطمینان حاصل نمایید

- 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
- کیت RTP BCR ABL1 Qualitative detection صرفا جهت سنجش کیفی رونوشت های موتانت می باشد. جهت ارزیابی کمی می بایست از کیت RTP BCR ABL1 Quantitative detection استفاده نمایید.
- 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.

[۴] Cool rak