بِسْمِ اللهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

بیمارستان فوق تخصصی ساسان

بولتن علمی

بخش مولکولی آزمایشگاه

بیمارستان تخصصی و فوق تخصصی ساسان

همکار محترم و ارجمند

با کمال خوشوقتی به اطلاع میرساند که بخش مولکولار پاتولوژی و تشخیص مولکولی بیمارستان ساسان افتتاح و آماده بهره برداری گردیده است. در این بولتن لیستی از آزمایشات در دسترس همراه خلاصه ای از تفاسیر و مسائل مربوط به هر آزمایش، به همراه میزان صحت و دقت آنها تقدیم می گردد. همچنین درباره اصول تئوری و بنیادی تست های مولکولی و PCR توضیحاتی ارائه خواهد شد. البته چنانچه همکاران محترم مایل به مطالعه دقیق تر باشند، رفرانس های مربوطه در پایان هر موضوع آورده شده است .

بخش اول

۱- تاریخچه

زمانی که غواصان اروپایی در زیر دریاهای سرزمین آتش (منتهی الیه جنوب شیلی) در آمریکای جنوبی در سال ۱۹۶۵ میلادی درباره نرم تنان و باکتری های اطراف آتش فشان های زیر اقیانوس اطلس مطالعه می کردند، اصلا فکرش را هم نمی کردند که در حال کشف بزرگ ترین رازهای طبیعت هستند که ۲۰ سال بعد می توانست کل علم پزشکی و ژنتیک و باکتریولوژی را دگرگون کند.

آنها باکتری هایی را یافتند که آنزیم مربوط به دوباره سازی DNA آنها موسوم به DNA-Polymerase می توانست تا دمای 96 درجه فعال باقی بماند. آنزیمی که یکی از عناصر کلیدی تست واکنش زنجیره ای پلی مراز Polymerase chain reaction موسوم به PCR شناخته شده و به این آنزیم Taq-polymerase گفته می شود. در سال ۱۹۸۵، Southus / Westernروش موسوم به Western Blot را ابداع کرد و سال بعد عملا ایده تست PCR به ثمر نشست و طی ۳۵ سال گذشته توسعه یافته و روش های متعددی ایجاد شده است که برای هر کدام از الکل های ژنتیکی و در شرایط ویژه کاربرد دارند.

۲-اصول انجام تست PCR

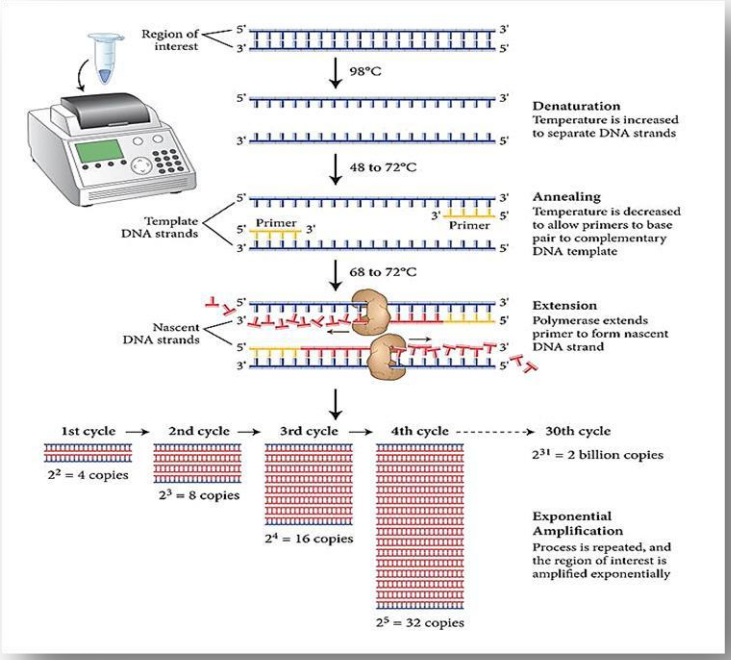
فرض کنید ما می خواهیم بدانیم که در نمونه حلق یک بیمار ویروسCovid-19 وجود دارد یا خیر. میتوانیم ویروس را کشت دهیم (که نیاز به تجهیزات بسیار پیچیده ای دارد) و بسیار خطرناک است و انجام آن در لابراتوارهای بسیار پیشرفته هم غیرممکن است!

در اوایل دهه ۹۰ تشخیص قطعی HIV و یا HCV نیز به همین شکل بود. ایده اصلی این است که بجای کشت می توانیم RNA ویروس (مثلا در Covid) و یا DNA باکتری (مثلا در MTb) و یا بخشی از DNA زنومی یک سلول سرطانی را بررسی کنیم. بنابراین می بایست DNA و یا RNA را پیدا کنیم که درست همانند پیدا کردن سوزن در انبار بزرگ کاه بوده و واقعا تصور آن وحشتناک است!

حال اگر روشی پیدا کنیم که سوزن ها تکثیر شوند پیدا کردن آنها بسیار آسان تر می شود. در حقیقت در روش PCR ما کاری می کنیم که قسمتی از RNA ویروس و یا DNA باکتری یا سلول تکثیر شود و به میزان قابل رویت و یا قابل اندازه گیری برسد و آنگاه آنرا شناسایی می کنیم. برای روشن تر شدن موضوع مراحل به شرح زیر انجام می شود:

- استخراج DNA یا RNA از سلول / باکتری / ویروس ... (DNA/RNA extraction) انجام می شود که بر اساس نوع نمونه، روش های اختصاصی متعدد و استاندارد دارد.
- جهت بررسی صحت استخراج، غلظت RNA/DNA با دستگاه Nano-drop از طریق سنجش میزان جذب نوری اندازه گیری می شود.
- استفاده از دستگاه Thermocycler برای ایجاد چرخه دمایی جهت تکثیر ناحیه مورد نظر در زن هدف به روش PCR
- عملکرد PCR بر سه اصل ساده استوار است، ۱-دناتوره شدن DNA دو رشته ای در مرحله دناتوراسیون (Denaturation).۲-اتصال پرایمرهای اختصاص توالی در مرحله اتصال (Annealing) و ۳- تکثیر توالی هدف با ورود آنزیم DNA پلیمرازدر مرحله گسترش (Extension)، نتیجه این چرخه سه مرحله‌ای سنتز دو مولکول جدید DNA است، بدین ترتیب سنتز DNA جدید به صورت تصاعدی ادامه می‌یابد یعنی ۴ برابر و سپس ۸- ۱۶ - ۳۲ و... برابر شده تا اینکه یکی از مواد تشکیل‌دهنده محیط واکنش کاهش یابد و غیرفعال شود. از نظر تئوری بعد از ۲۰ سیکل ۱ میلیون و بعد از ۳۵ سیکل حدود ۶۸ میلیارد کپی حاصل می‌گردد.

شکل زیر مراحل را به خوبی نشان می دهد.



اصول سیکل هاي افزایش و تکثیر DNA

۳-آزمایشگاه بیمارستان ساسان

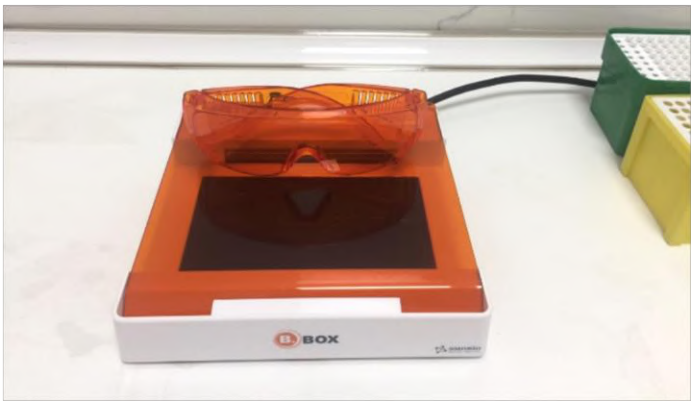
بخش مولکولی آزمایشگاه بیمارستان فوق تخصصی ساسان، با بهره گیری از تجهیزات تخصصی و نیروی متخصص و مجرب، تست های مولکولی را در زمانی کوتاه و با دقت بالا به انجام می رساند.

معرفی دستگاه ها:

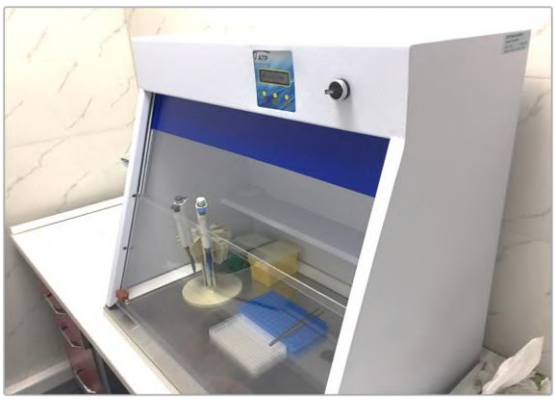
دستگاه **Thermal cycler**

دستگاه **Real time PCR**

دستگاه هود بیولوژیک کلاس II برای استخراج DNA



Transilluminator



Workstation

بخش دوم

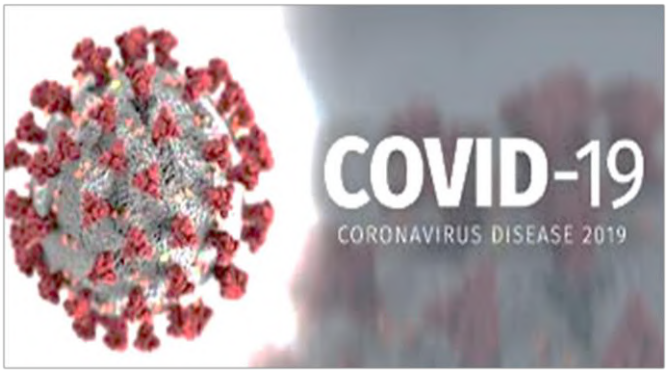
آزمایشات تشخیص مولکولی بیماری های ویروسی باکتریایی قارچی و انگلی

-Medthod: Rt-PCR

-Instroment: Real-time PCR

-Sensitivity: 100 %

-Specificity: 95 %



کرونا ویروس سندرم حاد تنفسی ۲ (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) یا (SARS-COV-2 (یک RNA ویروس تک رشته‌ای سو مثبت و عامل بیماری کروناویروس ۲۰۱۹ یا کووید-۱۹ است. بررسی احتمال ابتلا به بیماری کرونا به دو روش سرولوژی و مولکولی انجام می گیرد. روش سرولوژی حضور آنتی بادی علیه ویروس را در خون می سنجد. بدن هنگام مبارزه با عفونتی مانند کووید-۱۹ آنتی بادی ها را تولید می کند. آزمایش آنتی بادی وجود خود ویروس را بررسی نمی کند و صرفا اینکه سیستم ایمنی یا سیستم دفاعی بدن در برابر بیماری به عفونت پاسخ داده یا خیر را بررسی می کند. برای بررسی وجود ویروس، ژنوم آن در خون شناسایی می شود. برای دست یابی به این هدف از روش مولکولی Real time PCR استفاده می شود.

تفسیر آزمایشات

به دلیل نوپدید بودن این ویروس و امکان وجود سویه های متفاوت و امکان عمل نکردن پرایمر های آن و همچنین اشکالات نمونه برداری از بینی و حلق میزان حساسیت تست بسیار متغیر بوده و به شرح زیر تا این تاریخ june 21-99 اعلام گردیده است:

- **حساسیت نمونه برداری از حلق و بینی = ۷۲٪**
- **حساسیت نمونه برداری از خلط = ۸۰٪**
- **حساسیت نمونه BAL = ۸۵٪**

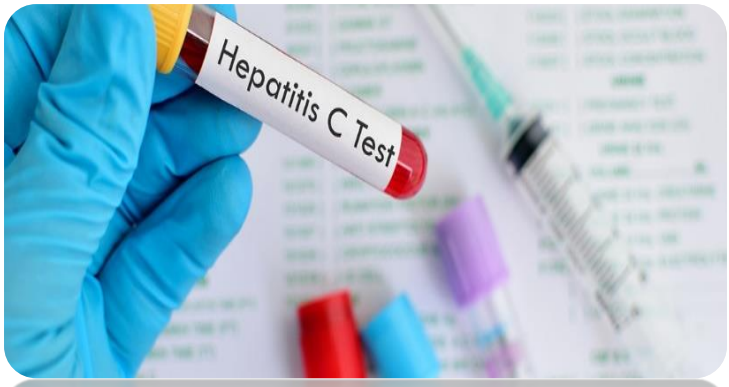
منابع

1. "Q&A on coronaviruses (COVID-19)". World Health Organization. 17 April 2020. Archived from the original on 14 May 2020. Retrieved 14 May2020.

2."Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)". U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 11 February 2020. Archived from the original on 4 March 2020. Retrieved 26 March 2020

HCV Quality and Quantity

هپاتیت C یکی از مهم ترین عوامل ایجاد هپاتیت مزمن در کشورهای توسعه یافته است. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی(WHO) بین ۲۱۰ -۱۳۰ میلیون نفر در دنیا مبتلا به هپاتیت C هستند . سالانه ۳۵۰۰۰۰ نفر به دلیل ابتلا به این بیماری از دنیا میروند . این مبتلایان در اروپا، آمریکا و بسیاری از نقاط مختلف دنیا مشاهده می شوند ویروس هپاتیتC (HCV) عضوی از جنس هپاسی ویروس و متعلق به خانواده فلاوی ویریده است . ژنوم این ویروس به صورت RNAتک رشته ای با پلاریته مثبت است. اختلاف در ژنوم ویروس منجر به شناخت ۶ ژنوتیپ اصلی و بیش از ۵۰ تحت تیپ شده است.



متداول ترین تست ها بر اساس تعیین آنتی بادی سرمی علیه آنتی ژنهای HCV استوار است؛ اما نکته ای که در رابطه با روشهای سرولوژیک وجود دارد، آن است که این تستها فقط ابتلا به هپاتیت C را نشان داده و تمایزی بین عفونتهای حاد، مزمن و یا بهبود قائل نمی شوند. همچنین قادر به ردیابی بیماران در فاز پنجره(period Window) نمی باشند . بنابراین در چنین شرایطی لازم است از HCV RNA برای ارزیابی دقیق فعالیت و تکثیر ویروس استفاده شود. تعدادRNA ویروسی موجود در خون حاوی اطلاعات لازم برای ساختن ویروسهای بیشتر می باشد. از آنجایی که تکثیر فعال ویروس در تمام مراحل بالینی بیماری اتفاق میافتد، احتمال شناسایی و سنجش کمی ویروس در تمام مراحل عفونت وجود دارد. بنابراین تعداد کپی RNA ویروس هپاتیت C به عنوان شاخصی مهم برای بررسی وضعیت بالینی بیماران آلوده، آگاهی از وضعیت پیشرفت بیماری، برای فهم سیر طبیعی و مطالعه پاتوژنز عفونت HCV و نیز ارزیابی اثر داروهای ضد HCV مورد استفاده قرار گرفته است.

از این رو روشهای مولکولی مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک برای آنالیز RNA ویروس HIV مورد استفاده قرار می گیرند.

تکنیک RT-PCR جهت تشخیص کیفی ژنوم ویروس مـی توانـد فـاز پنجره ویروس را با تشخیص زود هنگام RNA آن و قبل از به وجود آمدن آنتی بادی، به میزان قابل توجهی کوتاه کنـد. تکنیک Real Time PCR نیز با بررسی کمی ویروس با دقت و حساسیت بالا به منظور سـنجش بـار ویروسـی بیمـاران آلـوده بـهHCV و بررسی پاسـخ به درمان ضد ویروسی در آزمایشگاه تشخیص مولکولی مورد استفاده قرار می گیرد.

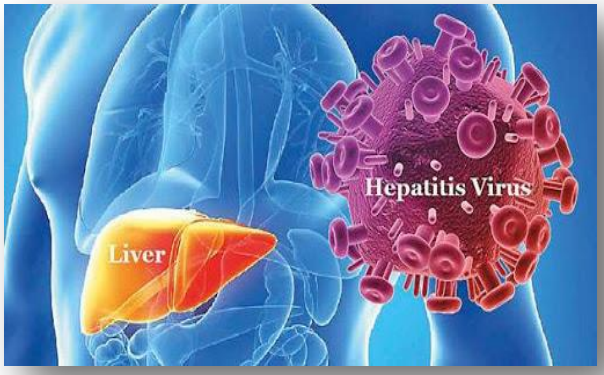
نمونه مورد نیاز: سرم یا پلاسما

منابع:

1.Mahmoodian Shooshtari M, Bahrami H, Sharifi Z. Molecular study of HCV RNA among anti-HCV negative blood donors. Sci J Iran Blood Transfus Organ. 2009; 6 (3) :191-198
URL: http://bloodjournal.ir/article-1-347-fa.html

2.Shahzamani K, Esmaeil Lashgarian H, Papi O A, Mokhayeri H. The quantification of hepatitis C viral load using an In-House Real-Time PCR assay in HCV infected patients in Khorramabad city. yafte. 2016; 18 (1) :17-27
URL: http://yafte.lums.ac.ir/article-1-2211-fa.html

HBV Quality and Quantity



عامل ویروس هپاتیت B به خانوادهای از ویروسهایDNA دار به نام هپادناویروسها (hepadnoviruses)تعلق دارد.

هپاتیت B ،تنها ویروس هپاتوتروپیک انسانی با ژنومDNA است. این ویروس دارای پوشینه(Envelop) است و قطری حدود ۴۲ نانومتر دارد. این مولکول DNA حلقوی معمولا یک رشته ای است، ولی در برخی نواحی ، دورشته ای می باشد.

هپاتیت B یکی از مهمترین بیماری های ویروسی است که در تمام نقاط دنیا از شیوع بالایی برخوردار است. حدود ۴۰۰ میلیون ناقل هپاتیت B در کل دنیا وجود دارد. هر ساله نزدیک به ۱ میلیون نفر جان خود را به علت عواقب ناشی از عفونت به این ویروس از دست می دهند. هپاتیت Bیکی از عمده ترین مشکلات بهداشتی در جهان به شمار می رود و علاوه بر اثرات ازکارافتادگی (morbidity) در بیماران مبتلا به هپاتیت مزمن B ، این افراد در معرض خطر ابتلا به سیروز کارسینوم هپاتوسلولار (HCC) قرار دارند. تاکنون 8 ژنوتیپ (H-A) ویروس هپاتیت B شناسایی شده است .از آنجا که این ویروس یکی از شایع ترین عوامل عفونی در دو دهه اخیر بوده که تا کنون درمان قطعی برای آن بدست نیامده و تنها به واسطه شناخت افراد مبتلا و رعایت نکات بهداشتی می توان بیماری را کنترل و پیشگیری کرد، لذا کاربرد روشی جهت تشخیص سریع بیماری جهت جلوگیری از انتشار بیماری بسیار کمک کننده خواهد بود و به این ترتیب عامل بیماری زا در مراحل اولیه قابل شناسایی خواهد بود.

حساس ترین روش های سرولوژیکی برای یافتن آنتی ژن های HBV و آنتی بادی های آن رادیوایمنواسی و الایزا است که واکنش بر مبنای برهم کنش اولیه بین آنتی ژن – آنتی بادی صورت می گیرد. وقوع موتاسیون در مولکول های آنتی ژن و یا آنتی بادی سبب کاهش حساسیت تشخیص این روش ها می شود. بعلاوه روشهای تشخیص بر مبنای آنتی بادی در مراحل اولیه بیماری قابلیت تشخیص نداشته و زمان نسبتا زیادی بعد از آلودگی قادر به تشخیص عامل بیماریزا می باشند. روش های تشخیص مولکولی بر مبنای جداسازی و تکثیر اسیدهای نوکلئیک ویروس، قادر به تشخیص بیماری در مراحل اولیه آلودگی است.

روش انجام تست

شناسایی DNA ویروس در نمونه سرم یا پلاسمای بیمار به روش کیفی با تکنیک PCR انجام می گیرد و تشخیص کمی به عنوان شاخصی برای تشخیص عفونت حاد، پیش بینی احتمال انتقال ویروس، پیش بینی میزان پیشرفت بیماری در بیمارانی که به طور مزمن آلوده هستند و برای ارزیابی تأثیر درمان در افرادی که در حال درمان با داروها هستند با تکنیک Real time PCR با دقت و حساسیت بالا انجام می شود.

نمونه مورد نیاز: سرم یا پلاسما

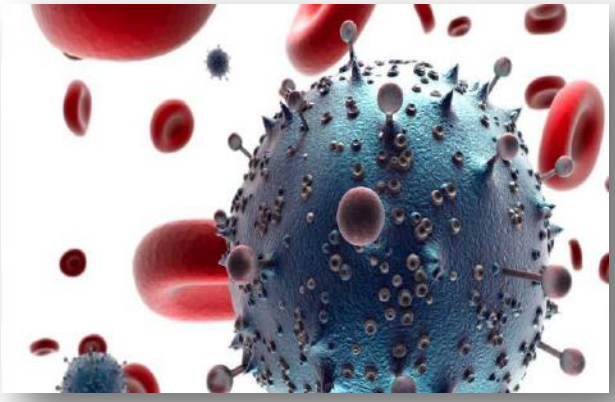
منابع:

1.http://zums.ac.ir/files/microbiology/pages/eBook

2.Hassan Shahhosseiny1 M, Zahedi N, moslemi E. Internal Control (IC) Construction of Molecular Diagnosis of Hepatitis B Virus by PCR-Cloning . NCMBJ. 2014; 3 (12) :9-16 URL: http://ncmbjpiau.ir/article-1-437-fa.html

3.Gholami Parizad E, Gholami Parizad E, Delpisheh A, Nikfar M. Determination of HBV-DNA copies in serum and cerumen in chronic hepatitis B patien (CHB)by RealTtime PCR method and Its relationship with some epidemiological variables. Iran J Med Microbiol. 2012; 5 (4) :42-51

HIV Quality and Quantity test



ویروس نقص ایمنی اکتسابی تیپ یک (HIV-1) عامل ایجاد کننده سندرم نقص ایمنی اکتسابی انسانی(ایدز) می باشد، ایدز نوعی بیماری است که با ورود ویروس و حمله به دستگاه ایمنی توسط ویروس نقص ایمنی (HIV) ایجاد می‌شود.

بیماری ناشی از ویروس HIV دارای سه مرحله اصلی است. در مرحله اول (عفونت حاد)، فرد ممکن است برای مدت کوتاهی بیماری شبه آنفلوآنزایی را تجربه کند که در همه افراد قطعی نیست. به همین دلیل معمولاً این بیماری تا یک دوره طولانی بدون هیچ علائمی دنبال می‌شود که به این مرحله از بیماری، دوره نهفتگی گفته می‌شود. هر چقدر که بیماری پیشرفت یابد، ضعف بیشتری در دستگاه ایمنی بدن پیدا می‌کند و باعث می‌شود که افراد به عفونت‌هایی مانند عفونت و سرطان‌های فرصت‌طلب و تومور دچار شوند، البته معمولاً در افرادی که دستگاه ایمنی آن‌ها به خوبی عمل می‌کند تأثیرگذار نیست. در نهایت بیماری زمانی وارد مرحله سوم یا ایدز خواهد شد که شمار سلول‌های $CD4^+$ T به کمتر از ۲۰۰ سلول در هر میکرولیتر برسد.

طبق آمار موجود در سراسر جهان بطور متوسط روزانه ۱۳۵۰۰ نفر بر تعداد مبتلایان بیماری ایدز افزوده می شود. لذا با توجه به اهمیت بیماری و گسترش روزافزون آن نیاز به روش های تشخیصی با کارآیی بالاتری است تا بتوان از حجم فزاینده مبتلایان به بیماری کاست و یا آن را متوقف کرد. روش شایع و اصلی تشخیص عفونت HIV-1 ، ردیابی سرولوژیک آنتی بادیهای اختصاصی علیه این ویروس در سرم افرد بیمار است. روشهای سرولوژیک دارای محدودیتهایی نیز می باشند. از جمله مهمترین محدودیتهای روشهای سرولوژی عدم تشخیص موارد عفونی در دورهٔ پنجره (Period Window) و زمانی است که هنوز شاخصهای ایمنی شناختی بیمار بالا نرفته است. یکی دیگر از محدودیتهای روشهای سرولوژی وجود آنتی بادی مادری و عدم امکان ارزیابی عفونت در نوزادان متولد شده از مادران HIV-1 مثبت می باشد. در این شرایط، روشهای مولکولی از جمله PCR-RT و Real time-RT PCR روشهای مناسب برای تشخیص عفونت HIV-1 هستند از روش PCR Nested-RT به عنوان آزمایش تشخیصی کیفی و بـا

حساسیت بالا برای تعیین حضور ژنوم ویروس در نمونه بیمار استفاده می شود. تعیین تعداد کپی RNAویروس نیز با تکنیک Real time-RT PCR ، به عنوان شاخصی برای تشخیص عفونت حاد، پیش بینی احتمال انتقال ویروس، پیش بینی میزان پیشرفت بیماری در بیمارانی که به طور مزمن آلوده هستند و برای ارزیابی تأثیر درمان در افرادی که در حال درمان با داروهای ضد رترو ویروسی هستند، از اهمیت بسزایی برخوردار است. (تعیین عیار RNA HIV باید قبل از شروع به درمان و همچنین در فواصل توصیه شده به پزشکان براساس دستورالعمل های مراجع بین المللی و ملی بهداشتی انجام پذیرد).

نمونه مورد نیاز: پلاسما

منابع:

1.Nourbazargan H, Nadji A, Mirab Samiee S, Paryan M, Mohammadi-Yeganeh S. Design and development of TaqMan Real-time PCR assay for detection and viral load determination of HIV-1 . Research in Medicine. 2018; 42 (3) :182-188
URL: http://pejouhesh.sbmu.ac.ir/article-1-1855-fa.html

2.Douzandeh J, Ravanshad M, Amel Jamehdar S, Sabahi F. Development of a sensitive RT-Nested PCR for detection of HIV-1 . Sci J Iran Blood Transfus Organ. 2007; 3 (4) :309-315
URL: http://bloodjournal.ir/article-1-119-fa.html

3.Sepkowitz KA. AIDS--the first 20 years. *N Engl J Med*. 2001;344(23):1764-1772. doi:10.1056/NEJM200106073442306

ویروس پاپیلومای انسانی (HPV)

ویروس پاپیلومای انسانی که به آن HPV گفته می شود، شایع ترین عفونت مقاربتی (STI) است. متاسفانه اکثر بیماران آلوده به عفونتHPV ، اطلاعی از بیماری خود ندارند. اگرچه مکانیسم های دقیق انتقال ویروس از فردی به فرد دیگر هنوز شناخته نشده است اما معمولاً از راه تماس جنسی به خصوص تماس تناسلی یا مقعدی منتقل می گردد. البته احتمال انتقال ویروس از راه ارتباط دهانی تناسلی نیز امکان پذیر است. در افراد هموسکسوال نیز امکان انتقال وجود دارد. افراد مبتلا می توانند سال ها بدون علامت باشند و در این مدت، ویروس را به شریک جنسی خود منتقل کنند. امکان دارد یک فرد به بیش از یک ویروس HPV مبتلا شود. به صورت خیلی نادر امکان انتقال ویروس از مادر باردار مبتلا به نوزاد خود حین زایمان واژینال وجود دارد .

این ویروس DNA یی دو رشته ای و حلقوی به طول 8Kb طول دارد و به سه ناحیه اصلی early، late و ناحیه طویل کنترلی LCR یا ناحیه غیر کد کننده (NCR) تقسیم می شوند. پاپیلوما ویروس ها همانندسازی می کنند و منحصرا در هسته ها جمع می شوند. بیان ژن ویروس منجر به بیان ۶ پروتئین ویروسی تنظیمی و غیر ساختاری شامل (E7 و E1, E2, E4, E5, E6) می شود. پروتئین های E5، E6 و E7 انکوژن های ویروسی هستند و بیان آن ها نامیرایی سلول و تغییر و ترنسفورماسیون سلول را تحریک می کند. به طور خاص E6 و E7 دو انکوپروتئین ویروسی هستند که به ترتیب P53 و pRb که دو پروتئین سلولی مهار کننده تومور هستند را غیر فعال می کنند.

بیش از ۱۵۰ ژنوتایپ HPV شناخته شده است و تقریبا ۶۰ تایپ آن موجب عفونت مجرای تناسلی از جمله عفونت گردن رحم می شود. . تایپ های اصلی HPV نظیر HPV-16 و -HPV 18 و HPV-31 که تایپ های پر خطر یا انکوژن می باشند به عنوان عوامل مسبب سرطان رحم و مقعد شناخته شده اند. دیگر تایپ های HPV که به عنوان کم خطر یا غیرانکوژنی نامیده می

شوند نظیر HPV-6 و HPV-11 ضایعات و زگیل خوش خیم را تحریک می کنند و بسیار به ندرت در بدخیمی های تناسلی یافت می شوند.

آزمایشات مولکولی در حال حاضر پیشرفته‌ترین و دقیق‌ترین راه تشخیص ابتلا به HPV است که با استفاده از پرایمرها و پروب های اختصاصی برای تشخیص ژنوم HPV به کار می‌رود(Screening). بعلاوه با این روش می توان تایپ های مختلف HPV را در افراد بیمار و حتی در افراد به ظاهر سالم شناسایی نمود(Genotyping).

نمونه مورد نیاز:

نمونه واژینال یا wart در خانم ها در ظرف حاوی مواد نگهدارنده

نمونه urethral ، ادرار، wart در آقایان در ظرف حاوی مواد نگهدارنده

منابع:

1.Graham SV. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiol*. 2010;5(10):1493-1506. doi:10.2217/fmb.10.10

2.https://www.who.int/biologicals/areas/human_papillomavirus/en/

HSV-1 & HSV-2

ویروس هرپس سیمپلکس (HSV) ویروس هایی از خانواده هرپس ویریده هستند که دارای ژنوم DNA دو رشته ای خطی هستند که در یک پوشش پروتئینی به نام کپسید قرار می گیرد و سپس لایه ای به نام تگومنت کپسید را می پوشاند و در نهایت دو لایه لیپیدی به نام انولوپ از ویروس محافظت می کند.
این دو لایه لیپیدی حاوی گلیکوپروتئین هایی هست که در اتصال و ورود ویروس به سلول میزبان نقش موثری دارند.

هرپس سیمپلکس؛ عفونت ویروسی شایعی است که از طریق تماس با ترشحات مخاطی آلوده منتقل می شود .ویروس هرپس به دو نوع تقسیم بندی می شود HSV-1, HSV-2 :که نوع ۱ بیشتر به هرپس دهانی و نوع ۲ به هرپس ژنیتال یا تناسلی معروف است. شایع ترین مشکلاتی که هرپس ۱ ایجاد می کند شامل: تب خال دهانی و لبی است و هرپس نوع ۲ باعث ایجاد زخم در ناحیه تناسلی می شود. دوره کمون این بیماری یک هفته است. بین HSV-1 و HSV-2 شباهت های زیادی وجود دارد که باعث می شود افتراق بالینی آن‌ها بسیار مشکل باشد.

متاسفانه ویروس هرپس حتی وقتی هیچ علامتی از بیماری وجود ندارد می‌تواند به دیگران منتقل شود و بسیار مسری است.

HSV-1 از طریق ترشحات یا زخم روی پوست و از طریق بوسیدن، اشتراک مسواک یا خوراکی نیز می تواند منتقل شود.

HSV-2 عموما از طریق تماس جنسی با فرد آلوده منتقل می شود. از آنجایی که-HSV 2می‌تواند از طریق مادر به نوزاد در حین تولد منتقل شود، زنان باردار مبتلا به هرپس تناسلی باید تحت نظر پزشک باشند و حتی ممکن است به انجام سزارین توصیه شوند.

طبق آمار منتشر شده توسط انجمن بهداشت جنسی آمریکا، حدود ۵۰ درصد بالغین در ایالات متحده آلوده به هرپس ویروس تیپ ۱ و حدود ۱۷ درصد آلوده به هرپس ویروس تیپ ۲ میباشند. از آنجایی که علائم میتواند خفیف باشد ممکن است ۹۰ درصد از افرادی که آلوده به هرپس

ویروس تیپ ۲ میباشند از عفونت خود آگاه نباشند. افرادی که دارای سیستم ایمنی سرکوب شده هستند مثل افراد مبتلا به HIV/AIDS و کسانی که پیوند عضو داشته اند، ممکن است شیوع بیشتری از هرپس سیمپلکس را تجربه نمایند.

روش های تشخیص HSV

کشت ویروس:

سلول و یا مایع از زخم تازه بوسیله سواب گرفته و به محیط کشت منتقل می شود. معمولا کشت در بررسی این ویروس موفق نمی باشد. (نتیجه منفی کاذب)

تست سرولوژیکی:

در این روش مثل الایزا، وجود آنتی بادی علیه ویروس در نمونه خون مورد بررسی قرار می گیرد.

تعیین آنتی ژن ویروسی:

در این روش که به کشت سلولی نیز ارجعیت دارد. در این روش نمونه جمع آوری شده از سلول های محل ضایعه بیمار با سواپ روی اسلاید فیکس می شود و با آنتی بادی نشاندار شده با مواد فلورسنت رنگ آمیزی می شود (روش فلورسنت مستقیم (DFA) و سپس با میکروسکوپ فلورسنت بررسی می شود.

آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) :

آزمایش PCR بر روی سلول ها و یا مایعاتی که از یک زخم و یا از خون و یا دیگر مایعات مثل مایع نخاعی گرفته شده است، انجام می شود. آزمایش PCR ماده ژنتیکی (DNA) ویروس HSVرا مورد بررسی قرار می دهد. این آزمایش قادر است HSV-1 را از HSV-2 تشخیص دهد. انجام آزمایش PCR بر روی زخم های پوستی ناشایع است. PCR معمولا وقتی که هرپس ویروس وارد مغز می شود، بر روی مایع نخاعی انجام می شود.

روش انجام تست مولکولی:

عفونت با هرپس ویروس ها نمی تواند درمان شود. بعد از ابتلا به عفونت، HSV ویروس برای همیشه در بدن باقی می ماند و در سلول های عصبی پنهان شده و باعث بروز زخم در سایر افراد می شود. بنابراین تشخیص ویروس برای پیشگیری از انتقال و توسعه آن از اهمیت بالایی

برخوردار است. شناسایی DNA ویروس درنمونه بیمار به روش کمی با تکنیک PCR انجام می گیرد و تشخیص کمی به عنوان شاخصی برای تشخیص عفونت حاد، پیش بینی احتمال انتقال ویروس، پیش بینی میزان پیشرفت بیماری در بیمارانی که به طور مزمن آلوده هستند با تکنیک Real time PCR با دقت و حساسیت بالا انجام می شود.

نمونه مورد نیاز:

5ml خون حاوی EDAT ، پلاسما

3ml مایع مغزی نخاعی (CSF)، سواب ها ، ادرار

منابع:

Tang YW, Mitchell PS, Espy MJ, Smith TF, Persing DH. Molecular diagnosis of herpes simplex virus infections in the central nervous system. *J Clin Microbiol*. 1999;37(7):2127-2136.

MTB Test

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*Mycobacterium tuberculosis*) که به «باسیل کخ» هم مشهور است گونه‌ای بیماری‌زا در جنس مایکوباکتریوم است. این باکتری، عامل بیماری سل است. این بیماری یک عفونت باکتریایی است که از طریق استنشاق قطرات ریز از سرفه ها یا عطسه های یک فرد آلوده پخش می شود. این عفونت به طور عمده بر ریه ها تأثیر می گذارد ، اما می تواند بر روی هر قسمت از بدن از جمله شکم (شکم) ، غدد ، استخوان ها و سیستم عصبی تأثیر بگذارد. مطابق تخمین های سازمان جهانی بهداشت، هر سال هشت میلیون مورد جدید سل گزارش می شود و هر سال سه میلیون نفر در جهان در اثر بیماری سل از بین می روند که ۹۵ ٪ این موارد مرگ و میر درکشورهای در حال توسعه اتفاق می افتد.

در اکثر افراد سالم ، دفاع طبیعی بدن در برابر عفونت و بیماری (سیستم ایمنی) باکتری ها را از بین می برد و علائمی وجود ندارد. سیستم ایمنی بدن بعضی اوقات نمی تواند باکتری ها را از بین ببرد ، اما می تواند از شیوع آن در بدن جلوگیری کند. اگر سیستم ایمنی بدن نتواند عفونت را بکشد یا حاوی عفونت باشد ، می تواند در ریه ها یا سایر قسمت های بدن گسترش یابد و علائم در طی چند هفته یا چند ماه بروز پیدا می کند. این به عنوان سل فعال شناخته شده است. سل نهفته ممکن است بعداً به یک بیماری فعال سل تبدیل شود ، خصوصاً اگر سیستم ایمنی بدن ضعیف شود.

یکی از مشکلاتی که در بیماری سل وجود دارد، سرعت در تشخیص این بیماری می باشد. روش رنگ آمیزی مستقیم از دقت و حساسیت پایینی برخوردار است و کشت خلط زمان طولانی را می طلبد. بنابراین نیاز به روشی آسان و حساس به عنوان مکمل و تایید تشخیص بالینی احساس می گردد. روش کیفی PCR از حساسیت، دقت و سرعت کافی برخوردار است با روش (NAATs) Nucleic acid amplification tests تشخیص مولکولی مقادیر اندک ماده ژنتیکی DNA میکروارگانیسم به وسیله آمپلیفیکاسیون امکانپذیراست که شامل واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) با پرایمر های اختصاصی جایگاه هدف ژنوم باکتری می باشد. بررسی کمی نیز

با بهره گیری از پروب ها و پرایمرهای اختصاصی توالی هدف با تکنیک Real time PCR امکان پذیر است.

نمونه مورد نیاز:

فرم ریوی TBC (خلط، Bronchoalveolar lavage)

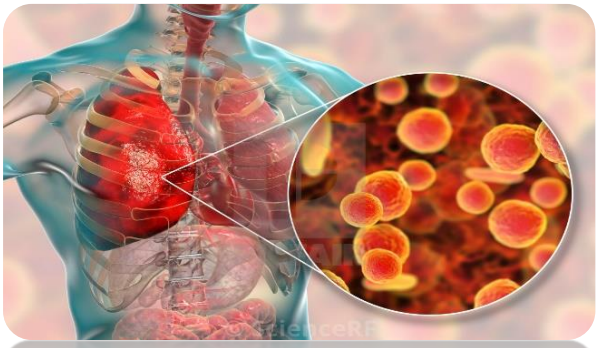
فرم خارج ریوی (مایع مغزی نخاعی ، بافت ها ، گره های لنفاوی ، مغز استخوان ، مدفوع ، لاواژ معده)

منابع:

1.Application of PCR in diagnosis of Mycobacterium tuberculosis complex. Hakim Health Sys Res . 2006; 9 (1) :16-21
URL: http://hakim.hbi.ir/article-1-339-fa.html

2.M R, A K, R M, M T, F A, M S, et al . Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex: PCR method using insertion sequence 6110. Tehran Univ Med J. 2009; 67 (3) :173-177
URL: http://tumj.tums.ac.ir/article-1-467-fa.html

مایکوپلاسما پنومونیه



مایکوپلاسما جنسی از باکتری هاست ژنوم آن ها کوچک بـوده و از یک مولکول اسید نوکلئیک دو رشته ای حلقوی تشکیل شده است که حـاوی ۵۰۰ تـا ۱۰۰۰ ژن می باشد. مایکوپلاسما دیواره سلولی ندارد .نداشتن دیواره سلولی باعث مقاوم شدن این باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیکهای مؤثر بر دیواره مانند پنی سیلین‌ها می‌شود. مایکوپلاسما پنومونیه یکی از عوامل عفونت بخش فوقانی و تحتانی تنفس در انسان بوده و تصویر کلینیکی آن به صورت تراکئوبرونشیت کند پیشرونده همراه با بی قراری و سرفه هـای خـشک اسـت. طیـف بیمـاریزایـی ایـن بـاکتری، از شکلهای ملایم فارنژیت و تراکئوبرونشیت تا موارد پنومـونی حاد را شامل می شود. مطالعات اپیـدمیولوژیک نـشان داده است که این باکتری مسئول بیش از ۲۰ درصد پنومـونی هـای کسب شـده از جامعـه مـی باشـد. طیـف گـسترده ای از تظاهرات خارج تنفسی مانند عوارض هماتولوژیک ، گوارشی، کلیوی، عـضلانی - اسـکلتی ، قلبـی - عروقـی ، ایمونولوژیـک ، درماتولوژیک و نورولوژیک در ارتباط با این باکتری گـزارش شده است. عفونت مایکوپلاسما (Mycoplasma)در کودکان نیز شایع بوده و علاوه بر عوارض ریوی طیف وسیعی از عوارض سیستمیک غیر ریوی مانند راشهای متنوع جلدی، سندرم استیونس جانسون عوارض عصبی (گیلن باره، آنسفالیت، مننژیت آسپتیک) و قلبی ایجاد می کند. درگیری سیستم عصبی متعاقب عفونت مایکوپلاسما در 1/1000 موارد و اغلب به صورت آنسفالیت گزارش می شود. مکانیسم های اتوایمون تاخیری در ایجاد عوارض سیستم عصبی مرکزی (مانند مننگوانسفالیت، میلیت عرضی، مننژیت آسپتیک، آتاکسی مخچه ای، فلج بل، کری، سندرم ساقه مغزی، سندرم گیلن باره) پس از بیماری تنفسی و با فاصله سه تا ۲۳ روز (به طور متوسـط ۱۰ روز) بعد دیـده می شود.

در حال حاضر کشت ، روشهای تشخیص سرولوژیک و تکنیک های تکثیر اسید نوکلئیک سه روش قابل دسترس برای تشخیص روتین عفونت های مایکوپلاسما پنومونیه محسوب می شوند. روش های تشخیصی بر اساس PCR به دلیل داشتن حساسیت ، اختصاصیت و دقت بیشتر ، روشهایی مناسب جهت تشخیص عواملی همچون مایکوپلاسما پنومونیه به شمار می روند.

روش انجام تست: شناسایی DNA مایکوپلاسما در نمونه بیمار به روش کیفی با تکنیک PCR انجام می گیرد و تشخیص کمی به عنوان شاخصی برای تشخیص عفونت حاد، پیش بینی احتمال انتقال عفونت و برای ارزیابی تأثیر درمان با تکنیک Real time PCR با دقت و حساسیت بالا انجام می شود.

نمونه مورد نیاز:

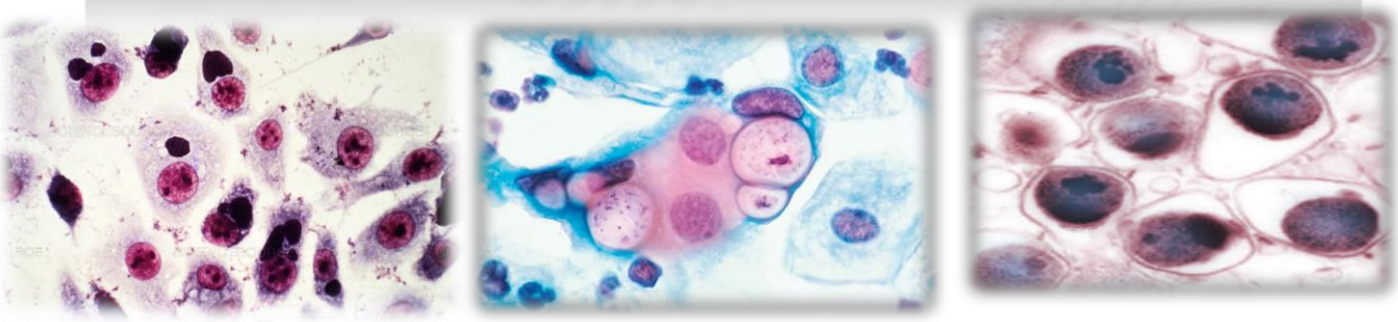
خلط ، دهان و حلق و بینی ، سواب های نازوفارنکس

منابع:

1.Amirian S, Amini K, Parviz M. Molecular Detection of Mycoplasma Pneumoniae Using P1 Gene in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Syndrome. Armaghane danesh. 2016; 21 (5) :455-464

2.S N, M S, Z K, A T, H T, L A et al . Detection of Mycoplasma pneumoniae in cerebrospinal fluid of children: Quantification of CSF-IgG antibody. Tehran Univ Med J. 2010; 68 (5) :274-280

Chlamydia SP



کلامیدیا باکتری گرم منفی است و در محل غیرمعمول یعنی داخل سلول قرار می‌گیرد. کلامیدیاها تمام قسمت‌های یک باکتری را دارند، متابولیسم مخصوص خودشان را دارند، بدون پوشش نمی‌شوند و با تقسیم دوتایی تکثیر می‌یابند. البته با سایر باکتری‌ها از نظر داشتن چرخه زندگی پیچیده و مشاهده‌ی دو شکل مرفولوژیکی متفاوت می‌باشند .سه گونه کلامیدیایی وجود دارد که در انسان بیماری‌زا می‌باشند، کلامیدیا پنومونیه(Chlamidia pneumoniae) ، کلامیدیا سی‌تاسی (C.psittaci) و کلامیدیا تراکوماتیس(C.trachomatis).

کلامیدیا تراکوماتیس Chlamydia trachomatis یکی از عوامل ایجاد کننده عفونتهای منتقله از راه تماس جنسی است که قابل درمان می باشد. این باکتری یکی از عوامل شایع ایجاد کننده اورتریت، سرویسیت، بیماریهای التهابی لگن Disease (PID) Inflamatory Pelvic، ناباروری لوله ای، بارداری نابجا Pregnancy Ectopi (EP)، اپیدیدیمیت، پروکتیت و اورتریت است. درصورت آلودگی مادر، جنین در حین عبور از کانال زایمانی آلوده شده و به کونژنکتیویت و یا پنومونیت مبتلا می شود. طبق آمار سازمان جهانی بهداشت، سالیـانه ۹۰ میلیـون عفونت کلامیدیایی در سطح جهان اتفاق می افتد.

کلامیدیا سی‌تاسی عامل پسیتاکوزیس یا تب طولی یا اورنیتوزیس است. بیماران آلوده به کلامیدیا سی‌تاسی از راه تنفس هوای آلوده به مدفوع پرندگان بیمار به بیماری مبتلا می‌شوند. فرد بیمار بی حال بوده، سرفه می‌کند و اسهال دارد بیمار 1 تا 3 هفته بعد، دچار تب، سرفه

خشک، گلودرد، درد در بدن و درد پیشانی می‌شود. درحالی که بعضی بیماران پنومونی خفیف یا پنومونایتیس نشان می‌دهند، سایرین واقعاً بدحال شده و دچار استفراغ، سیانوز و علائم سیستم اعصاب مرکزی مثل انسفالیت، هذیان و کوما می‌شوند. حدود 5 تا 20 درصد بیمارانی که درمان نشوند می‌میرند.

کلامیدیا پنومونیه اولین بار در اوایل دهه 1980 کشف شد. محققین معتقدند که فقط انسان با کلامیدیا پنومونیه آلوده می‌شود و مخزن حیوانی وجود ندارد. اگرچه باکتری با قطرات تنفسی از فردی به فرد دیگر منتقل می‌شود، اما به راحتی قابل انتشار نیستند. این باکتری عامل معمول عفونت‌های دستگاه تنفسی فوقانی و تحتانی بالغین در تمام کشورهاست.

روش های تشخیصی کلامیدیا شامل کشت، روش‌های غیر مولکولی (مانند تست‌های آنتی‌بادی منوکلونال کونژوگه شده با ماده فلورسانس(DIF) ، آنزیم ایمنواسی (EIA) و کمی لومینسانس) و روش‌های مولکولی (مانندPCR ، LCR، RT-PCRو غیره) هستند. در مطالعهای در روسیه، سه روش کشت سلولی، DIF(Direct Immunofluorescent test) و PCR مورد بررسی قرار گرفتند و از این میان PCR دارای حساسیت ۱۰۰ -۷۹ ٪و اختصاصیت ۱۰۰-۹۷ ٪ بود، ولی حساسیت کشت و DIF پایین گزارش شد.

شناسایی DNA در نمونه بیمار به روش کیفی با تکنیک PCR انجام می گیرد و تشخیص کمی به عنوان شاخصی برای تشخیص عفونت ، پیش بینی احتمال انتقال ، پیش بینی میزان پیشرفت بیماری و برای ارزیابی تأثیر درمان با تکنیک Real time PCR با دقت و حساسیت بالا (۹۵٪) انجام می شود.

نمونه مورد آزمایش:

سواب (واژن ، حلق ، رکتال) ، اسپرم ، ادرار

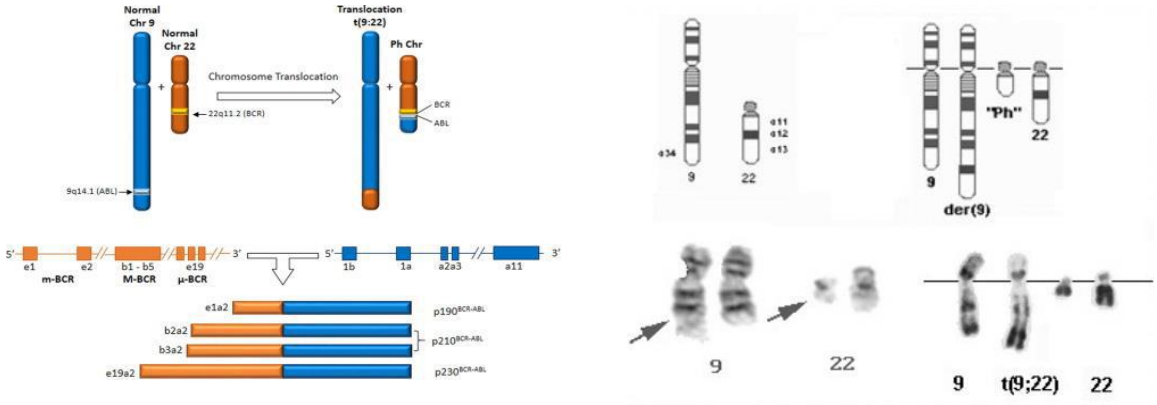
منابع:

L C, MJ T, H Z, S A, M T, M M et al . A molecular survey of Chlamydia trachomatis infection in married women: a cross sectional study on 991 women. Tehran Univ Med J. 2008; 66 (7) :485-491
URL: http://tumj.tums.ac.ir/article-1-572-fa.html

بخش سوم

تشخیص مولکولی جهش های ژنی و جابجایی های کروموزومی در بروز انواع ناهنجاری ها و سرطان ها

BCR-ABL PCR/Ph chromosome fusion transcript level



جابجایی بین بازوی بلند کروموزوم های ۹ و ۲۲، موجب به وجود آمدن کروموزوم ۲۲ کوتاهی تحت عنوان کروموزوم فیلادلفیا (ph) می شود. کروموزوم فیلادلفیا اولین بار در سال ۱۹۶۰ توسط peter nowell و david Hungerford در سلول های خونی کشت داده شده دو بیمار مبتلا به CML گزارش شد. کروموزوم فیلادلفیا (فیوژن ژن BCR-ABL) از اتصال توالی ´۳ ژن ABL1 (Abelson) روی کروموزوم 9q34 به ناحیه ´۵ توالی ژن BCR در ناحیه کروموزومی 22q11 ایجاد می شود. محصول این اتصال ژنی بر اساس ناحیه شکسته شده در کروموزوم ۲۲ متفاوت بوده و شامل پروتئین های با اندازه و وزن مولکولی متفاوت می باشد. در لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) شایع تربن نقطه شکست با عنوان Major-BCR (M-BCR) سبب تشکیل ژن های فیوژن b2a2 یا b3a2 می شود که در نهایت پروتئین کایمر ۲۱۰ کیلودالتونی را تولید می کند. P210 یک پروتئین فعال تایروزین کینازی است که سبب تقویت تکثیر سلولی و مهار آپوپتوز می شود. شکستگی در ناحیه کوچکتر e1a2 به عنوان minor BCR (mBCR) ، پروتئین کوچکتری به نام p190 تولید می‌کند و اغلب در لوسمی لنفوبلاستی حاد (ALL) با کروموزوم فیلادلفیای مثبت دیده می‌شود ، مقدار اندکی از P190 ممکن است در بیماران مبتلا به CML نیز یافت شود. سومین شکست با نام micro BCR (μ-*bcr*) که بین اگزون ۱۹ و ۲۰ واقع می شود ، e19a2 mRNA را رونویسی می کند و پروتئین فیوژ شده p230 کیلودالتونی را تولید می کند.

موارد استفاده بالینی:

- **کمک به تشخیص لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) و یا یک نوع از لوسمی لنفوبلاستی حاد (ALL)**
- **نظارت بر درمان**

روش انجام آزمایش:

RNA سلول استخراج شده و با تکنیک real time PCR بررسی کمی و با طراحی پرایمر اختصاصی نواحی شکست و تکثیر ناحیه ژنی با PCR شناسایی ایزوتایپ انجام می گیرد.

تفسیر تست:

در فرم کمی (q-PCR) ، نقاط شکست در الحاق ژنی به صورت کمی اندازه گیری می شود. براساس نتیجه آزمایش، مینور یا ماژور بودن نتیجه، می‌توان بر پاسخ بیماران به درمان نظارت داشت و همچنین امکان نظارت بر روند بیماری در بیمارانی که به درمان پاسخ داده و بهبود می-یابند، نیز وجود خواهد داشت. در فرم کیفی (PCR) وجود فیوژن در نمونه بیمار بررسی و گزارش می شود، نتیجه مثبت احتمالا نشان دهنده تشخیص CML و یا فرمی از (PH+positive) ALL می باشد.

نوع نمونه مورد آزمایش:

- **10ml نمونه خون محیطی (EDTA)**
- **2ml نمونه مغز استخوان (EDTA)**

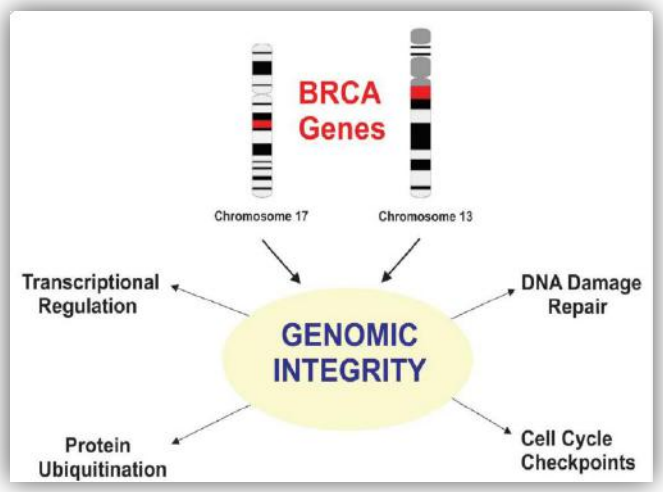
منابع:

1.BCR-ABL fusion genes and laboratory findings in patients with chronic myeloid leukemia in northeast Iran

American Association for Clinical Chemistry (Lab Tests Online)

2.https://knightdxlabs.ohsu.edu/home/test

BRCA1 & BRCA2 Mutation



ژن **BRCA1** بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷ ، باند۲ و ساب باند ۱ ، **17q21** قرار دارد. این ژن ۲۴ اگزون دارد و پروتئینی با همین نام به طول ۱۸۶۳ آمینو اسید را کد می کند. ژن **BRCA2** نیز ۲۷ اگزون دارد و پروتئینی ۳۴۱۸ آمینواسیدی را کد می کند. مکان ژن **BRCA2** برروی بازوی بلند کروموزوم ۱۳ (**13q12**) می باشد. ژنهای **BRCA1**و **BRCA2** نقش مهمی در ترمیم **DNA** به روش نوترکیبی هومولوگ، حفظ پایداری کروموزوم، فعالسازی نقاط کنترل **DNA** آسیب دیده و تنظیم چرخهٔ سلولی دارند. پانزده درصد از کل موارد سرطان پستان وابسته به استعداد ژنتیکی قوی به این بیماری است که به صورت الگوی وراثتی بارز به ارث می رسد .

گزارشها بیانگر آن است که جهش در دو ژن بسیار پرنفوذ **(Breast Cancer susceptibility Gene1) BRCA1 (Breast Cancer susceptibility Gene 2) BRCA2** علت ۲۰ تا ۳۰ درصد سرطانهای پستان وراثتی است. این میزان معادل خطری در حدود ۶۰ تا ۸۵ درصد موارد ابتلا به سرطان پستان در افراد حامل جهش این دو ژن در طول زندگی می باشد. جهش های ژن **BRCA1**تقریباً در ۵۰ درصد خانواده های با ظهور زود هنگام سرطان پستان و ۸۰ درصد خانواده های با ظهور زود هنگام سرطان پستان – تخمدان(**HBOC**) وجود دارد و جهش های ژن **BRCA2** نیز در درصدی از موارد سرطان پستان ارثی یافت می شود.

بر اساس گایدلاین **NCCN** افرادی که نیاز به بررسی ژنتیکی دارند شامل موارد زیر می باشد:

- زن مبتلا به سرطان سینه در سن ۵۰ سالگی و کمتر
- سرطان سینه **Triple negative** در سن ۶۰ سالگی یا کمتر در خانواده

- **سرطان تهاجمی تخمدان, لوله فالوپ با صفاق**
- **دو مورد یا بیشتر سرطان سینه در خانواده**
- **مرد مبتلا به سرطان پستان**

Breast Cancer

- **وقوع سرطان در هر دو سینه یک خانم (فرم دو طرفه)**
- **وقوع همزمان سرطان سینه و تخمدان در یک نفر و یا در اعضای یک خانواده**
- **وقوع دو یا چند مورد از سرطان مرتبط با *BRCA1/2* در یکی از اعضای خانواده**

روش انجام تست: بررسی اگزون های دو ژن *BRCA1* و *BRCA2* به روش تعیین توالی دو طرفه (Bi-directional Sequencing)، این روش از دقت بالایی برخوردار می باشد و انجام MLPA جهت بررسی Deletion و Duplication ها.

تفسیر نتایج:

نتیجه آزمایش در ژن های *BRCA1* و *BRCA2* ممکن است منجر به ایجاد نتایج متفاوتی شود: نتیجه مثبت (شناسایی جهش ژنتیکی)، نتیجه منفی (عدم شناسایی جهش ژنتیکی) و نتیجه مبهم یا غیرقابل تفسیر (همانند شناسایی جهش هایی که مضر یا غیر مضر بودن آنها مشخص نیست.)

نتیجه مثبت نشان دهده اینست که فرد یک جهش مضر و آسیب رسان را در یکی از ژن‌های *BRCA1* و یا *BRCA2* به ارث برده است و بنابراین احتمال ابتلای وی به برخی سرطان ها از جمله سرطان سینه افزایش پیدا کرده است.

تفسیر نتیجه منفی آزمایش در ژن *های BRCA1* و *BRCA2* کمی سخت تر بوده و بستگی به موارد متعددی از جمله سابقه خانوادگی فرد در ابتلا به سرطان و همچنین شناسایی جهش مسبب بیماری در سایر بستگان وی دارد.

گاهی اوقات پس از انجام آزمایش ژنتیک یک تغییر ژنتیکی در یکی از ژنهای *BRCA1/2* شناسایی می شود که تاکنون هیچ گزارشی در خصوص بیماری زا بودن و یا

نبودن آن ارائه نشده است. این گونه نتایج تحت عنوان نتیجه مبهم و غیر قابل تفسیر شناخته می شوند. به طور دقیق نمی توان مشخص کرد که این گونه تغییراتی ژنتیکی ممکن است باعث سرطان شوند یا خیر. در این گونه مواقع معمولا مطالعات تکمیلی انجام خواهد شد تا در خصوص نتیجه به دست آمده با اطمینان بیشتری تصمیم گیری شود.

نمونه مورد نیاز:

10ml خون محیطی حاوی EDTA

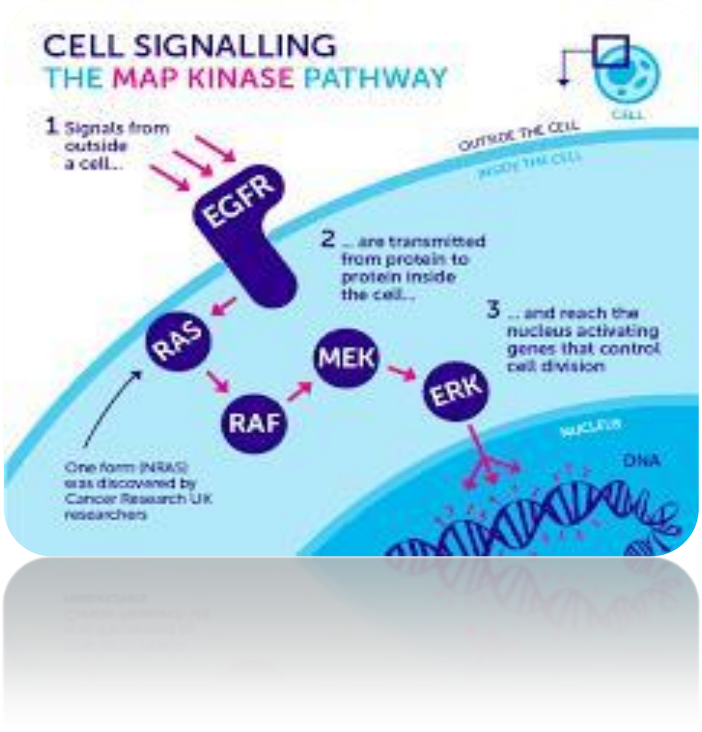
منابع:

Identification of BRCA1 and BRCA2 mutations in a number of Iranian patients with early onset breast cancer or family history of breast cancer risk. ijbd. 2009; 2 (2) :14-26

https://www.cancer.gov/about-cancer

https://www.mayoclinic.org/tests

KRAS Mutations



ژن **KRAS** متعلق به گروهی از ژن ها به نام خانواده انکوژن **Ras** می باشد. زمانی که این ژن ها دچار جهش می شود سلول های نرمال به فرم سرطانی تغییر می یابند. ژن **KRAS** که در ناحیه کروموزومی **12P12.1** قرار دارد با تولید پروتئین **KRAS** به واسطه روندی تحت عنوان انتقال سیگنال، سیگنال های خارج سلولی را به هسته سلول منتقل می کند. این سیگنال ها سلول را برای رشد و تقسم و یا تمایز و بلوغ سلولی راهنمایی می کند. **KRAS** یک پروتئبن **GTP** ازی است که **GTP** را به **GDP** تبدیل می کند، بنابراین در صورت اتصال به **GTP**، این پروتئین فعال خواهد بود و سیگنال سلولی را منتقل می کند. و زمانی که **GTP** به **GDP** تبدیل می شود و **KRAS** به **GDP** متصل می شود این پروتئین خاموش شده و سیگنالی را به هسته ارسال نمی کند. جهش های **KRAS** در چندین نوع از بدخیمی های انسانی نظیر سرطان کولورکتال متاستاتیک (**mCRC**) ، ادنوکارسینومای ریه و سرطان تیروئید یافت می شود. فراوان ترین جهش ها در کدون های ۱۲ ، ۱۳ و ۶۱ وجود دارد. مطالعات متعدد نشان داده اند که تومورهای حامل فرم های موتانت ژن **kras** کمتر به درمان با آنتی بادی های ضد گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی پاسخ می دهند. همه بیماران تحت درمان با آنتی بادی مونوکلونال ضد فاکتور رشد اپیدرمی (مانند: **cetuximab, panitumumab** و **erlotnib**) باید برای جهش **KRAS** غربالگری شود. علاوه بر **KRAS**، بیماران دارای جهش در ژن **BRAF** نیز به درمان با **anti-EGF** پاسخ نمی دهند. بنابراین در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال جهش در دو ژن **kras** و **BRAF** می تواند بررسی شود.

این آزمایش زمانی برای فرد درخواست می شود که سرطان در او تشخیص داده شده باشد. با توجه به نقش ژن ***RAS*** در پاسخ دهی بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ متاستاتیک به گروهی از داروها، انجام این تست برای این افراد توسط پزشک معالج پیشنهاد می شود.

روش انجام تست: بررسی اگزون های ۲، ۳ و ۴ ژن NRAS شامل کدون های ۱۲ ،۱۳، ۶۱ و ۱۴۶ به روش تعیین توالی دو طرفه (Bi-directional Sequencing). این روش از دقت بالایی برخوردار می باشد.

تفسیر تست:

نتیجه منفی :(negative)

به این مفهوم است که فرد فاقد جهش های مورد بررسی در ژن *RAS* می باشد و ممکن است به درمان های ضد رسپتور فاکتور رشد اپیدرمال پاسخ دهد.

نتیجه مثبت :(positive)

به این مفهوم است که بافت توموری فرد مورد آزمون دارای جهش در ژن *RAS* می باشد و از این رو از درمان های هدفمند ضدرسپتور فاکتور رشد اپیدرمال سود نمی برند و در مواردی این افراد پروگنوز بدتری را نسبت به افراد با نتیجه منفی نشان می دهند. لازم به ذکر است که نتیجه مثبت بدین مفهوم نیست که افراد بیمار با جهش ژن *RAS* به هیچ شیمی درمانی پاسخ نمی دهند بلکه اغلب تومورها به داروهای شیمی درمانی مرسوم پاسخ می دهند. در واقع در این افراد نمی توان از مزایای درمان با داروهای ضد رسپتور فاکتور رشد اپیدرمال که اثر بخشی بهتری نسبت به داروهای مرسوم دارند استفاده نمود.

نمونه مورد نیاز:

5ml نمونه خون محیطی حاوی EDTA

2ml نمونه خون مغز استخوان حاوی EDTA

بافت توموری Formalin-*fixed*, paraffin-*embedded (*FFPE*)*

منابع:

1.Tidyman WE, Rauen KA. Mutational and functional analysis in human Ras/MAP kinase genetic syndromes. Methods Mol Biol. 2010;661:433-47. doi: 10.1007/978-1-60761-795-2_27

2.https://ghr.nlm.nih.gov/gene/KRAS

3.https://neogenomics.com/test-menu/Kras-mutation-analysis

NRAS Mutations

ژن **NRAS** که در ناحیه کروموزومی **1p13.2** قرار دارد با تولید پروتئین **NRAS** به واسطه روندی تحت عنوان انتقال سیگنال، سیگنال های خارج سلولی را به هسته سلول منتقل می کند. این سیگنال ها سلول را برای رشد و تقسیم و یا تمایز و بلوغ سلولی راهنمایی می کند. **NRAS** یک پروتئین **GTP** ازی است که **GTP** را به **GDP** تبدیل می کند، بنابراین در صورت اتصال به **GTP**، این پروتئین فعال خواهد بود و سیگنال سلولی را منتقل می کند. و زمانی که **GTP** به **GDP** تبدیل می شود و **NRAS** به **GDP** متصل می شود این پروتئین خاموش شده و سیگنالی را به هسته ارسال نمی کند. ژن **NRAS** جز انکوژن ها دسته بندی می شود و جهش در اگزون ۲ و ۳ واگزون ۴ ژن سبب فعالیت بیش از حد ژن و بروز انواعی ازتومورهای جامد می شود. جهش در ژن **NRAS** در ملانوما (۱۳-۲۵٪) ، سرطان کولورکتال (۱-۶٪) سرطان ریه (۱٪)، کارسینومای هپاتوسلولار(۱۰٪) ، لوکمی میلوئید(۱۴٪) و کارسینومای تیروئید(۷٪) دیده می شود.

این آزمایش زمانی درخواست می شود که سرطان در فرد تشخیص داده شده باشد.

روش انجام تست:

بررسی اگزون های ۲، ۳ و ۴ ژن **NRAS** شامل کدون های ۱۲ ،۱۳، ۶۱ و ۱۴۶ به روش تعیین توالی دو طرفه (**Bi-directional Sequencing**). این روش از دقت بالایی برخوردار می باشد.

تفسیر تست:

نتیجه منفی **:(negative)**به این مفهوم است که فرد فاقد جهش های مورد بررسی در ژن ***RAS*** می باشد.

نتیجه مثبت **:(positive)**به این مفهوم است که بافت توموری فرد مورد آزمون دارای جهش در ژن ***RAS*** می باشد.

نمونه مورد نیاز:

5ml نمونه خون محیطی حاوی EDTA

2ml نمونه خون مغز استخوان حاوی EDTA

بافت توموری (*FFPE*) *Formalin*-fixed, *paraffin*-embedded

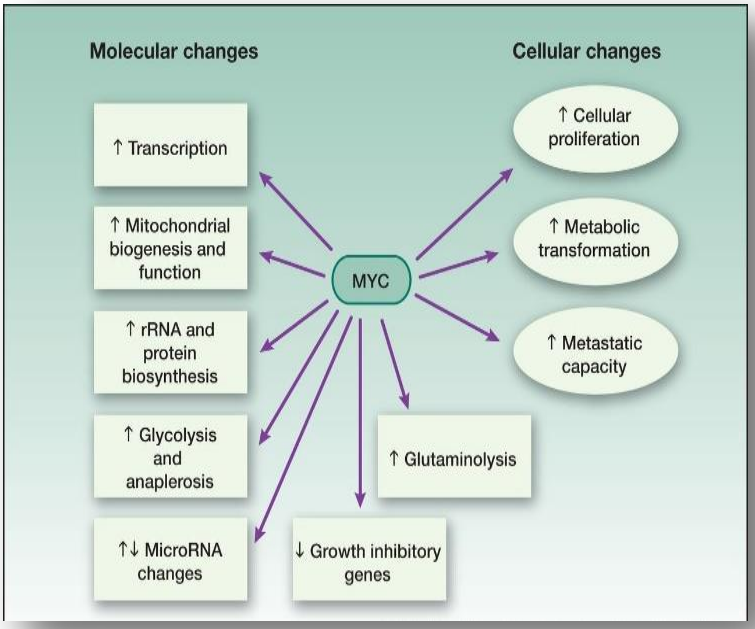
منابع:

1.Charbel C, Fontaine RH, Malouf GG, Picard A, Kadlub N, El-Murr N, How-Kit A, Su X, Coulomb-L'Hermine A, Tost J, Mourah S, Aractingi S, Guégan S. NRAS mutation is the sole 2.recurrent somatic mutation in large congenital melanocytic nevi. J Invest Dermatol. 2014 Apr;134(4):1067-74. doi: 10.1038/jid.2013.429. Epub 2013 Oct 15

3.https://ghr.nlm.nih.gov/gene/NRAS

4.https://neogenomics.com/test-menu/nras-mutation-analysis

MYC و بروز سرطان



خانواده انکوژن MYC شامل سه عضو است که انکوپروتئین های c-Myc, N-Myc و L-Myc را کد می کنند. انکوپروتئین های MYC فاکتورهای رونویسی هستند که رونوسی حداقل ۱۵٪ کل ژنوم را تنظیم می کنند. این پروتئین ها از طریق مسیرهای سیگنالینگ سلول تحریک می شوند و خود پروتئین های پایین دست رافعال کرده و نهایتا در روند ترجمه ، پیشرفت چرخه سلول ، متابولیسم و طیف گسترده ای از عملکردهای بیولوژیکی نظیر تکثیر و تمایز و بقای سلول نقش دارند. جهش در ژن MYC در تاحیه N ترمینال و نقاط داغ جهش، و نیز تکثیر آن منجر به افزایش بیان ژن می شود. افزایش بیان انکوژن MYC در سرطان سینه، ریه، کارسینومای پروستات و برخی از لنفوم های سلول B دیده می شود. ترنسلوکاسیون انکوژن c-myc روی کروموزوم ۸ با ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین H بر روی کروموزوم ۱۴ و در موارد نادرتر، جایجایی آنکوژن myc با نواحی از کروموزوم ۲ و۲۲ که کد کننده زنجیره های سبک کاپا و لامبدا آنتی بادی می باشند مشاهده می شود. در اثر این جا به جایی ژن myc تحت کنترل پروموتر ژن ایمونوگلوبولین قرار می گیرد و بیان آن تا حد ۱۰ برابر و یا بیشتر افزایش پیدا می کند. بنابراین شناسایی این جابجایی می تواند یک شاخص مفید جهت پیش آگهی ضعیف یا یک دوره بالینی تهاجمی در لنفوم بورکیت پراکنده باشد.

روش انجام تست:

بر اساس مشاهدات بالینی بخش های مختلف ژن جهت شناسایی تغییر ژنی با تکنیک های موثر نظیر ،Nested-PCR و Bi-derectional Sequencing مورد بررسی قرار میگرد.

نوع نمونه:

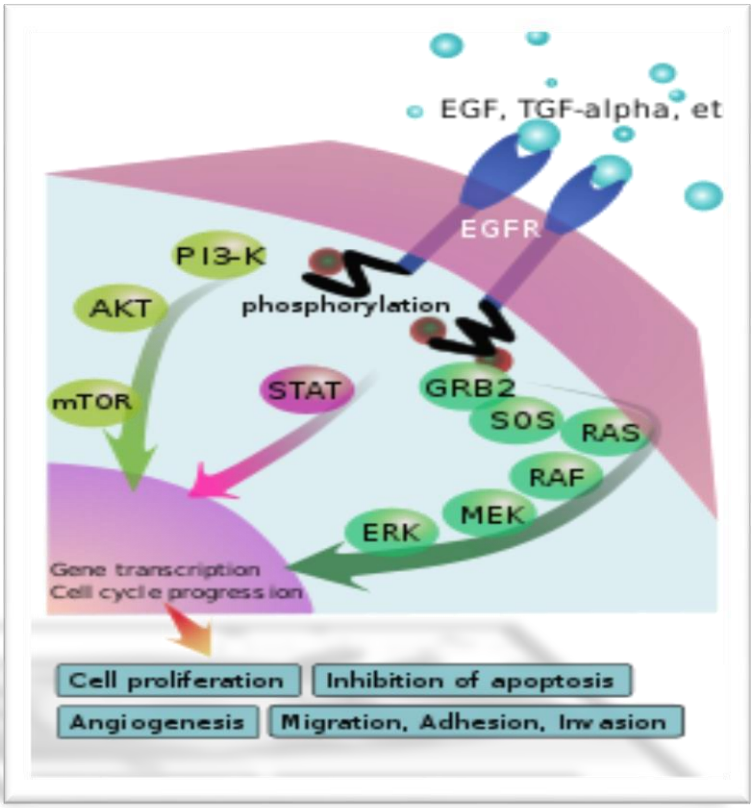
5ml خون محیطی حاوی EDTA

منابع:

1.Chen, H., Liu, H. & Qing, G. Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Sig Transduct Target Ther* 3, 5 (2018)

2.Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell*. 2012;149(1):22-35. doi:10.1016/j.cell.2012.03.003

Epidermal Growth Factor Receptor Mutation



نام های دیگر: HER-1، erbB-1

ژن EGFR پروتئینی به نام گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی را کد می کنند . ابن گیرنده به چندین لیگاند می تواند متصل شود و پس ار دایمریزه شدن پیام های خارج سلول را از طرق مسیر سیگنالینگ به داخل سلول منتقل کرده و در رشد و تقسیم و بقای سلول نقش دارد. جهش در این ژن در سلول های توموری سرطان ریه وجود دارد. دو جهش شایع در ژن EGFR شامل حذف درون چهارچوب اگزون ۱۹ و جهش نقطه ای (CTG به CGG) در اگزون ۲۱ که موجب جای گزینی اسید آمینه لوسین با آرژنین در موقعیت ۸۵۸ می شود (L858R) می باشد که در ۹۰٪ موارد non-small cell lung cancer (NSCLC) ناشی از جهش ژن EGFR دیده می شود.

جهش های سوماتیک در دمین تایروزین کینازی EGFR در بیماران با آدنوکارسینومای ریه و NSCLC ، با حساسیت به مهارکننده های تایروزین کینازی EGFR (TKIs) نظیر gefitinib و erlotinib همراه است. غربالگری جهش در بیماران با NSCLC می تواند به منظور پیش بینی پاسخگویی بیماران به درمان با TKIs مورد استفاده قرار گیرد.

روش انجام تست:

بررسی دو جهش شایع ژن EGFR با پرایمراختصاص توالی و واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) برای تشخیص ژن جهش یافته و عامل بروز تومور و نیز تعیین مهارکننده مناسب جهت درمان تومور

نمونه مورد نیاز:

5ml خون حاوی EDTA

بیوپسی یا بافت سرطانی که با عمل جراحی خارج شده است

منابع:

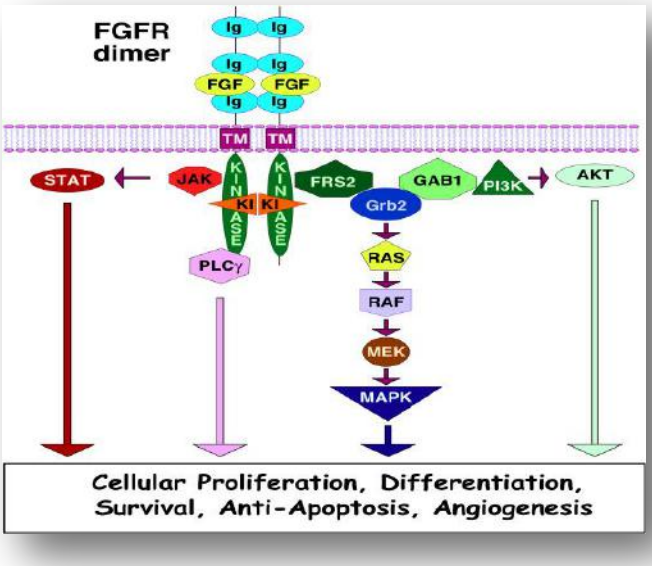
1.EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples. J Clin Pathol. 2013 Feb; 66(2): 79–89.

2.EGFR Mutations in Lung Adenocarcinomas

3.Clinical Testing Experience and Relationship to *EGFR* Gene Copy Number and Immunohistochemical Expression. J Mol Diagn. 2008 May; 10(3): 242–248.

4.https://labtestsonline.org/tests/egfr-mutation

FGFR



ژن FGFR کد کننده گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی و خانواده ای متشکل از ۴ گیرنده است که ساختارها و عملکرد مشابهی دارند. این گیرنده در نقش مهمی در تنظیم رشد و تقسیم سلول ، تعیین تیپ سلولی ، شکل گیری رگ های خونی، التیام زخم و تکامل رویان دارد. بیش از ۳۲٪ از افراد با سرطان اوروتلیال مشاهده شده است که یک تغییر فعال کننده در گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی دارند و تقریبا نیمی از این تغییرات در FGFR3 رخ می دهد. ایزوتایپ های FGFR بخشی از مسیر سیگنالینگ درون سلولی RAS/MAPK, PI3KAKT, PLCgamma و STAT است که در تقسیم و بقای سلول نقش دارند. جهش های FGFR، خصوصا آنهایی که در دومین کینازی رخ می دهد موجب فعال سازی بیش از حد گیرنده و در نتیجه تومورزایی می شود. Erdafitinib مهار کننده کیناز FGFR یک درمان دارویی است که توسط سازمان FDA برای افراد دارای FGFR2 و FGFR3 جهش یافته یا افراد مبتلا به کارسینومای اورو تلیال که به درمان با شیمی درمانی پاسخ مثبت نداده اند تایید شده و مورد استفاده قرار می گیرد.

یافته ها نشان می دهد که تاثیر درمان هدفمند FGFR در سرطان اوروتلیال در بیماران با تومورهای ناشی از جهش های فعال کننده FGFR3 شامل R248C, S249C, G370C, Y373C و فیوژن های *FGFR3-TACC3v3, FGFR3 -TACC3v1* بالاتر است. در نتیجه وضعیت جهش های FGFR یک مارکر مهم در انتخاب بیماران جهت درمان هدفمند FGFR است.

از این رو جهت ارزیابی وجود جهش ها در ژن *FGFR3* و همچنین بررسی فیوژن های ژن ، بررسی ژنتیکی انجام می شود. این سنجش همچنین نشان می دهد که آیا بیماران مبتلا می توانند توسط داروی Erdafitinib تحت درمان قرار گیرند یا خیر

روش انجام تست:

RNA از سلول های بافت توموری استخراج می شود. سنتز cDNA و تکثیر توالی حاوی جهش ها ژن FGFR با PCR انجام می شود و نهایتا با توالی یابی دو جهته سنگر (Sanger sequencing) بررسی صورت می گیرد. این تست با تکنیک RT-PCR نیز قابل انجام است.

نوع نمونه:

قطعات ۴-۵ میکرومتر بافت FFPE

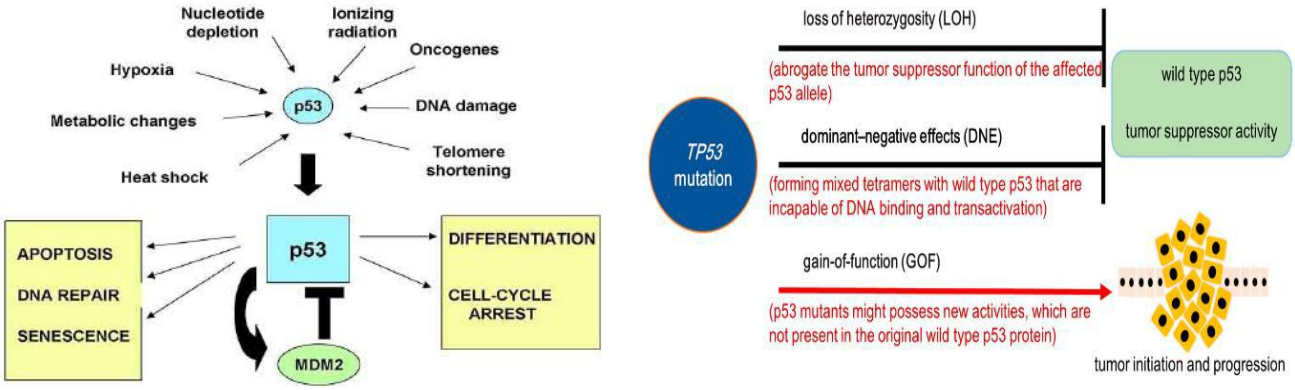
5ml خون محیطی (خون کامل) حاوی EDTA

منابع:

1.https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/Clinica

2.https://www.childrensmn.org/references/Lab/pathology

P53 Mutations



ناهنجاری مولکول P53 معمول ترین ناهنجاری مولکولی است که در سرطان های انسانی مشاهده شده حدود ۵۰ درصد سرطان ها مرتبط با مهار فعالیت این ژن است. ژن P53 برروی بازوی کوتاه کروموزوم شماره 17 قرار گرفته و از ۱۱ اگزون و ۱۰ اینترون تشکیل شده است . اگزون شماره ۱ و قسمت اعظم اگزون شماره ۱۱ در ژن P53 غیر رمزگذار هستند و کد نمی شوند این در حالی است که منطقه Hotspot ژن بر روی اگزون های ۵-۸ قرار گرفته است و بیش از ۹۰ درصد جهش ها بر روی این منطقه بروز می کند این ناحیه کدون های ۳۰۷-۱۱۰ را شامل می شود. جهش های این ژن اغلب به صورت حذف (Deletion)، درج (Insertion) و یا جهش های نقطه ای (mutation Point)ظاهر می شو د. محصول پروتئینی این ژن (TP53) یک فسفوپروتئین با وزن مولکولی ۵۳ کیلو دالتون می باشد که از ۳۹۳ اسید آمینه تشکیل شده است .این پروتئین در کنترل سیکل سلولی، مرگ برنامه ریزی شده سلول ، فرآیند پیری و تعمیر DNA موثر است.

سندرم لی فرامنی سندرم سرطانی با وراثت آتوزوم غالب است که با جهش در ژن P53 در لاین زاینده همراه می باشد. سندرم لی فرامنی بوسیله سارکوما و سرطان سینه، سرطان مغز، بدخیمی های سلول خون سازو کارسینومای ادرنوکورتیکال در افراد بیمار شناسایی می شود. دیگر بدخیمی های گزارش شده به واسطه جهش در این ژن شامل ملانوما، تومور ویلمز، تومور کلیه، سرطان پانکراس سرطان معده، سرطان کلورکتال، سرطان پروستات، سرطان ریه، تخمدان و تیروئید می باشد.

روش انجام تست:

جهت شناسایی جهش ها، بعد از استخراج DNA از خون و تکثیر منطقه ژنی به روش PCR و تایید منطقه تکثیر شده از طریق ژل الکتروفورز، محصول PCR به روش سانجر تعیین توالی می‌شود. پس از آن با آنالیز نتایج حاصل از توالی یابی، نوع ژنوتیپ فرد مشخص می‌شود. ابن تست جهش های P53 را مشخص می کند و در افراد براساس سابقه خانوادگی ، علائم و تشخیص های پیشین صورت می گیرد.

نمونه مورد نیاز:

10ml خون محیطی حاوی EDTA

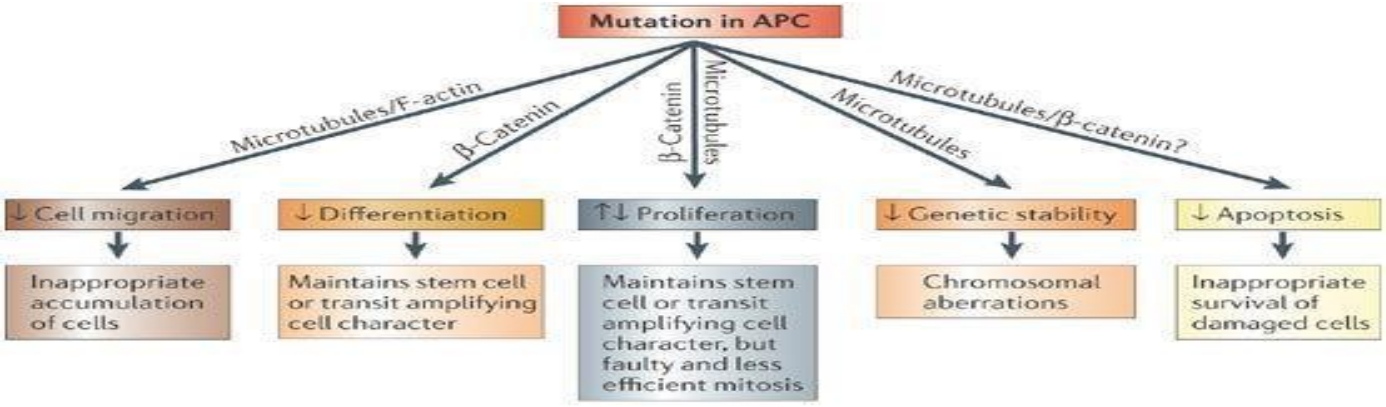
10ml خون مغز استخوان حاوی EDTA

منابع:

1.https://medlineplus.gov/lab-tests/tp53-genetic-test

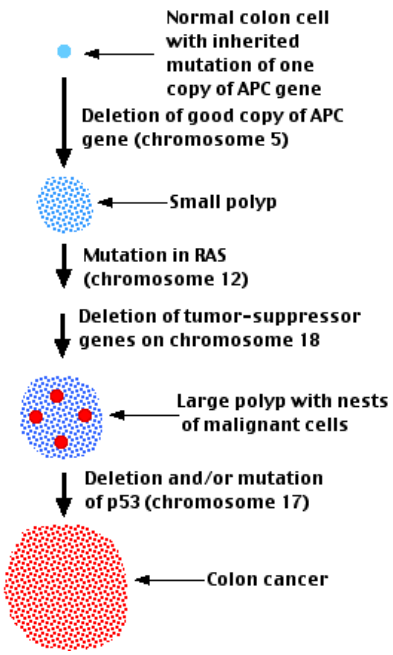
2.Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. Noa Rivlin. Genes Cancer. 2011 Apr; 2(4): 466–474.

APC Mutations



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

ژن مسئول **APC (Adenomatous Polyposis Coli)** ، یک ژن سرکوبگر تومور است که بر روی بازوی بلند کروموزوم **q22-5q21** قرار گرفته است؛ این ژن با ۱۵ اگزون ، پروتئینی با ۲۸۴۳ اسید آمینه کد می کند. پروتئین **APC** از سلول ها در برابر رشد و تقسیم سریع و یا در مسیر کنترل نشده محافظت می کند. تعدادی از جهش ها در این ژن در بیماران مبتلا به **FAP** شناسایی شده اند. اکثر این جهش ها، جهش های بی معنی یا تغییر قاب خواندن در انتهای '۵ ژن هستند که منجر به تولید کدون های پایانی زودرس می شوند . لذا پروتئین تولیدی کوتاه شده، ناقص و فاقد عملکرد می باشد. از دست دادن هر دو کپی عملکردی ژن **APC** منجر به رشد سلولی خارج از کنترل می شود. جهش در ژن **APC**در بیش از ۸۰-۹۰ ٪ خانواده های مبتلا به این بیماری قابل شناسایی است و نیز در تومورزایی سرطانهای کولورکتال تک گیر نقش دارد. جهش های سوماتیکی ژن **APC** در بیش از ۸۰ ٪ تومورهای تک گیر یافت شده اند که به نظر میرسد در شروع تومورزایی دخالت دارند. پولیپوزیز آدنوماتوز خانوادگی (**FAP**) یک وضعیت اتوزومی غالب است که تقریبا یک نفر از ۵۰۰۰ نفر از مردم را مبتلا می کند و تنها حدود یک درصد از موارد سرطان کولورکتال را در بر می گیرد.



روش انجام تست:

ابتدا DNA از سلول ها استخراج شده و ژن *APC* توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز تکثیر می یابد. از طریق توالی یابی، جهش ها در تمام اگزون های ژن *APC* و مرز اینترون های آن بررسی می شود. جهش های شناسائی شده بعد از تکرار Sanger sequencing تائید شده و نتایج تست بصورت Wild type و Mutant گزارش می شوند. عـــــــــلاوه بر این، حدود ۸ تا ۱۲ درصد از افراد مبتلا با ۱۰۰ پولیپ یا بیشتر یک حذف جزئی یا کلی در ژن *APC* دارند. در صورتی که با استفاده از توالی یابی کل ژن جهشی در *APC* پیدا نشود احتمال وجود جهش حذف یا اضافه شدگی بزرگ در ژن *APC* وجود دارد که توسط MLPA بررسی خواهد شد. در این روش حذف ها و دو برابر شدگی های احتمالی موجود در اگزون های این ژن به روش تکثیر چندگانه و وابسته به اتصال پروب ها بررسی می شوند که تمامی این پروب ها به صورت از پیش طراحی شده در کیت حاوی آنها در دسترس می باشند. لازم به ذکر است که در این روش تنها تغییرات موجود در نواحی هدف (نواحی اتصال پروب ها) شناسایی می شوند وجابجایی ها (Translocations) و واژگونی ها (Inversions) قابل تشخیص نمی باشند.

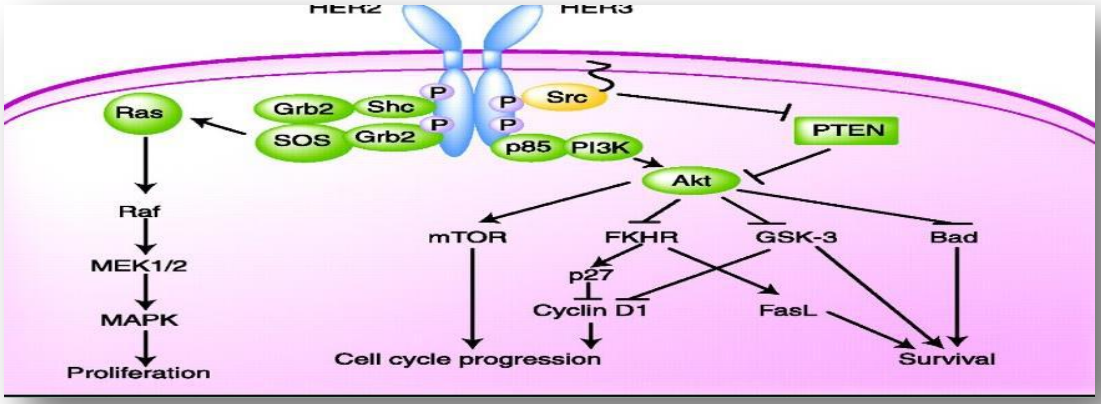
نمونه مورد نیاز:

5ml خون محیطی حاوی EDTA

منابع:

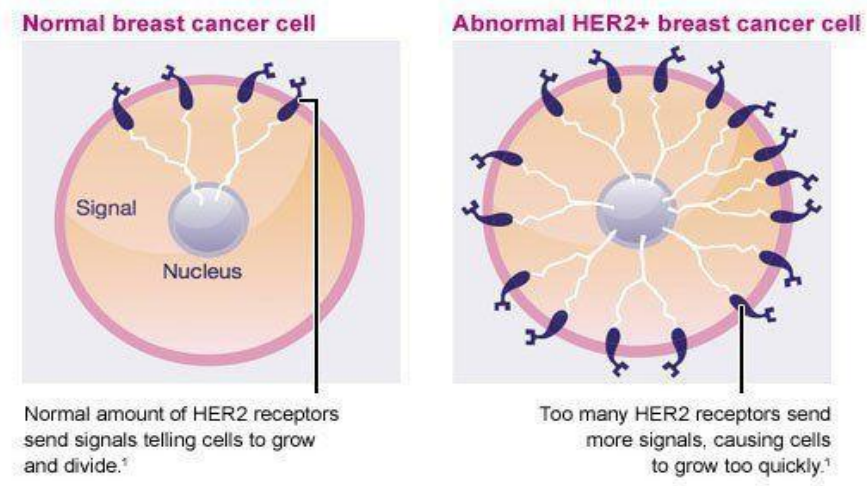
https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cphg.29

HER2 Mutation



ژن ***HER2*** که نام دیگر آن **ERBB2** نیز می باشد، کد کننده گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی تیپ ۲ است که در کنترل پاسخ سلول ها به پروتئین های سطح سلولی تحریک کننده رشد نقش دارد. یک فرد سالم دو کپی از ژن **HER2** دارد ، افزایش کپی های ژنی (تکثیر ژن) وهمچنین افزایش بیان ژن ***HER2*** در بسیاری از سرطان های انسانی دیده می شود. این تغییرات با بدتر شدن بقای کلی بیماران مبتلا به سرطان سینه ، تخمدان، اپیدرم، غدد بزاقی و سرطان معده همراه است. با درمان های هدف گیرنده **HER2** نظیر درمان با **trastuzumab, lapatinib, pertuzumab,** و **trastuzumab emtansine** ، بیماران مبتلا به سرطان های سینه و معده متاثر از افزایش بیان و تکثیر **HER2** به میزان قابل توجهی بهبود می یابند خصوصا اگر این درمان با شیمی درمانی نیز همراه شود.

جهش های فعال در دمین خارج سلولی و دمین تایروزین کینازی **HER2** در سرطان سینه ، ریه، معده، کولورکتال، کبد، تخمدان ، رحم و مغز و به طور غالب در سرطان های که به سبب تکثیر بیش از حد ژن **HER2** ایجاد نشده اند دیده می شود.



این تست جهت تعیین عامل بروز تومور و تشخیص اینکه آیا ژن HER2 در بروز تومور موثر بوده است انجام می گیرد این امر به درمان و پیش آگهی و نظارت بر درمان و عود بیماری کمک می کند.

روش انجام تست:

تکثیر توالی حاوی جهش های ناحیه هدف در ژن HER2 با PCR و توالی یابی دو جهته سنگر (Sanger sequencing)

نمونه مورد نیاز:

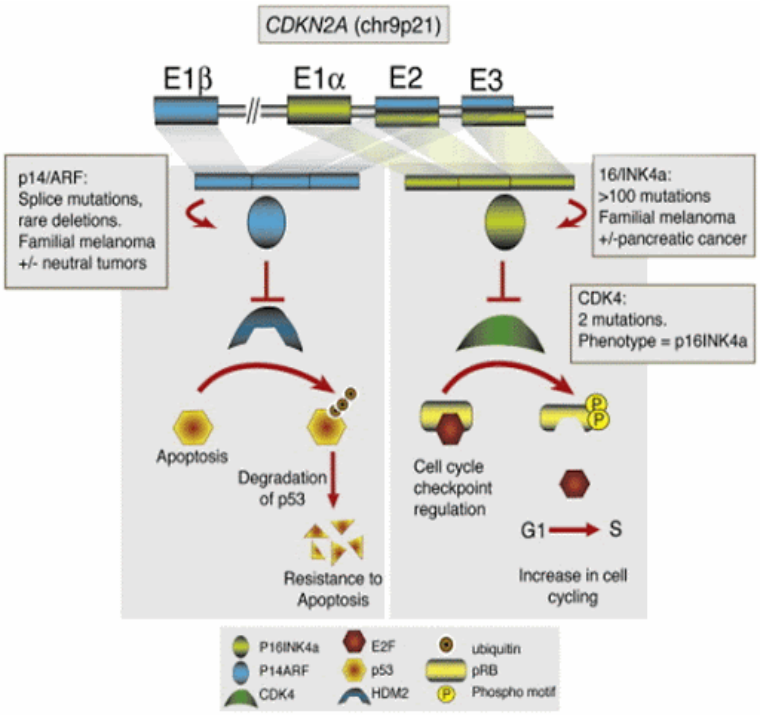
بافت توموری بدست آمده از طریق آسپراسیون با نیدل، بیوپسی با نیدل، یا بیوپسی با جراحی

منابع:

1.Mutations in the Kinase Domain of the *HER2*/*ERBB2* Gene Identified in a Wide Variety of Human Cancers. J Mol Diagn. 2015 Sep; 17(5): 487–495.

2.https://labtestsonline.org/tests/her2

P16 Mutation



لکوس ARF/INK4A همچنین به نام CDKN2 نیز شناخته می شود که دارای دو پروتئین به نامهای P14 و P16 می باشد. P16 یک پروتئبن ۱۶ کیلو دالتونی است که از ۱۵۶ اسید آمینه تشکیل شده است . این پروتئین یک مهار کننده چرخه سلولی می باشد و عمل خود را از طریق کنترل مسیر رتینوبلاستوما (Rb) انجام می دهد. P14 یک پروتئین ۱۴ کیلودالتونی می باشد که دارای ۱۳۲ اسید آمینه است. این پروتئین سرکوب کننده رشد سلولی از طریق چندین مسیر وابسته و غیر وابسته به p53 می باشد. P14 و P16 در حفظ هموستاز سلولی و جلوگیری از فرآیند انکوژنیک نقش حیاتی دارند. ژن این پروتئین ها در اکثر سرطانهای انسانی در اثر حذف ژنی، جهش نقطه ای یا متیلاسیون پروموتور، غیرفعال می شود. جهش در این ژن در سرطان های ریه، مثانه، و در ملانوما دیده می شود. بیش از ۴۰ ٪ فرم خانوادگی ملانوما در اثر جهش در ژن CDKN2 و نقص عملکرد P16 ایجاد می شود. سن شروع آن زودتر از افراد مبتلا به ملانوم پراکنده (غیر ارثی) است و افراد دارای جهش در خطر بالای ابتلا به ملانومای چشمی هستند برخی خانواده ها نیز مستعد ابتلا به سرطان لوزالمعده می باشند.

بررسی نقص ژنی ژن CDNK4 در شناسایی عامل بروز سرطان و نیز پیش اگهی دیگر افراد خانواده در فرم خانوادگی بسیار موثر است.

روش انجام تست:

تکثیر توالی ناحیه هدف در ژن CDNK4 با PCR و توالی یابی دو جهته سنگر (Sanger sequencing) جهت تشخیص نوع جهش و ردیابی آن در دیگر اعضای خانواده با تکنیک RFLP

نوع نمونه:

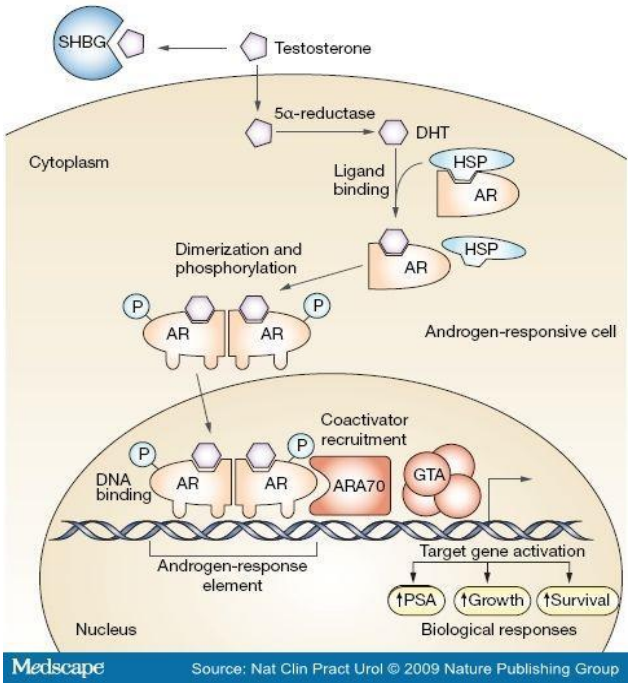
5ml خون محیطی حاوی EDTA

منابع:

1.Mousavi S, Mortazavi Y, Dargahi H, Shayan N, Alimoghadam K, Ghavamzadeh A, et al . Investigation of P16INK4A and P14RF genes expression in different phase of Chronic Myeloid Leukemia (CML). payavard. 2008; 2 (1 and 2) :89-96

2.https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CDKN2A

AR Mutations



ژن **AR** کد کننده پروتئینی به نام گیرنده آندروژن است . آندروژن ها نظر تستوسترون و دی هیدروتستوسترون برای تکامل جنسی نرمال در مردان پیش از تولد و طی بلوغ بسیار مهم هستند. آندروژن ها از طریق اتصال به گیرنده اندروژن کمپلکسی را تشکیل می دهند و در نهایت با اتصال به **DNA** موجب رونویسی از ژن های هدف می شوند. این گیرنده در بسیاری از بافت های بدن وجود دارند. تعییر در ژن **AR** با بیماری های مختلف همراه است. از جمله بیماری کندی که به علت افزایش تکراری های (بیش از ۴۰ تکرار) **CAG** در اگزون ۱ ژن ، سندرم عدم حساسیت به آندروژن جزئی و کامل به علت جهش های مختلف در اگزون های ۴-۸ ژن، بروز سرطان های مختلف در مردان و زنان از جمله سرطان پروستات، سینه و تخمدان. و بروز تخمدان پلی کیستیک در زنان می شود. بنابراین بررسی ژن گیرنده آندروژن در شناسایی علت بروز بیماری های ذکر شده و تلاش جهت درمان یا کاهش عوارض آن می تواند بسیار موثر باشد.

از سویی دیگر درمان محرومیت آندروژن (**ADT**) یک روش درمانی موثر دردرمان سرطان پروستات می باشد. بیشتر داروهای محرومیت آندورژن رایج نظیر **enzalutamide** و **abiraterone**، دمین متصل شونده به لیگاند را در پروتئین گیرنده آندروژن مورد هدف قرار می دهند، از این رو جهش در ژن کد کننده این ناحیه موجب ایجاد مقاوت دارویی و عدم پاسخ گویی به درمان می شود ، بر این اساس شناسایی علت مقاومت به درمان می تواند بسیار کمک رسان باشد.

روش انجام تست:

جهت آنالیز ژن **AR** با طراحی پرایمر برای نواحی مستعد جهش ، این توالی ها تکثیر شده و بررسی جهش ها با توالی یابی دوجهته سنگر(**Bi-directional Sanger sequencing**) انجام می شود.

نمونه مورد نیاز:

5ml خون محیطی حاوی EDTA

FFPE solid tumor tissue

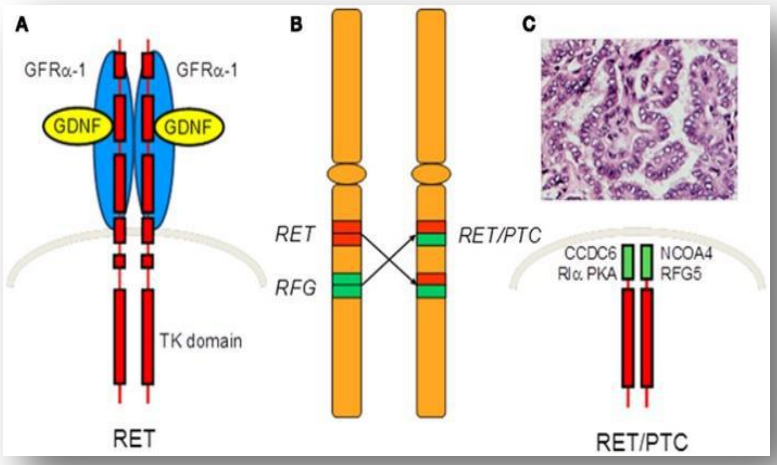
منابع:

1.https://neogenomics.com/test-menu/androgen-receptor-mutation-analysis

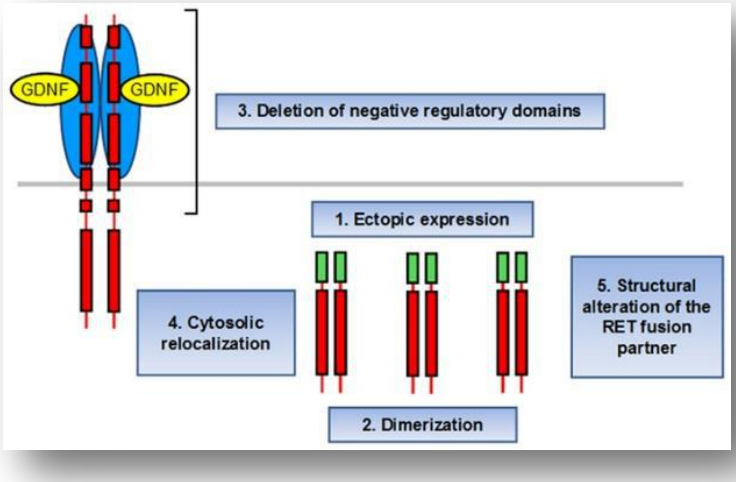
2.https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/334288/methodology

3.https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/334288/methodology

RET/PTC



سرطان تیروئید پاپیلاری (PTC) با بازآرایی های ژن RET همراهی دارد. ژن RET بر روی کروموزوم ۱۰ قرار دارد و کد کننده یک گیرنده تایروزین کینازی در غشای سلول است . در غده تیروئید، ژن RET به علت بازآرایی های کروموزومی و قرار گرفتن ناحیه ۳َ ژن درکنار ناحیه ۵َ چندین ژن غیر مرتبط بیش از حد فعال شده و به میزان زیاد بیان می شود. ابن بازآرایی تحت عنوان بازآرایی RET/PTC شناخته می شود. حداقل ۱۱ نوع مختلف از RET/PTC تا به امروز گزارش شده است. اکثر نقاط شکست ایجاد شده برای تشکیل فیوژن های RET/PTC در اگزون ۱۱ ژن RET وجود دارند و موجب جهش در دمین نایروزین کینازی گیرنده و دایمریزاسیون مستقل از لیگاند گیرنده و نهایتا فعالیت بیش از حد آن می شوند. این روند بر مسیر سیگنالینگ MAPK اثر می گذارد و سبب تکثیر بیش از حد سلول می شود.



مکانیسم عملکرد RET/PTC

روش انجام تست:

بررسی فیوژن ها و جهش های ژن های RET به روش تعیین توالی نسل جدید بر اساس RAN انجام می شود.

نمونه مورد نیاز:

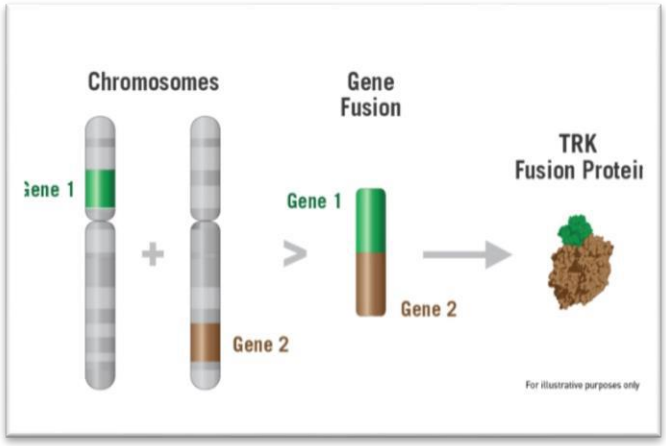
5mlخون محیطی حاوی EDTA

منابع:

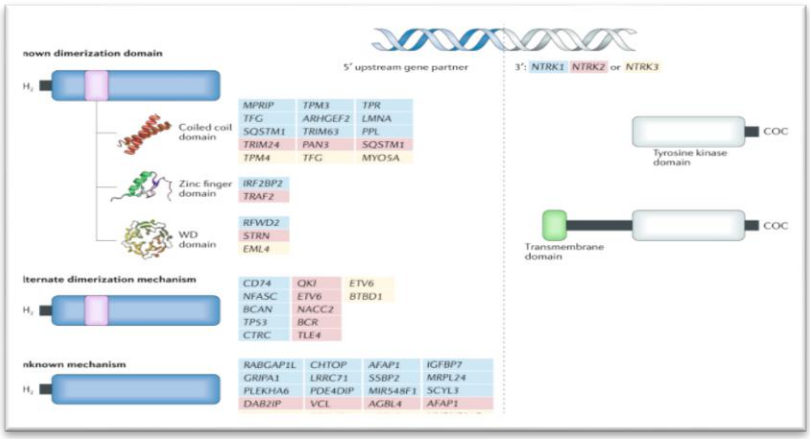
Raffaele Ciampi, Yuri E. Nikiforov, RET/PTC Rearrangements and BRAF Mutations in Thyroid Tumorigenesis, *Endocrinology*, Volume 148, Issue 3, 1 March 2007, Pages 936–941

Santoro, M., Melillo, R., & Fusco, A. (2006). RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture, *European Journal of Endocrinology eur j endocrinol*, *155*(5), 645-653. Retrieved Jul 13, 2020, from

NTRK Fusion and Mutation



خانواده ژن NTRK کد کننده پروتئین هایی هستند که برای تکامل و بقای سلول های عصبی ، مخصوصاً مواردی که اطلاعات راجع به احساساتی مانند درد ، دما و لمس منتقل می کنند ضروری است. پروتئین NTRK در سطح سلول های نورون های حسی وجود دارد و یک کیناز است که با اتصال نوروتروفین، خود و دیگر پروتئین های مسیر MAPK را فسفریله و فعال می کند و در تمایز سلول و مشخص کردن زیر گروه های نورون های حسی نقش دارد. جهش نقطه ای در اگزون های مختلف از سه ژن NTRK1, NTRK2 و NTRK3 شناسایی شده است. جهش در ژن NTRK1 به فراوانی بالا در فرم رایج سرطان تیروئید به نام کارسینومای پاپیلاری تیروئید بافت شده است. این جهش ها زمانی ایجاد می شوند که بازارایی های ژنتیکی بخشی از ژن NTRK1 را با ژن دیگر ترکیب کند. حداقل سه ژن دیگر در این بازآرایی شرکت می کند. ژن TMP3، TPR و TFG. همه این بازآرایی های ژنی یک انکوپروتئین TRK را تولید می کند که همیشه روشن و فعال است.



فیوژن های دیگر ژن NTRK نظیر-MPRIP-CD74-NTRK1, LMNA-NTRK1, NTRK1, SQSTM1-NTRK1, PPL-NTRK1, AFAP1-NTRK2, PAN3-NTRK2, TRIM24-NTRK2, BTBD1-NTRK3 و ETV6-NTRK3 موجب ایجاد پروتئین های انکوژنیک TRK می شود. این فیوژن های ژنی در بیش از ۲۰ نوع تومور دیده می شود.

روش انجام تست:

بررسی فیوژن ها و جهش های ژن های NTRK (NTRK1 و NTRK2) به روش تعیین توالی نسل جدید بر اساس RAN انجام می شود.

نمونه مورد نیاز:

FFPE tissue

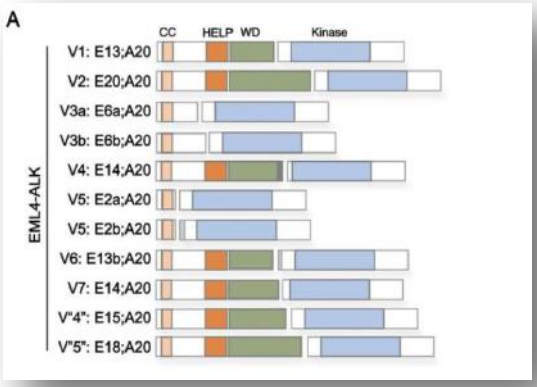
5mlخون محیطی حاوی EDTA

منابع:

https://neogenomics.com/test-menu/ntrk-ngs-fusion-profile

https://ghr.nlm.nih.gov/gene/NTRK1#conditions

ALK Mutations



ژن **anaplastic lymphoma kinase (ALK)** در ناحیه **2p23** قرار دارد و شامل ۲۹ اگزون می باشد. این ژن پروتئینی به نام گیرنده تایروزین کینازی **ALK** که جزیی از خانواده ایی که گیرنده تایروزین کیناری است را تولید می کند. زمانی که گیرنده تحریک می شود دایمریزه شده و سبب فسفریله شدن عناصر پایین دست شده و مسیر سیگنالی را تولید می کند که در رشد و تقسیم و تمایز سلول بسیار مهم است. فعال سازی **ALK** کیناز به واسطه ترانسلوکاسیون و جهش، در شماری از بدخیمی ها یافت می شود. فعال سازی **ALK** به واسطه سه مکانیسم به میزان بالا رخ می دهد: ۱) شکل گیری پروتئین الحاقی و فیوژ شده، ۲)افزایش بیان **ALK** ۲) جهش های نقطه ای فعال سازی **ALK**. بازآرایی کروموزوم لوکوس ژنی **ALK** در۴.۴٪ از **non-small cell lung cancer (NSCLC)** دیده می شود. شایع ترین بازآرایی ترانسلوکاسیون **EML4-ALK** است که ناشی از واژگونی در بازوی کوتاه کروموزوم ۲ و اتصال دمین **N** ترمینال **EML4** به دمین کیناز درون سلولی **ALK** (ناحیه ۳ ژن) می باشد و موجب ایجاد تایرزوین کینار فعال می شود. در این جابجایی کروموزومی ۹ واریانت و پروتئین فیوژ شده **EML4-ALK** شناخته شده است. جهش و ترانسلوکاسیون در ژن **ALK** در انواع دیگری از سرطان ها نیز **Anaplastic Non-Hodgkin's Lymphoma (ALCL)** ، **Basal Cell Carcinoma** ، **Breast Cancer** ، **Colorectal Carcinoma** ، **Neuroblastoma** و ...شناخته شده اند.

بدنبال شناخته شدن فیوژن **EML4-ALK** مهارکننده های موثر با کاربردهای بالینی نظیر **Crizotinib** ارائه شدند که به طور گسترده برای درمان **NSCLC** در بیماران دارای فیوژن **EML4-ALK** استفاده می شوند. اگر چه تومورهای **ALK** مثبت عموما به درمان با **Crizotinib** پاسخ می دهند، اما اثرات بیماری در بیشتر بیماران به علت تکامل مقاومت بازگشت می کند. مکانیسم مقاومت معمولا به علت تغییر در تواالی فیوژن **EML4-ALK** ، شمار افزایش یافته کپی نامبر ژن **ALK** بازارایی شده ، یا فعال شدن دیگر جهش های درایور است.

در ابن ازمایش واریانت ها و جهش های ژن ALK در بروز سرطان و نیز مقاومت به درمان با مهارکننده هایی نظیر crizotinib, alectinib و ceritinib مورد بررسی قرار می گیرد.

روش انجام تست:

تکثیر توالی حاوی جهش های ناحیه هدف در اگزون ۲۳ و ۲۵ ژن ALK با PCR و توالی یابی دو جهته سنگر (Sanger sequencing)

نوع نمونه:

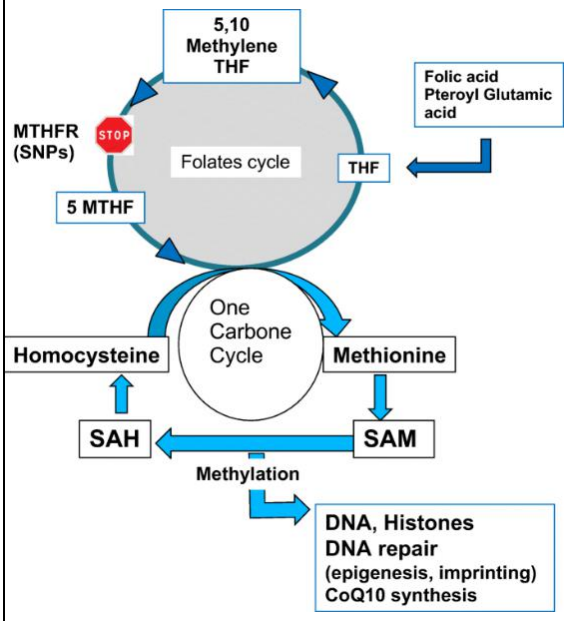
بافت FFPE، بلوک پارافینه مناسب تر است . یک اسلاید H&E و ۵-۱۰ اسلاید رنگ نشده با برش به اندازه ۵ میکرون یا بیشتر

منابع:

1.ALK-rearrangements and testing methods in non-small cell lung cancer: a review Rodney E. Shackelford, Genes & Cancer, Vol. 5 (1-2), January 2014

2.https://neogenomics.com/test-menu/alk-mutation-analysis

MTHFR Mutation



Thrombophilia به دلیل نقص در سیستم انعقاد خون رخ می‌دهد به طوریکه در داخل رگ‌های بدن لخته‌های خونی ایجاد می‌شود. این بیماری به دلایل ژنتیکی و یا محیطی رخ می‌دهد.

افزایش سطح هموسیستئن در خون می‌تواند خطر بروز Thrombophiliaرا افزایش دهد. بالا رفتن هموسیستئن خون می‌تواند ناشی از فقر غذایی و کمبود ویتامین B6 ، B12و فولیک اسید باشد و یا نقص ژنتیکی در مسیر متابولیسمی هموسیستئن باعث بروز این عارضه شود.

هموسیستئین یک اسید آمینه گوگرددار است که از متیونین غذایی منشاء می‌گیرد. این ماده سمی است. در داخل سلول‌ها متیونین پس از دمتیلاسیون تبدیل به هموسیستئین شده و سپس تحت اثر آنزیم‌های MTHFR و متیلن سنتتاز مجدداً متیله شده و به متیونین تبدیل می‌شود. کوفاکتورهای این مسیر آنزیمی اسید فولیک، ویتامین B6 و ویتامین B12 هستند.آنزیم (MTHFR) باعث کاهش ۱۰،۵ - متیلن تترا هیدروفولات و تبدیل آن به ۵- متیلن تترا هیدروفولات می‌شود. این ماده به عنوان دهنده گروه کربنی در واکنش تولید متیونین از هموسیستئن توسط آنزیم متیونین سنتتاز به کار برده می‌شود.

دو واریانت ژنی C677T و A1298C در ژن MTHFR وجود دارد. جهش C677T در ژن MTHFRباعث جایگزینی اسید آمینه والین به جای آلانین در موقعیت ۲۲۲ زنجیره پروتئینی می‌شود. در نتیجه این جهش، آنزیم MTHFR با فعالیت کمتر تولید می‌شود که افزایش سطح هموسیستئن خون را به همراه دارد. این نقص به صورت اتوزومال مغلوب به ارث می‌رسد.

افزایش هموسیستئین به سطح بیشتر از ۵۰ میکرومول/ لیتر منجر به ترومبوآمبولی، آترواسکلروز در دوران کودکی شده و در زنان باردار، احتمال ابتلاء جنین به NTDs (Neural Tube Defects)و سقط جنین را افزایش می‌دهد. زنان با دو ژن جهش یافته C677T دو برابر بیشتر در خطر داشتن کودک با نقص NTD هستند. مردان و زنان با دو واریانت C677T (هموزیگوت) با سطح بالاتری از هموسیستئین و خطر بروز لخته خونی هراه هستند. هتروزیگوت بودن برای دو واریانت C677T و A1298C خطرکمتری در مقایسه با هموزیگوسیتی برای واریانت C677T را سبب می شود.

روش انجام تست:

بررسی این پلی مورفیسم توسط آزمایش RFLP-PCR انجام می‌گیرد. در این روش ابتدا قطعه ژن مورد نظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر می‌شود. سپس محصول PCR تحت تأثیر آنزیم‌های برش دهنده قرار می‌گیرد. این آنزیم به گونه‌ای انتخاب می شود که در صورت وجود جهش، قطعه مورد نظر را برش دهد. سپس محصول برش یافته بر روی ژل مشاهد می‌شود. برای اطمینان از عملکرد PCR و آنزیم از یک نمونه کنترل مثبت استفاده می شود. آلوده نبودن شرایط آزمایش نیز توسط یک کنترل منفی سنجیده می‌شود. از روش ARMS نیز می توان برای بررسی این پلی مورفیسم ژنی استفاده کرد و ژنوتایپ افراد تحت بررسی را مشخص نمود.

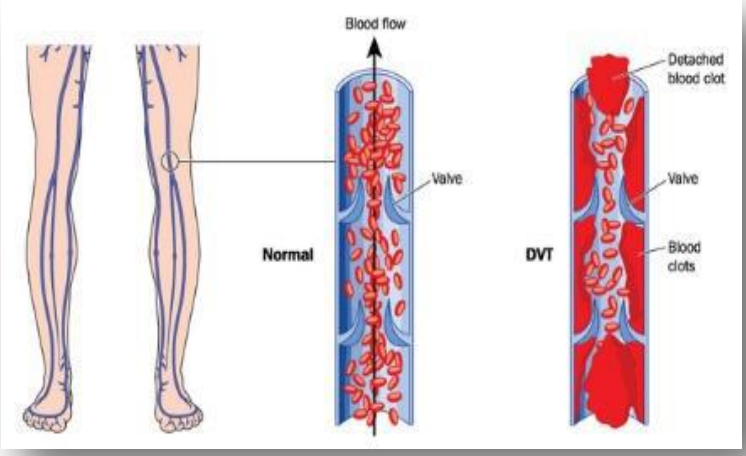
نمونه مورد نیاز:

5ml خون محیطی حاوی EDTA

منابع:

https://rarediseases.info.nih.gov/diseases

Factor V Leiden (FVL)



فاکتور ۵ انعقادی یکی از فاکتورهای پیش انعقادی مهم بوده و ژن سازنده آن بر روی کروموزوم ۱ قرار دارد. اندازه آن 80kb و شامل ۲۵ اگزون می باشد.گلیکوپروتئین فاکتور ۵ به عنوان کوفاکتور کمپلکس پروترومبیناز عمل کرده و پروترومبین را به ترومبین تبدیل می کند تا در ادامه با تولید فیبرین از فیبرینوژن لخته اولیه تشکیل شود. سه پلی مورفیسم شایع برای این فاکتور شناسایی شده است که عبارتند از : A5279G،A4070G،G1691A که واریانت G1691A بنام فاکتور ۵ لیدن شناخته می شود. پلی مورفیسم فاکتور ۵ لیدن توارث آتوزوم غالب دارد و در اثر جابجایی یک نوکلئوتید بروز می یابد. جهش در نوکلئوتید ۱۶۹۱ در اگزون ۱۰ ژن باعث تغییر اسید امینه آرژنین به گلوتامین شده که باعث حذف محل اصلی شکست در جایگاه ۵۰۶ گشته و منجر به مقاومت فاکتور ۵ فعال به عملکرد پروتئین c می شود. در افراد نرمال بعد از ایجاد لخته بقایای فاکتور ۵ فعال، توسط پروتئین C فعال شده در محل آرژنین ۵۰۶ شکسته و غیرفعال می گردد، ولی در افراد دارای فاکتور ۵ لیدن ، فاکتور ۵ به شکستن و تجزیه شدن مقاوم شده و مدت زمان بیشتری فعال می ماند که با افزایش خطر ترومبوز همراه است در این افراد افزایش تولید ترومبین منجر به تولید فیبرین اضافی گشته و لخته بیشتری تولید می شود. بسته به اندازه و محل تشکیل لخته نوع علائم بروز متفاوت است و سبب عوارضی نظیر مشکلات بارداری، ترومبوز ورید عمقی، و آمبولی ریوی می شود. خطر ایجاد لخته در یک رگ خونی منوط بر این است که فرد یک کپی یا دو کپی از ژن جهش یافته فاکتور ۵ لیدن را داشته باشد.

روش انجام تست:

بررسی جهش به روش PCR-RFLP یا ARMS صورت می گیرد. در روش ARMS، برای آلل نرمال و موتانت ژن مورد نظر پرایمر اختصاصی طراحی می شود و نمونه فرد بیمار از نظر دارا بودن جهش و هموزیگوت یا هتروزیگوت بودن مورد آزمایش قرار می گیرد.

تفسیر نتایج:

نتایج منفی:

فرد حامل جهش نمی باشد

نتایج مثبت:

توارث یک کپی از ژن جهش دار (فرم هتروزیگوت) احتمال ایجاد لخته را ۴ تا ۸ برابر و توارث دو کپی از ژن موتانت (هموزیگوت) تا ۸۰ برابر حالت معمول افزایش می دهد.۹۰- ۹۵ درصد افراد دارای جهش هتروزیگوت هستند.

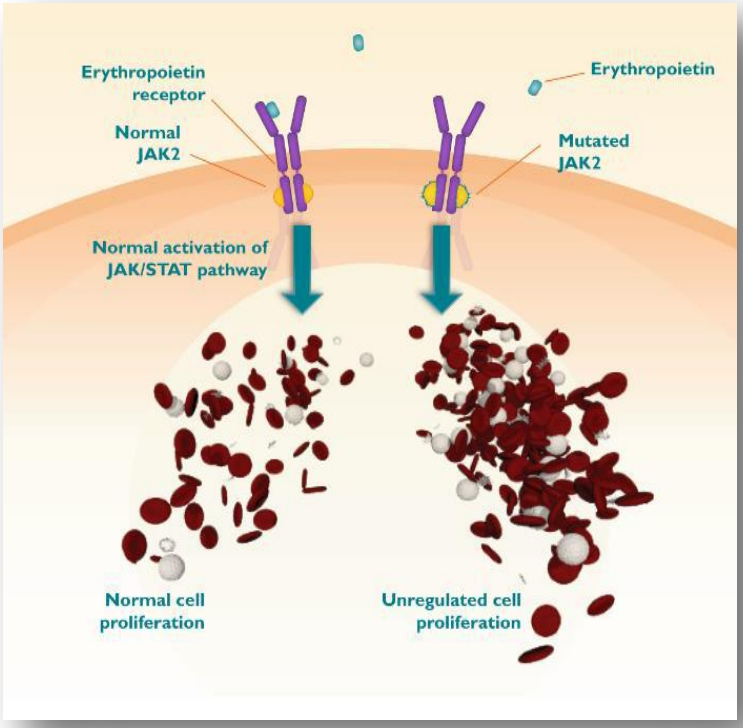
نمونه مورد آزمایش:

5ml خون محیطی حاوی EDTA

منابع:

monfaredan a, shams snejan k, farshdousti hagh m, , movassaghpour akbari a a. polymorphism of 1691g> a, v coagulation factor gene in the healthy population of east azerbaijan province of iran. stud med sci. 2013; 24 (3) :219-2

JAK2 Mutations



در سال ۲۰۰۵، چندین گروه از محققان یک جهش نقطه ای سوماتیک را در پروتئین حاصل از ژن JAK2 (Janus kinase) در خون و مغز استخوان بیماران مبتلا به اختلالات میلوپرولیفراتیو مزمن که برای فیوژن BCR-ABL منفی بودند گزارش کردند. بیماری‌های میلوپرولیفراتیو، از جمله بیماری‌های تکثیری مغز استخوان می‌باشد که در اثر برداشته شدن اثر مهاری در تقسیمات سلول‌های میلوئیدی در مرحله بلوغ رخ می‌دهد. نتیجه آن باعث می‌شود سلولها بدون نیاز به فاکتورهای رشد، تقسیم شوند و سلولهای خاص از آنها، در مرحله بلوغ باقی بمانند. همه بیماری‌های کلونال(تکثیری مغز استخوان) از انواع سرطان‌ها می‌باشند، که در اثر یک یا بیشتر از یک جهش در فقط یک سلول ایجاد می‌شوند.

بیماری‌های میلوپرولیفراتیو دارای جهش در ژن‌هایJAK2 ، CALR وMPL ، می‌باشند. که از بین این جهش‌ها، جهش در ژن JAK2 مهمترین جهش محسوب می‌شود. ژن JAK2 بر روی کروموزوم ۹ و در ناحیه 9q24 قرار دارد و یک تایروزین کیناز را کد می کند که نقشی مهم در انتقال سیگنال سلولی در سلول های خونساز دارد. شایع ترین جهش سوماتیک درون اگزون ۱۴ و در جفت باز ۱۸۴۹ واقع می شود و موجب جای گزینی فنیل آلانین به جای والین در محصول پروتئینی ژن می شود. این جهش یه فرم V617F گزارش می شود. جهش موجب فعالیت بالای کیناز می شود و اجازه بقای مستقل اریتروپویتین از سلول بنیادی میلوئید را می دهد. جهش های با شیوع کمتر در اگزون های ۱۲ تا ۱۵ یافت شده اند.

با انجام تست های حساس ، جهش JAK2 تقریبا در ۹۸-۱۰۰٪ موارد پلی سیتمی ورا (زمانی اتفاق می‌افتد که سلولهای پیش‌ساز مغز استخوان بیش از اندازه گلبول قرمز تولید کند) ، ۵۰-۷۰٪ بیماران با ترومبوستمیای ایدیوپاتیک(زمانی رخ می‌دهد که سلولهای پیش‌ساز مغز استخوان بیش از اندازه تولید پلاکت کند) و ۴۰-۵۰٪ موارد میلوفیبروزیس ایدیوپاتیک (زمانی رخ می‌دهد که سلولهای پیش‌ساز مغز استخوان بیش از اندازه تولید بافت فیبروز مغز استخوان بکند) یافت می شود.

روش انجام تست:

بررسی جهش شایع V617F موجود در ژنJAK2 ، یک تست خونی می‌باشد که در آن بعد از استخراج DNA از خون، با پرایمر اختصاصی نوکلئوتید جهش یافته و همچنین نوکلئوتید wild type تکثیر منطقه ژنی به روش ARMS- PCR انجام شده و نتایج بر روی ژل الکتروفورز آنالیز می شود.

جهت شناسایی سایر جهش ها بعد از استخراج DNA از خون و تکثیر منطقه ژنی به روش PCR و تایید منطقه تکثیر شده از طریق ژل الکتروفورز، محصول PCR جهت تعیین توالی به روش سانجر ارسال می‌گردد. پس از آن با آنالیز نتایج حاصل از تعیین توالی، نوع ژنوتیپ فرد مشخص می‌شود.

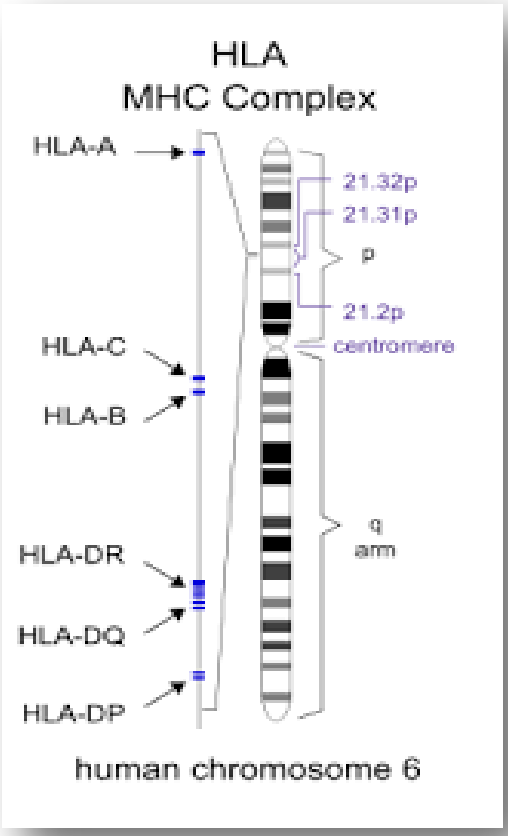
نمونه مورد نیاز:

10ml خون محیطی داری EDTA

منابع:

1.http://www.clinlabnavigator.com/jak2-mutation

2.https://ghr.nlm.nih.gov/gene/JAK2



HLA-DR Variant

کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (MHC) یک قسمت از ژنوم است که نقش اساسی در بروز پاسخ ایمنی نسبت به آنتی ژنهای پروتئینی ایفا می‌کنند و در بازوی کوتاه کروموزوم ۶ (6P21) واقع شده است که در انسان این کمپلکس را تحت عنوان آنتی ژنهای لکوسیتی انسان (HLA) می‌شناسند. HLA .بر اساس ساختمان توزیع بافتی و عملکرد به سه ناحیه مشخص HLA کلاس I (A,B,C) ، HLAکلاس II (DP, DQ, DR) و کلاس III تقسیم می شود. ژنهای کد کننده مولکولهای I-HLA و II-HLA پلیمورف ترین سیستم ژنتیکی در ژنوم انسان هستند، به طوری که برخی از لوکوسها مثال لوکوس B یا DRB1بیش از ۳۰۰ آلل دارند.

یکی از کاربردهای تست HLA typing در روند پیوند عضو یا بافت است که با تعیینHLA های فرد دهنده و گیرنده و میزان شباهت آن ها، می توان از بروز واکنش ایمونولوژیک و رد پیوند ممانعت به عمل آورد. به علاوه برخی از انواع HLA با بروز بیماری های خود ایمن در فرد مرتبط است؛ به عنوان مثالا HLA B27 ، HLA DRB2, 51 , HLA B52 , HLA DR4، (HLADQ8, DQ2)، به ترتیب در ارتباط با بیماری‌های اسپوندیلیت انکیلوزان، لوپوس، سندرم بهجت، آرتریت روماتوئید و سلیاک می‌باشند.

روش انجام تست:

HLA Typing به روش مولکولی با استفاده از تکنیک PCR-SSP انجام می شود. در این روش پرایمر اختصاصی توالی سنتر می شود و به کمک آن ناحیه ژنی با اختصاصیت بالا تکثیر شده و نتایج آنالیز می شود. با کمک این روش می توان از نمونه هایی با حجم کم استفاده کرد و در حداقل زمان ممکن و با ضریب خطایی به مراتب پایین تر به جواب رسید . بر این اساس ارتباط و همراهی بین آلل های HLA و بروز بیماری های مختلف مورد بررسی قرار می گیرد.

نمونه مورد نیاز:

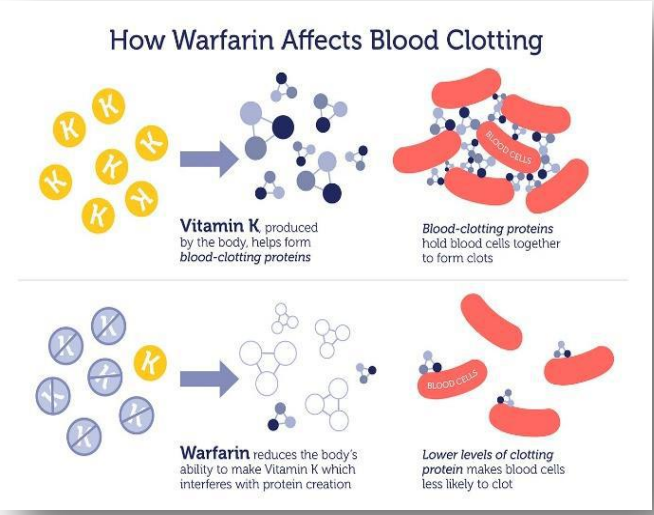
5ml خون محیطی حاوی EDTA

منابع:

1.http://labdiagnosis.ir/article

2.https://www.eurofins-biomnis.com/en/services/test-guide/page/HLA2

Warfarin Dosage



وارفارین متداول ترین داروی ضد انعقاد خوراکی برای پیش گیری و درمان بیماری های ترومبوتیک است که در مواردی چون فیبریلاسیون دهلیزی، اریتمی قلبی و جراحی ارتوپدی و ترومبوفیلی به منظور کاهش خطر ترومبوز مورد استفاده قرار می گیرد. مجویز دوز مناسب وارفارین برای هر بیمار اهمیت زیادی دارد زیرا مقادیر کمتر از دوز مورد نیاز منجر به وقوع سکته و یا دیگر عوارض ترومبوزهای تحدید کننده حیات شده و مقادیر بیش از حد آن با خون ریزی های جدی همراه است. دوز وارفارین با فاکتورهای مختلفی نظیر سن ، جنس، وزن رژیم غذایی، مصرف سایر داروها، شرایط بالینی و فاکتورهای ژنتیکی بستگی دارد. تنوع ژنتیکی در بیماران نقش مهمی در تعیین دوز وارفارین دارد که باید هنگام شروع استفاده از ضد انعقاد خوراکی مورد توجه قرار گیرد.

ویتامین K به عنوان کوفاکتور در مسیر سنتز ترومبین و دیگر فاکتورهای انعقاد از جمله فاکتورII ،VII، IX ، و X می‌باشد در نتیجه ویتامین K نقش بسیار حیاتی در فرآیند لخته شدن خون ایفا می‌کند و در مقابل وارفارین یک داروی ضد انعقاد و لخته شدن می‌باشد و باعث مهار پیشبرد این مسیر می‌شود. ژن VKORC1 (Vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1)، آنزیم ویتامین K اپوکسید ردوکتاز را بیان می‌کند. این آنزیم فرم غیر فعال ویتامین K را به فرم کاهشی و فعال آن تبدیل می‌کند. وارفارین باعث مهار فرم فعال ویتامین K از طریق اثر مهاری بر روی VKORC می‌شود و تولید فاکتورهای انعقادی و ایجاد لخته را کاهش می‌دهد. پلی مورفیسم های G1639A و C1173T و SNPی rs8050894 در ژنVKORC1 در تعیین میزان دوز مصرف داروی وارفارین موثر می‌باشد.

ژن(10q23.23) CYP2C9 (cytochrome P450 2C9) ، بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۰ قرار دارد. این ژن آنزیم سیتوکروم P4502C9 را بیان می‌کند. تحت تاثیر این آنزیم، S وارفارین

به متابولیت‌های غیرفعال خود تبدیل می‌شود و از این طریق سطح پلاسمایی آن کاهش می‌یابد. SNP های rs1057910 و rs1799853 در ژن CYP2C9 در تعیین میزان دوز مصرف داروی وارفارین موثر می‌باشد.

روش انجام تست:

ژنوتایپینگ مرتبط با دوز وارفارین در بررسی ژنتیکی با استفاده از PCR و Sequencing مناطق خاصی از دو ژن CYP2C9 و VKORC1 مورد آنالیز قرار گرفته و با استفاده از جدول رفرانس معتبر و مورد تایید FDA، دوز مناسب و موثر وارفارین اختصاصی بیمار تعیین می شود.

نمونه مورد نیاز:

5ml خون محیطی حاوی EDTA

منابع:

1.Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N, et al. A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. *N Engl J Med*. 2013;369(24):2294-2303. doi:10.1056/NEJMoa1311386

2.Moyer TP, O'Kane DJ, Baudhuin LM, et al. Warfarin sensitivity genotyping: a review of the literature and summary of patient experience. *Mayo Clin Proc*. 2009;84(12):1079-1094. doi:10.4065/mcp.2009.0278