



A Sysmex Group Company



Kullanım Talimatları (IFU)

REF: CE-LPH 064-S / CE-LPH 064

FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe



YALNIZCA PROFESYONEL KULLANIM İÇİNDİR



Daha fazla bilgi ve diğer diller şurada mevcuttur: ogt.com/IFU

Kullanım Amacı

CytoCell® FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe, doğrulanmış veya şüpheli akut miyeloid lösemili (AML) hastalardan alınan, Carnoy çözeltisinde (3:1 metanol/asetik asit) sabitlenmiş ve hematolojik olarak türetilmiş hücre süspansiyonlarında kromozom 15 üzerindeki 15q24 bölgesi ile kromozom 17 üzerindeki 17q21.1-q21.2 bölgesi arasındaki kromozomal yeniden düzenlemeleri tespit etmek için kullanılan, kalitatif, otomatik olmayan bir floresans *yerinde* hibridizasyon (FISH) testidir.

Kullanım Endikasyonu

Bu cihaz, onaylanmış tanısal ve klinik bakım yollarında, PML::RARA translokasyon durumu bilgisinin klinik yönetim için önemli olacağı, diğer klinik ve histopatolojik testlere ek olarak tasarlanmıştır.

Sınırlamalar

Bu cihaz, PML ve RARA bölgelerini içeren bu prob setindeki kırmızı ve yeşil klonların kapladığı bölgedeki kırılma noktalarının yeniden düzenlemelerini tespit etmek için tasarlanmıştır. Bu bölge dışındaki kırılma noktaları ya da tümüyle bu bölge dahilinde olan çeşitli yeniden düzenlemeler bu cihazla tespit edilemeyecektir. Bu cihaz şunlar için kullanılmaz: bağımsız tanılama, birlikte tanılama, prenatal test, popülasyon bazlı tarama, hasta başında test ya da kendi kendine test. Bu cihaz, kullanım amacında belirtilenler dışındaki numune tipleri, hastalık tipleri ya da amaçlar için doğrulanmamıştır. Tanılama amaçlı diğer laboratuvar testlerine yardımcı olması için kullanılmalıdır. Yalnızca FISH sonuçlarına dayanarak tedavi başlatılmamalıdır. FISH sonuçlarının raporlanması ve yorumlanması, uygun vasıflara sahip personel tarafından yapılmalı, profesyonel uygulama standartlarıyla tutarlı olmalıdır ve ilgili diğer test sonuçları, klinik ve tanılama bilgilerini de göz önünde bulundurulmalıdır. Bu cihaz yalnızca laboratuvar ortamında profesyonel kullanım içindir. Protokole bağlı kalınmaması performansı etkileyebilir ve yanlış pozitif/negatif sonuçlara neden olabilir.

Test Prensipleri

Floresans *yerinde* hibridizasyonu (FISH), DNA dizilimlerinin metafaz kromozomlar üzerinde ya da sabit sitogenetik numunelerden alınan interfaz çekirdeklerde tespit edilmesine yardımcı olan bir tekniktir. Bu teknik, tüm kromozomları ya da tekli özgün dizilimleri melezleştiren DNA problemlerini kullanır ve G bantlı sitogenetik analiz için güçlü bir yardımcıdır. Bu teknik, prenatal, hematolojik ve solid tümör kromozomal analizlerde temel bir araştırma aracı olarak kullanılabilir. Fiksasyon ve denatürasyonun ardından, hedef DNA komplementer bir dizilime sahip, benzer bir denatüre, floresan etiketli DNA probuna tavlammaya hazır hale gelir. Hibridizasyonu takiben, bağırsız ve belirsiz bağlı DNA probu kaldırılır ve DNA vizüalizasyon için karşıt boyayla boyanır. Floresan mikroskop böylece hedef materyal üzerindeki melezleştirilmiş probun görüntülenmesini yapabilir.

Prob Bilgisi

PML (promiyelositik lösemi) geni 15q24.1'de, RARA (retinoik asit reseptörü alfa) geni ise 17q21.2'de yer alır. t(15;17)(q24;q21) translokasyonu, PML::RARA füzyon genini oluşturur ve akut promiyelositik lösemi (APL) teşhisi göstergesidir.

Bu FAST PML/RARα FISH probu yalnızca bir saatlik bir hibridizasyon gerektirerek, yeniden düzenlemenin hızlı bir şekilde algılanmasını sağlar.

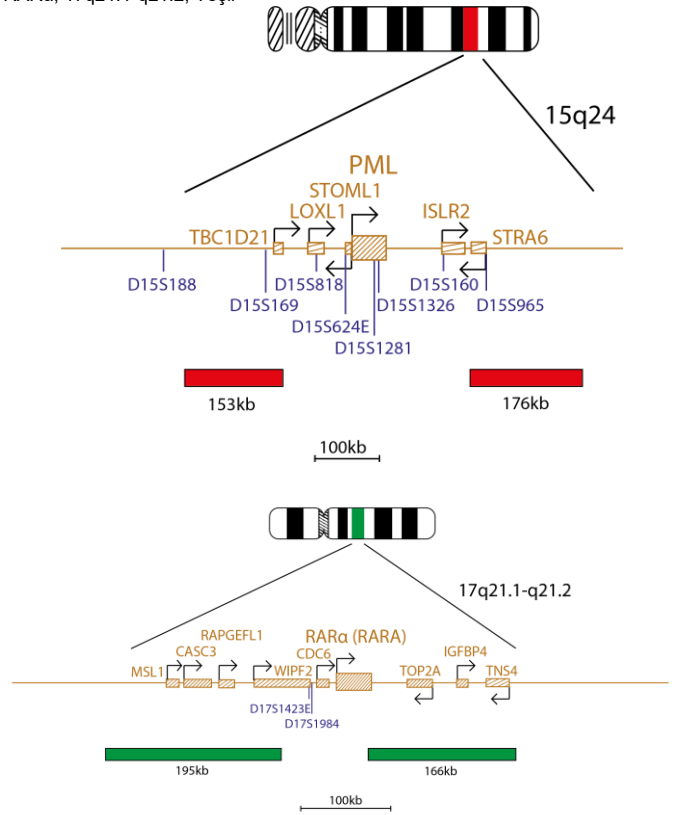
PML::RARA füzyon geni, akut miyeloid lösemi (AML) vakalarının %5-8'ini oluşturan bir lösemi olan APL vakalarının %90'ından fazlasında bulunan t(15;17)(q24;q21) translokasyonu ile oluşturulur^{1,2}. Bir vaka alt grubunda, varyant RARA translokasyonları gözlemlenebilir. Bilinen füzyon ortakları arasında 5q35'te NPM1, 11q13'te NUMA1, 11q23'te ZBTB16 (PLZF), 17q21'de STAT5B, 17q24'te PRKAR1A, 4q12'de FIP1L1 ve Xp11'de BCOR vardır^{3,4,5}.

PML ve RARA'nın her ikisi de normal hematopoeze katılmıştır. PML, büyüme baskılayıcı ve proapoptotik aktiviteye sahipken RARA, retinoik asidin spesifik tepki elemanlarındaki etkisine aracılık eden bir transkripsiyon faktörüdür⁶. PML::RARA füzyon proteinini, onkojenik sinyal iletimi kabiliyeti olan, değiştirilmiş bir retinoik asit reseptörü gibi davranır⁷.

APL hastalarının acil tedavisi, ölümcül pıhtılaşma bozuklukları ve tanıda hayatı tehdit eden kanama nedeniyle kritik öneme sahiptir. APL tedavi protokollerinde tümü geçişli retinoik asit (TGRA) ve arsenik trioksitin (ATO) kullanımasından önce hastalığın kötü prognozu vardı. Ancak, bu tedavilerin uygulamaya konmasından bu yana, genel sağ kalma oranı, hastaların neredeyse %90'nın⁵ iyileşmesiyle çarpıcı bir şekilde iyileşmiştir. Varyant RARA translokasyonları olan hastalar tedaviye değişken hassasiyet gösterirken bazı hastalar tedavi protokollerine direnç gösterir^{3,5}. Bu yüzden PML::RARA füzyonu olan APL hastaları ile varyant RARA translokasyonu olan hastalar arasında ayırım yapılması önemlidir.

Prob Spesifikasyonu

PML, 15q24 Kırmızı
RARA, 17q21.1-q21.2, Yeşil



Kırmızı olarak etiketlenen PML prob karışımı, D15S169 işaretçisini kapsayan PML genine sentromerik bir 153kb probu ve D15S965 işaretçisini kapsayan PML genine telomerik bir 176kb probu içerir. Yeşil olarak etiketlenmiş RARA (RARA) prob karışımı, CASC3 geni dahil olmak üzere RARA (RARA) genine sentromerik bir 195kb probdan ve RARA (RARA) geninin telomerik ucu ile TOP2A, IGFBP4 ve TNS4 genlerini içeren 166kb probdan oluşur.

Tedarik Edilen Materyaller

Prob: Viyal başına 50 µl (5 test), viyal başına 100 µl (10 test)
Problar, hibridizasyon çözeltisine (<%65 formamit; <20 mg dekstran sülfat; <%10 20 kat salin-sodyum sitrat (SSC)) karıştırılmış olarak tedarik edilir ve kullanıma hazırdır.

Karşıt boya: Viyal başına 150 µl (15 test)

Karşıt boya, DAPI Antifade ES'dir (gliserol bazlı gömme ortamı içinde 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

Uyarılar ve Tedbirler

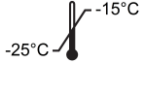
1. Yalnızca *in vitro* tanılama amaçlıdır. Yalnızca laboratuvar ortamında profesyonel kullanım içindir.
2. Prob karışımları bir teratojen olan formamit içermektedir; buharı solumayın ya da cildinize temas ettirmeyin. Kullanırken özen gösterin; eldiven ve laboratuvar önlüğü giyin.
3. DAPI'yı kullanırken özen gösterin; eldiven ve laboratuvar önlüğü giyin.
4. Viyaller zarar görmüş ya da viyal içerikleri bir şekilde bozulmuşsa bunları kullanmayın.

- Bu ürünü güvenli şekilde imha etmenin yolunu bulmak için Güvenlik Veri Sayfasındaki önerilerle birlikte bulunduğunuz konumdaki yerel imha yönetmeliklerini izleyin. Bu zarar görmüş test kiti içerikleri için de geçerlidir.
- Kullanılmış tüm reaktifler ve diğer tüm kontamine ve tek kullanımlık materyalleri, enfeksiyöz ya da enfeksiyon potansiyeli olan atık prosedürlerini izleyerek imha edin. Katı ve sıvı atıkları, yapısı ve tehlike derecesine göre kullanmak ve bunları geçerli yönetmelikler uyarınca işlemek ve imha etmek (ya da işletmek ve imha ettirmek) laboratuvarın sorumluluğudur.
- Operatörler, kırmızı, mavi ve yeşil renkleri ayırt edebiliyor olmalıdır.
- Belirtilen protokol ve reaktiflere bağlı kalınmaması performansı etkileyebilir ve yanlış pozitif/negatif sonuçlara neden olabilir.
- Bir prob diğer problemlerle seyreltilmemelidir ya da karıştırılmamalıdır.
- Protokolün ön denatürasyon aşaması sırasında 10 µl prob kullanılmaması, performansı etkileyebilir ve yanlış pozitif/negatif sonuçlara neden olabilir.
- Tüm ürünler kullanılmadan önce doğrulanmalıdır.
- İç kontroller, numuneleri test ederken etkilenmeyen hücre popülasyonları kullanılarak yapılmalıdır.

Sıcaklık Açıklamaları

- 20 °C / Donmuş / Dondurucuda: -25 °C ila -15 °C
- 37 °C: +37 °C ± 1 °C
- 72 °C: +72 °C ± 1 °C
- 75 °C: +75 °C ± 1 °C
- Oda Sıcaklığı (RT): +15 °C ila +25 °C

Muhafaza ve Kullanım

 Bu kit, kit etiketinde belirtilen son kullanma tarihine kadar -25 °C ile -15 °C arasında bir dondurucuda muhafaza edilmelidir. Prob ve karşıt boya vialleri karanlık bir ortamda muhafaza edilmelidir.

 FISH probu, DAPI Antifade ES karşıt boyası ve Hibridizasyon Çözeltisi, normal kullanım sırasında uygulanan dondurma-çözme döngülerinde stabil kalır (burada bir döngü vialin dondurucudan çıkarılması ve dondurucuya yerleştirilmesinden oluşur) - 50 µl (5 test) vial FISH probu için 5 döngü, 100 µl (10 test) vial FISH probu için 10 döngü ve 150 µl (15 test) vial karşıt boya için 15 döngü. Işığa maruz kalma en aza indirilmeli ve mümkün oldukça önlenmelidir. Bileşenleri, verilen ışık geçirmez kaptan muhafaza edin. Etiketle belirtilenler dışındaki koşullarda kullanılan ve muhafaza edilen bileşenler, gerektiği gibi çalışmayabilir ve test sonuçlarını olumsuz etkileyebilir. Işığa ve sıcaklık değişimlerine maruz kalmasının önüne geçmek için her türlü çaba sarf edilmelidir.

Gerekli Olan Fakat Tedarik Edilmeyen Teçhizat ve Materyaller

Kalibre edilmiş teçhizat kullanılmalıdır:

- Isıtmalı tabla (sert bir tabla ve 80 °C'ye kadar doğru sıcaklık kontrolü)
- Kalibre edilmiş değişken hacimli mikropipet ve uç aralığı 1 µl-200 µl
- Doğru sıcaklık kontrolünde (37 °C ve 72 °C) su banyosu
- Mikrosantrifüj tüpler (0,5 ml)
- Floresan mikroskop (Lütfen Floresan Mikroskop Önerisi bölümüne bakınız)
- Faz kontrast mikroskopu
- Temiz plastik, seramik ya da ısıya dayanıklı cam Coplin kavanozlar
- Forseps
- Kalibre edilmiş pH ölçüm cihazı (ya da pH 6,5-8,0 ölçeklenen pH indikatör şeritler)
- Nemli kap
- Floresan dereceli mikroskop lensi immersiyon yağı
- Tezgah üstü santrifüj
- Mikroskop lamaları
- 24x24 mm lameller
- Zamanlayıcı
- 37 °C inkübatör
- Kauçuk çözelti yapıştırıcısı
- Vorteks mikser
- Dereceli silindirler
- Manyetik karıştırıcı
- Kalibre edilmiş termometre

Tedarik Edilmeyen Tercihe Bağlı Teçhizat

- Sitogenetik kurutma kabini

Gerekli Olan Fakat Tedarik Edilmeyen Reaktifler

- 20 kat salin-sodyum sitrat (SSC) Çözeltisi
- %100 Etanol
- Tween-20
- 1 M Sodyum hidroksit (NaOH)
- 1 M Hidroklorik asit (HCl)
- Artırılmış su

Floresan Mikroskop Önerisi

Optimal vizüalizasyonu için, 100 vat cıva buharlı lamba ya da muadili bir lamba ve yağ immersiyonu planı apokromat objektiflerini (60/63 kat ya da 100 kat) kullanın. Bu prob setinde kullanılan florofor şu dalga boylarını eksite eder ve yayar:

Florofor	Eksitasyon _{max} [nm]	Emisyon _{max} [nm]
Yeşil	495	521
Kırmızı	596	615

Mikroskoba yukarıda listelenen ses dalgalarını kapsayan uygun eksitasyon ve emisyon filtrelerinin takıldığından emin olun. Yeşil ve kırmızı floroforların optimal eş

zamanlı vizüalizasyonu için, üçlü DAPI/yeşil spektrum/kırmızı spektrum bant geçirici filtre ya da ikili yeşil/kırmızı spektrum bant geçirici filtre kullanın. Doğru şekilde çalıştığından emin olmak için, floresan mikroskobu kullanmadan önce kontrol edin. Floresan mikroskoba uygun ve düşük otomatik floresan için formüle edilmiş immersiyon yağı kullanın. DAPI renk solması önleyici karışımı mikroskop immersiyon yağıyla karıştırmaktan kaçının. Bu, sinyalleri bozacaktır. Lamba ömrü ve filtrelerin yaşıyla ilgili olarak üreticilerin önerilerine riayet edin.

Numune Hazırlama

Bu kit, laboratuvar ya da kurumsal kılavuzlara göre hazırlanmış olan, Carnoy çözeltisi (3:1 metanol/asetik asit) içinde sabitlenmiş, hematolojik olarak türetilmiş hücre süspansiyonlarında kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Havayla kurutulmuş numuneleri mikroskop lamaları üzerinde standart sitogenetik prosedürlere uygun şekilde hazırlayın. AGT *Sitogenetik Laboratuvar Kılavuzu* numune toplama, kültürleme, hasat ve lam yapımı için öneriler içermektedir⁸.

Çözelti Hazırlama

Etanol Çözeltileri

Takip eden oranları kullanarak %100 etanolü artırılmış su ile seyreltin ve iyice karıştırın:

- %70 Etanol-7 birim %100 etanol ve 3 birim artırılmış su
- %85 Etanol-8,5 birim %100 etanol ve 1,5 birim artırılmış su

Çözeltileri hava geçirmeyen bir kaptan, 6 ay boyunca, oda sıcaklığında muhafaza edin.

2xSSC Çözeltisi

1 birim 20xSSC Çözeltiyi 9 birim artırılmış suyla seyreltin ve iyice karıştırın. pH'ı kontrol edin ve NaOH ya da HCl kullanarak pH 7,0 olarak ayarlayın. Çözeltiyi oda sıcaklığında, hava geçirmez bir kaptan, 4 haftaya kadar muhafaza edin.

0,4xSSC Çözeltisi

1 birim 20xSSC Çözeltiyi 49 birim artırılmış suyla seyreltin ve iyice karıştırın. pH'ı kontrol edin ve NaOH ya da HCl kullanarak pH 7,0 olarak ayarlayın. Çözeltiyi oda sıcaklığında, hava geçirmez bir kaptan, 4 haftaya kadar muhafaza edin.

2xSSC, %0,05 Tween-20 Çözeltisi

1 birim 20xSSC Çözeltiyi 9 birim artırılmış suyla seyreltin. Her 10 ml başına 5 µl Tween-20 ekleyin ve iyice karıştırın. pH'ı kontrol edin ve NaOH ya da HCl kullanarak pH 7,0 olarak ayarlayın. Çözeltiyi oda sıcaklığında, hava geçirmez bir kaptan, 4 haftaya kadar muhafaza edin.

FAST FISH Protokolü – Bir (1) saatte hibridizasyon

(Not: Probu ve karşıt boyanın laboratuvar ışıklarına maruz kalmamasına her zaman dikkat edin).

Lam Hazırlama

- Hücre numunesini cam mikroskop lamı üzerine yerleştirin. Kurumaya izin verin. (Tercihe bağlı, sitogenetik kurutma kabini kullanılıyorsa: Optimal hücre numunesi damlatma için, kabin yaklaşık 25 °C'de ve %50 nemde işletilmelidir. Bir sitogenetik kurutma kabini mevcut değilse alternatif olarak bir davlumbaz kullanın).
- Lamı 2 dakika boyunca, oda sıcaklığında ve ajitasyon olmadan 2xSSC içine daldırın.
- Bir etanol serisinde (%70, %85 ve %100), 2 dakika boyunca, oda sıcaklığında dehidrasyon yapın.
- Kurumaya izin verin.

Ön Denatürasyon

- Probu dondurucudan çıkartın ve oda sıcaklığında ısınmasını sağlayın. Kullanmadan önce, tüpleri kısa süre santrifüj edin.
- Prob çözeltisinin bir pipetle karıştırıldığından ve çözeltinin eşit olarak dağıldığından emin olun.
- Test başına probdan 10 µl alın ve bir mikrosantrifüj tüpüne aktarın. Kalan probu vakit kaybetmeden dondurucuya geri koyun.
- 5 dakikalık ön ısıtma için, probu ve numune lamını 37 °C (+/- 1 °C) ısıtmalı tabla üzerine koyun.
- Prob karışımından 10 µl alıp hücre numunesi üzerine damlatın ve dikkatlice bir lamel uygulayın. Kauçuk çözelti yapıştırıcısıyla kapatın ve yapıştırıcının tamamen kurummasına izin verin.

Denatürasyon

- Lamı ısıtmalı tabla üzerinde 75 °C'de (+/- 1 °C), 2 dakika ısıtarak numuneyi ve probu eş zamanlı olarak denatüre edin.

Hibridizasyon

- Lamı nemli, ışık geçirmez bir kap içinde 37 °C'de (+/- 1 °C) bir (1) saat bekletin.

Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

- DAPI'yı dondurucudan çıkarın ve oda sıcaklığında ısınmasını sağlayın.
- Lameli ve yapıştırıcının tüm izlerini dikkatlice kaldırın.
- Lamı 2 dakika boyunca, 72 °C'de (+/- 1 °C) ve ajitasyon olmadan 0,4xSSC (pH 7,0) içine daldırın.
- Lamı kurutun ve 30 saniye boyunca, oda sıcaklığında (pH 7,0) ve ajitasyon olmadan 2xSSC, %0,05 Tween-20 içine daldırın.
- Lamı kurutun ve her bir numuneye 10 µl DAPI renk solması önleyici karışımı uygulayın.
- Bir lamel ile üstünü kapatın, baloncukları giderin ve 10 dakika boyunca karanlıkta bekleterek rengin belirginleşmesini sağlayın.
- Floresan mikroskop kullanarak izleyin (bakınız **Floresan Mikroskop Önerisi**).

Standart FISH Protokolü - Bir gecede hibridizasyon

(Not: Probu ve karşıt boyanın laboratuvar ışıklarına maruz kalmamasına her zaman dikkat edin).

Lam Hazırlama

1. Hücre numunesini cam mikroskop lamı üzerine yerleştirin. Kurumaya izin verin. (**Tercihle bağlı, sitogenetik kurutma kabini kullanılıyorsa**: Optimal hücre numunesi damlatma için, kabin yaklaşık 25 °C'de ve %50 nemde işletilmelidir. Bir sitogenetik kurutma kabini mevcut değilse alternatif olarak bir davlumbaz kullanın).
2. Lamı 2 dakika boyunca, oda sıcaklığında ve ajitasyon olmadan 2xSSC içine daldırın.
3. Bir etanol serisinde (%70, %85 ve %100), 2 dakika boyunca, oda sıcaklığında dehidrasyon yapın.
4. Kurumaya izin verin.

Ön Denatürasyon

5. Probu dondurucudan çıkartın ve oda sıcaklığında ısınmasını sağlayın. Kullanmadan önce, tüpleri kısa süre santrifüj edin.
6. Prob çözeltisinin bir pipette karıştırıldığından ve çözeltinin eşit olarak dağıldığından emin olun.
7. Test başına probdan 10 µl alın ve bir mikrosantrifüj tüpüne aktarın. Kalan probu vakit kaybetmeden dondurucuya geri koyun.
8. 5 dakikalık ön ısıtma için, probu ve numune lamını 37 °C (+/- 1°C) ısıtmalı tabla üzerine koyun.
9. Prob karışımından 10 µl alıp hücre numunesi üzerine damlatın ve dikkatlice bir lamel uygulayın. Kauçuk çözelti yapıştırıcısıyla kapatın ve yapıştırıcının tamamen kurummasına izin verin.

Denatürasyon

10. Lamı ısıtmalı tabla üzerinde 75 °C'de (+/- 1 °C), 2 dakika ısıtarak numuneyi ve probu eş zamanlı olarak denatüre edin.

Hibridizasyon

11. Lamı nemli, ışık geçirmez bir kap içinde, 37 °C'de (+/- 1 °C) bir gece bekletin.

Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

12. DAPI'yi dondurucudan çıkarın ve oda sıcaklığında ısınmasını sağlayın.
13. Lameli ve yapıştırıcının tüm izlerini dikkatlice kaldırın.
14. Lamı 2 dakika boyunca, 72 °C'de (+/- 1 °C) ve ajitasyon olmadan 0,4xSSC (pH 7,0) içine daldırın.
15. Lamı kurutun ve 30 saniye boyunca, oda sıcaklığında (pH 7,0) ve ajitasyon olmadan 2xSSC, %0,05 Tween-20 içine daldırın.
16. Lamı kurutun ve her bir numuneye 10 µl DAPI renk solması önleyici karışımı uygulayın.
17. Bir lamel ile üstünü kapatın, baloncukları giderin ve 10 dakika boyunca karanlıkta bekleterek rengin belirginleşmesini sağlayın.
18. Floresan mikroskop kullanarak izleyin (bakınız **Floresan Mikroskop Önerisi**).

Prosedürel Öneriler

1. Lamaların ısıtılması ya da yıpranması, sinyal floresanını düşürebilir.
2. Cytocell Ltd.'nin tedarik ettiği ya da önerdiği reaktifler haricinde reaktifler kullanmak, hibridizasyon koşullarını olumsuz etkileyebilir.
3. Bu sıcaklık optimum ürün performansı açısından kritik olduğu için, çözelti, su banyosu ve inkübatör sıcaklıklarını ölçmek için kalibre edilmiş bir termometre kullanın.
4. Düşük sertlik probun belirsiz bağlanmasıyla ve çok yüksek sertlik sinyal yokluğuyla sonuçlanabileceği için, yıkama konsantrasyonları, pH ve sıcaklıklar önemlidir.
5. Tamamlanmamış denatürasyon sinyal yokluğuna, aşırı denatürasyon ise belirsiz bağlanmaya neden olabilir.
6. Aşırı hibridizasyon ilave ya da beklenmeyen sinyallerin ortaya çıkmasıyla sonuçlanabilir.
7. Kullanıcılar, testi tanılama amaçlı olarak kullanmadan önce, protokolü kendi numunelerine göre optimize etmelidirler.
8. Optimal altı koşullar, belirsiz bağlanmanın yanlış şekilde prob sinyali olarak yorumlanmasına neden olabilir.

Sonuçların Yorumlanması

Lam Kalitesinin Değerlendirilmesi

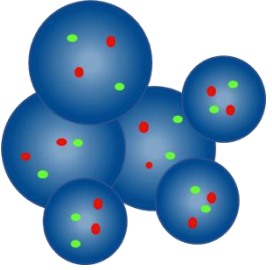
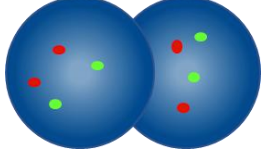
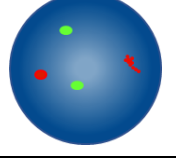
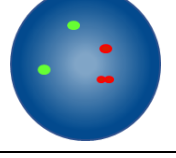
Aşağıdaki durumlarda lam analiz edilmemelidir:

- Sinyaller, tekli filtrelerle analiz yapmak için çok zayıfsa - analize devam etmek için, sinyaller parlak, ayırt edilebilir ve kolay değerlendirilebilir olmalıdır
- Analize engel olan, çok sayıda kümelenmiş/üst üste binmiş hücre varsa
- Hücrelerin >%50'si melezleştirilmemişse
- Hücreler arasında fazla floresan partikül ve/ya da sinyalleri bozan bir floresan bulanıklığı varsa - Optimal lamalarda arka plan koyu ya da siyah ve temiz görünmelidir
- Hücre çekirdekleri arasında sınırlar ayırt edilemiyorsa ve intact değilse

Analiz Kılavuzları

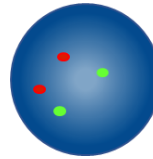
- Her numuneyi iki analist analiz etmeli ve yorumlamalıdır. Herhangi bir tutarsızlık üçüncü bir analist tarafından değerlendirilerek çözülmelidir
- Analistlerin hepsi geçerli ulusal standartların öngördüğü vasıflara sahip olmalıdır
- Her analist, her numune için bağımsız olarak 100 çekirdek almalıdır. Birinci analist lamın sol tarafından, ikinci analist lamın sağ tarafından analize başlamalıdır
- Her bir analist elde ettiği sonuçları ayrı tablolara kaydetmelidir
- Yalnızca intact çekirdekleri analiz edin. Üst üste binmiş, kümelenmiş ya da sitoplazmik kalıntılarla veya yüksek derece otofloresanla kaplı çekirdekleri analiz etmeyin

- Çok fazla sitoplazmik kalıntı ya da belirsiz hibridizasyon olan alanlardan kaçının
- Sinyal yoğunluğu, tek bir çekirdekte bile değişebilir. Bu durumlarda, tekli filtreler kullanın ve/ya da odak düzlemini ayarlayın
- Sinyaller optimal altı koşullarda difüze olarak görünebilir. Eğer aynı rengin iki sinyali birbirine değiyorsa ya da bu iki sinyalin arasındaki uzaklık iki sinyal genişliğinden daha büyük değilse veya bu iki sinyali birbirine bağlayan zayıf bir zincir varsa, bu iki sinyal tek olarak kabul edilir
- İki renkli ayırma probunu analiz ederken, aralarında 2 sinyal genişliğinden daha dar olan bir boşluk bulunan kırmızı ve yeşil sinyaller varsa bunlar yeniden düzenlenmemiş/kaynaştırılmamış sinyal olarak sayılırlar
- Üç renkli ayırma probunu analiz ederken, aralarında 2 sinyal genişliğinden daha dar olan bir boşluk bulunan 3 sinyal (kırmızı, yeşil, mavi) varsa bunlar yeniden düzenlenmemiş/kaynaştırılmamış sinyal olarak sayılırlar
- Hücrenin analiz edilebilir olup olmadığından emin değilseniz, analiz yapmayın

Analiz Kılavuzları	
	Saymayın - çekirdeklerin sınırları belirlenemeyecek kadar birbirine çok yakın
	Üst üste binmiş çekirdekleri saymayın - her iki çekirdeğin tüm alanları görünmez
	İki kırmızı sinyal ve iki yeşil sinyal olarak sayın - iki kırmızı sinyalden biri dağınıktır
	İki kırmızı sinyal ve iki yeşil sinyal olarak sayın - bir kırmızı sinyaldeki boşluk iki sinyal genişliğinden azdır

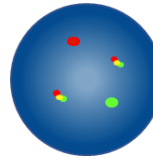
Beklenen Sonuçlar

Beklenen Normal Sinyal Örüntüsü



Normal bir hücrede, iki kırmızı ve iki yeşil sinyal (2K2Y) olması beklenir.

Beklenen Anormal Sinyal Örüntüsü



t(15;17)(q24.1;q21) translokasyonlu bir hücrede, bir kırmızı, bir yeşil ve iki füzyon (1K1Y2F) olması beklenir.

Anöploid/dengesiz numunelerde diğer sinyal örüntüleri mümkündür.

Bilinen İlgili Etkileşimler / Etkileşen Maddeler

Bilinen ilgili etkileşim / etkileşen madde yok.

Bilinen Çapraz Reaktivite

Bilinen çapraz reaktivite yok.

Olumsuz Durum Raporlama

Avrupa Birliği ve benzer düzenleyici rejimin (*in vitro* Tıbbi Tanılama Cihazları hakkında (EU) 2017/746 Yönetmeliği) olduğu ülkelerde bulunan hastalar/kullanıcılar/üçüncü taraflar için; bu cihazın kullanımı sırasında ya da sonucunda olumsuz bir durum meydana gelirse, lütfen bunu Üreticiye ve Yetkili Ulusal Makama rapor edin.

Diğer ülkelerdeki olumsuz durumlar için, lütfen bunu Üreticiye ve Yetkili Ulusal Makama rapor edin.

Üretici vijilans irtibatı: vigilance@ogt.com

AB Yetkili Ulusal Makamları için, vijilans temas noktalarının bir listesini şurada bulabilirsiniz:

https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

Spesifik Performans Özellikleri

Analitik Belirirlik

Analitik belirirlik, doğru lokusa melezleştirilmiş ve başka bir konuma melezleştirilmemiş sinyallerin yüzdesi olarak tanımlanır. Beş numunenin her birinde bulunan yirmi metafaz hücresinin her birinde dört kromozomal lokus analiz edildi ve 400 veri noktası elde edildi. Her melezleştirilmiş probun konumu haritalandı ve doğru lokusa melezleştirilmiş metafaz kromozomundaki FISH sinyallerinin sayısı kaydedildi.

Kit içerisindeki her probun analitik belirirliği, doğru lokusa melezleştirilmiş metafaz kromozomu FISH sinyallerinin toplam melezleştirilmiş metafaz kromozomu FISH sinyali sayısına bölünmesiyle hesaplandı, bulunan sonuç 100 ile çarpıldı, yüzde olarak ifade edildi ve %95 güven aralığında verildi.

Tablo 1. FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe için Analitik Belirirlik

Hedef	Melezleştirilmiş metafaz kromozomlarının sayısı	Doğru melezleştirilmiş lokus sayısı	Analitik Belirirlik	%95 Güven Aralığı
15q24.1	200	200	%100	%98,12-%100
17q21.1-17q21.2	200	200	%100	%98,12-%100

Analitik Hassasiyet

Analitik hassasiyet, beklenen normal sinyal örüntüsü olan, skorlanabilir interfaz hücrelerinin yüzdesidir. Hızlı hibridizasyon yöntemi kullanılarak, kemik iliğinden 25 sabitlenmiş hücre süspansiyonu ve periferik kandan 25 sabitlenmiş hücre süspansiyonu ve bir gecede hibridizasyon yöntemi kullanılarak kemik iliğinden 25 sabitlenmiş hücre süspansiyonunun her biri için en az 100 interfaz hücresi analiz edildi. Bunun sonucunda periferik kan numuneleri için minimum 2500 puanlanan çekirdek ve kemik iliği numuneleri için 5000 puanlanan çekirdek elde edildi. Hassasiyet verileri, beklenen normal bir sinyal düzenini gösteren hücrelerin yüzdesine dayanarak analiz edildi ve %95 güven aralığında bir yüzde olarak ifade edildi.

Tablo 2. FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe için Analitik Hassasiyet

Örnek Tipi	Hassasiyet Kriterleri	Hassasiyet Sonucu
Kemik iliği-Hızlı hibridizasyon	>%95	%98,80 (%97,96-99,63)
Kemik iliği-Bir gecede hibridizasyon	>%95	%98,52 (%97,76-99,28)
Periferik Kan- Hızlı hibridizasyon	>%95	%99,31 (%98,66-100,00)

Normal Kesim Değerleri Karakterizasyonu

Normal eşik değeri, bir bireyin normal olarak kabul edilebileceği ve klinik bir tanı ile tutarlı olmadığı yanlış bir pozitif sinyal örüntüsü gösteren hücrelerin yüzdesi olarak tanımlanır. Hızlı hibridizasyon yöntemi kullanılarak, kemik iliğinden 25 sabitlenmiş hücre süspansiyonu ve periferik kandan 25 sabitlenmiş hücre süspansiyonu ve bir gecede hibridizasyon yöntemi kullanılarak kemik iliğinden 25 sabitlenmiş hücre süspansiyonunun her biri için en az 100 interfaz hücresi analiz edildi. Bunun sonucunda periferik kan numuneleri için minimum 2500 puanlanan çekirdek ve kemik iliği numuneleri için 5000 puanlanan çekirdek elde edildi.

Eşik değeri, MS Excel'deki β-ters (BETAINV) fonksiyonu kullanılarak belirlendi. Normal bir hasta numunesindeki binom dağılımının tek taraflı %95 güven aralığının bir üst sınırını kullanarak yanlış pozitif sinyal örüntüsü gösteren interfaz hücrelerinin yüzdesi olarak hesaplandı.

Tablo 3. FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe için Normal Eşik Değerleri Karakterizasyonu

Örnek Tipi	Eşik Sonuçları
Kemik iliği - Hızlı hibridizasyon	%2,71
Kemik iliği - Bir gecede hibridizasyon	%3,44
Periferik Kan - Hızlı hibridizasyon	%4,36

Laboratuvarlar eşik değerlerini kendi verilerini kullanarak teyit etmelidir^{9,10}.

Kesinlik

Bu ürünün kesinliği gün içi kesinlik (numuneden numuneye), günler arası kesinlik (günden güne) ve tek bölgeyi lotlar arası kesinlik (lottan lota) cinsinden ölçülmüştür.

Bu ürünün kesinliğini değerlendirmek için hibridizasyon yöntemi başına iki numune kullanıldı: bir negatif kemik iliği ve bir düşük pozitif ilik. Düşük pozitif kemik iliği numunesi (ürünün eşik değerinin 2-4 katı), normal kemik iliği numunesine bilinen

bir pozitif kemik iliği numunesi eklenerek oluşturuldu ve belirlenen eşik değeri civarında ürüne yükleme yapmak için kullanıldı.

Gün içi ve günler arası kesinliği belirlemek için numuneler, ardışık olmayacak şekilde belirlenmiş on farklı tarih boyunca değerlendirildi ve lottan lota kesinliği belirlemek için, aynı numunelerin üç kopyası üzerinde üç ürün lotu değerlendirildi. Sonuçlar, öngörülen negatif sınıfla olan genel uyum olarak sunulmuştur (negatif numuneler için).

Tablo 4. FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe için Yeniden Üretilirlik ve Kesinlik

Değişken	Numune tipi	Uyum
Gün içi (numuneden numuneye) ve günler arası (günden güne) yeniden üretilebilirlik	Kemik iliği Negatif	%100
	Kemik iliği Düşük Pozitif	%100
Lottan lota yeniden üretilebilirlik	Kemik iliği Negatif	%100
	Kemik iliği Düşük Pozitif	%100

Klinik Performans

Ürünün, amaçlanan yeniden düzenlemeleri tespit etmesini sağlamak amacıyla, ürün için amaçlanan popülasyonun temsili numuneleri üzerinde yapılan bir çalışmada klinik performans sağlandı: kalıntı metanol/asetik asit sabitlenmiş hematolojik olarak türetilmiş materyal. Numune boyutu, 43 pozitif örnek ve 93 negatif örnekten oluşan bir popülasyon ile 136 örnek olmuştur. Sonuçlar, bir karşılaştırmalı yöntemle tanımlandığı üzere numunenin bilinen durumuyla karşılaştırıldı. Sonuçların uyumu/uyumsuzluğunun, bu çalışma için kabul edilebilirlik kriterini sağladığı bulundu.

Bu testlerin sonuçları, tek boyutlu bir yaklaşım kullanarak pozitif sinyaller için klinik hassasiyet, klinik belirirlik ve yanlış pozitif oran (FPR) değerleri sağlamak amacıyla analiz edildi.

Tablo 5. FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe için Klinik Performans

Değişken	Sonuç
Klinik Hassasiyet (gerçek pozitif oran, TPR)	%98,93
Klinik Belirirlik (gerçek negatif oran, TNR)	%99,58
Yanlış Pozitif oran (FPR) = 1 – Belirirlik	%0,42

Güvenlilik ve Performans Kısa Özeti (SSP)

SSP, Temel UDI-DI'ye bağlı olduğu tıbbi cihazlar hakkında Avrupa veritabanı

(Eudamed) yoluyla halka açık olacaktır.

Eudamed URL'si: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Temel UDI-DI: 50558449LPH064JR

Eudamed tam olarak çalışmıyorsa, SSP@ogt.com adresine e-posta göndererek talep edilmedi üzerine SSP halka açık olacaktır.

Ek Bilgi

Ürüne ilgili daha fazla bilgi almak için, CytoCell Teknik Destek Bölümü ile iletişime geçin.

Tel: +44 (0)1223 294048

E-posta: techsupport@cytozell.com

Web sitesi: www.ogt.com

Referanslar

1. Swerdlow, vd (editörler). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
2. Campbell, vd. Biomed Research International. 2013;2013:1-5.
3. Creutzig, vd. Blood. 2012;120(16):3187-3205.
4. Zhang, vd. Blood Reviews. 2015;29(2):101-125.
5. Tomita, vd. International Journal of Haematology. 2013;97(6):717-725.
6. Grimwade, vd. Blood. 2000;96(4):1297-1308.
7. Lo-Coco, Hasa. Best practice & research. Clinical haematology. 2014;27(1):3-9.
8. Arsham, MS., Barch, MJ. Ve Lawce HJ. (editörler). (2017) The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
9. Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, vd. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. Genet Med. 2011;13(7):667-675.
10. Wiktor AE, vd. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16-23.

Semboller Sözlüğü

EN ISO 15223-1:2021 - "Tıbbi cihazlar - Üretici tarafından sağlanacak bilgilerde kullanılacak semboller - Bölüm 1: Genel gereklilikler"
(© International Organization for Standardization)

Sembol	Başlık	Referans Numarası/Numaraları
	tr: Üretici	5.1.1
	tr: Avrupa Topluluğu'nda/Avrupa Birliği'nde yetkili temsilci	5.1.2
	tr: Son kullanım tarihi	5.1.4
	tr: Parti kodu	5.1.5
	tr: Katalog numarası	5.1.6
	tr: Güneş ışığından koruyun	5.3.2
	tr: Sıcaklık sınırı	5.3.7
	tr: Kullanım talimatlarına bakın	5.4.3
 ogt.com/IFU	tr: Elektronik kullanım talimatlarına bakın	5.4.3
	tr: Dikkat	5.4.4
	tr: <i>In vitro</i> tıbbi tanılama cihazı	5.5.1
	tr: <n> test için yeterlidir	5.5.5
	tr: Benzersiz Cihaz Tanımlayıcısı	5.7.10
IVD reaktifleri ve bileşenleri için EDMA sembolleri, Ekim 2009 revizyonu		
Sembol	Başlık	Referans Numarası/Numaraları
	tr: İçindekiler (veya içerikler)	Uygulanamaz

Patentler ve Markalar

CytoCell, CytoCell Limited'in tescilli ticari markasıdır.



CytoCell Limited
Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
BİRLEŞİK KRALLIK

Tel: +44 (0)1223 294048
F: +44 (0)1223 294986
E-posta: probes@cytoCell.com
Web sitesi: www.ogt.com



Sysmex Europe SE
Bornbarch 1
22848 Norderstedt
ALMANYA

Tel: +49 40 527260
Web sitesi: www.sysmex-europe.com

IFU Sürüm Geçmişi

V001.00 2023-01-25: (EU) 2017/746 Yönetmeliği için yeni IFU
V002 2025-08-29: UKCA işaretinin kaldırılması