



A Sysmex Group Company



Kullanım Talimatları

REF: LPH 067-S / LPH 067

CLL PROFILER Kiti



YALNIZCA PROFESYONEL KULLANIM İÇİNDİR



www.cytozell.com

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

Sınırlamalar

Bu cihaz, P53 (TP53), ATM ve D13S319 bölgelerini veya bu prob setindeki mavi klonun kapsadığı bölgeden daha büyük kazanımları içeren bu settaki kırmızı ve yeşil klonların kapsadığı bölgeden daha büyük genomik kayıpları tespit etmek için tasarlanmış olup, 12 centromere kromozomu içerir. Bu bölge dışındaki genomik kazançlar/kayıplar veya bu bölgenin kısmi kazançları/kayıpları bu ürünle saptanamaz.

Bu test şunlar için kullanılmaz: bağımsız tanılama, prenatal test, popülasyon bazlı tarama, hasta başında test ya da kendi kendine test. Bu ürün yalnızca laboratuvar uzmanları tarafından kullanılması için üretilmiştir; tüm sonuçlar, diğer ilgili test sonuçları da göz önünde bulundurularak gerekli vasıflara sahip personel tarafından yorumlanmalıdır.

Bu ürün, kullanım amacının dışında kalan numune tipleri ya da hastalık türlerinde kullanılması için valide edilmemiştir.

FISH sonuçlarının raporlaması ve yorumlanması, profesyonel uygulama standartlarıyla tutarlı olmalıdır ve diğer klinik ve tanılama bilgilerini de göz önünde bulundurmalıdır. Bu set, tanılama amaçlı diğer laboratuvar testlerine yardımcı olması için kullanılmaktadır. Yalnızca FISH sonuçlarına dayanarak tedavi başlatılmamalıdır.

Protokole bağlı kalınmaması performansı etkileyebilir ve yanlış pozitif/negatif sonuçlara neden olabilir.

Bu set, belirlenen kullanım amacının dışındaki amaçlarla kullanılması için valide edilmemiştir.

Kullanım Amacı

CytoCell CLL PROFILER Kiti, kronik lenfositik lösemili (KLL) hastalardan alınan hematolojik olarak türetilmiş hücre süspansiyonlarıyla sabitlenmiş Carnoy çözeltilisinde (3:1 metanol/asetik asit) bulunan kromozom 11 üzerindeki 11q22.3, kromozom 17 üzerindeki 17p13.1 bölgesindeki veya kromozom 13 üzerindeki 13q14.2-q14.3'te bulunan kromozomal silmeleri ve/veya kromozom 12 üzerindeki sentromerik bölgenin kazançlarını tespit etmek için yerinde hibridizasyon (FISH) testinde kullanılan kalitatif, otomatik olmayan bir floresandır.

Endikasyonlar

Bu ürün, onaylanmış tanısal ve klinik bakım yollarında, P53 (TP53), ATM silme veya D13S319 silme durumu bilgisinin ve/veya kromozom 12 sentromer kazanımının klinik yönetim için önemli olacağı, diğer klinik ve histopatolojik testlere ek olarak tasarlanmıştır.

Test Prensipleri

Floresan *in situ* hibridizasyonu (FISH), DNA dizilimlerinin metafaz kromozomlar üzerinde ya da sabit sitogenetik numunelerden alınan arafaz çekirdeklere 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 tavlınmaya hazır hale gelir. Melezlemeyi takiben, bağımsız ve belirsiz bağlı DNA probu kaldırılır ve DNA vizüalizasyonu için karşı boyayla boyanır. Floresan mikroskop böylece hedef materyal üzerindeki melezlenmiş probun görüntülenmesini yapabilir.

Prob Bilgisi

CytoCell CLL PROFILER Kiti, kronik lenfositik lösemili (KLL) hastalardan alınan periferik kan veya kemik iliği örneklerinde TP53, ATM ve D13S319 silmelerinin ve kromozom 12 sentromer sekanslarının kazanımlarının saptanması için tasarlanmıştır.

P53(TP53)/ATM Probe Combination

17p13.1'deki TP53 (*tümör proteini p53*) geni, en önemli tümör baskılayıcı genlerden biridir. Genetik stabilitenin sürdürülmesinde temel rol alan güçlü bir transkripsiyon faktörü görevi de görür. KLL'li hastaların %10'unda TP53 kaybı bildirilmiştir ve bu hastalıkta en kötü prognostik işaretleyici olarak kabul edilir^{1,2}.

11q22.3'teki ATM (*ATM serin/treonin kinaz*) geni hücre hasarı yönetimine dahil olan önemli bir kontrol noktası genidir. İşlevi, hücredeki DNA hasarı seviyesini ölçmek ve DNA hasarı yanıt yoluna dahil edilen fosforlu anahtar substratlarla onarmaya çalışmaktır³. KLL'li hastaların %18'inde bildirilen ATM kaybı bu hastalıkta zayıf prognostik işaretleyicisi olarak kabul edilir⁴.

KLL'deki ATM/TP53 etkileşiminin analizi, TP53 ve ATM'nin lenf kanserinin proliferasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermiştir³. ATM'nin, hasarın hücrenin apoptozis (TP53'ün aracılık ettiği) tarafından imha edilmesini gerektirecek kadar büyük olması durumunda TP53 fosforilasyonunu artırdığı gösterilmiştir. ATM'nin silinmesi, bu kontrol noktası etkinliğini ve böylece TP53'ün etkinleştirilmesini ortadan kaldırır. Bu nedenle, TP53 varlığına rağmen hasarlı hücrelerin onarımı veya apoptozisi yapılmaya çalışılmamıştır. ATM yokluğunda hasarlı hücrelerin proliferasyona devam etmesine izin verilir⁵.

D13S319/13qter/12cen Silme/Numaralandırma

13q14'ü etkileyen silmeler ayrıca kronik lenfositik lösemi (KLL)^{6,7,8}de en sık görülen yapısal genetik sapmalardır. Bu bölgenin %30-60'ında heterozigot olarak silindiği ve KLL'li hastaların %10-20'sinde homozigot olarak silindiği bulunmuştur⁹. Hayatta kalma oranının iki grup için benzer olduğu gösterilmiştir¹⁰. 13q14 silmeleri olan hastalar, diğer herhangi bir genetik lezyonun yokluğunda, çok düşük riskli olarak sınıflandırılır¹.

İki protein kodlamayan RNA geni, DLEU1 (*lenfositik lösemi 1'de silindi*) ve DLEU2 (*lenfositik lösemi 2'de silindi*) artı genetik işaretleyici D13S319, 13q14¹¹'in patojenik kritik bölgesini kapsar. DLEU1, 13q14 bölgesindeki en olası KLL ile ilişkili aday tümör baskılayıcı gen olarak kabul edilir¹². Trizomi 12, KLL'de tekrarlayan bir anormalliktir¹³, vakalarının %20'sinde görülür ve sıklıkla benzersiz sitogenetik aberasyon (trizomi 12'li vakaların %40-60'¹⁷ olarak görülür. Diğer herhangi bir genetik lezyonun yokluğunda, trizomi 12 düşük riskli olarak sınıflandırılır¹.

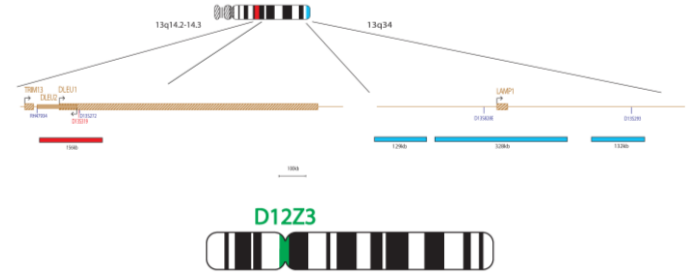
Prob Spesifikasyonu

D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe

D13S319, 13q14.2, Kırmızı

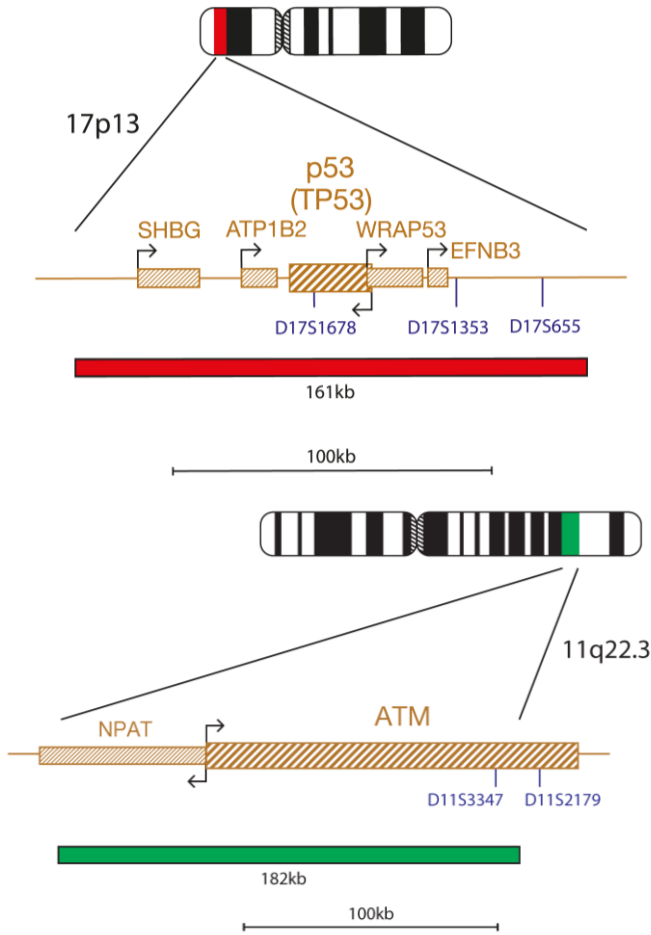
13qter, 13q34, Mavi

D12Z3, 12p11.1-q11.1, Yeşil



Kromozom 12 Alpha Satellite Probe, sentromerik tekrar sekansı D12Z3'ü tanıyan yeşil renkle etiketlenmiş bir tekrar sekansı probudur. D13S319 probu, kırmızı olarak etiketlenmiş, DLEU1 geninin tamamını ve DLEU2 geninin çoğunluğunu ve D13S319, D13S272 ve RH47934 işaretçilerini içeren 156kb'lik bir bölgeyi kapsar. Mavi renkle etiketlenmiş 13qter subtelomer spesifik prob, 13 kromozomunun tanımlanmasına olanak sağlar ve kontrol probu olarak işlev görür.

P53 (TP53)/ATM
P53, 17p13.1, Kırmızı
ATM, 11q22.3, Yeşil



P53 bileşeni, tüm P53 (TP53) genini ve yan bölgeleri içine alan kırmızı renkte etiketlenmiş bir 161kb probdan oluşur. ATM bileşeni, NPAT geninin telomerik ucunu ve D11S3347 işaretleyicisinin ötesinde ATM geninin santromerik ucunu kapsayan yeşil renkte etiketli bir 182kb probdan oluşur.

Tedarik Edilen Materyaller

D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe:
Viyal başına 50µl (5 test) ya da viyal başına 100µl (10 test)

P53 (TP53) /ATM Probe:

Viyal başına 50µl (5 test) ya da viyal başına 100µl (10 test)

Problar, hibridizasyon çözeltisine (formamit; dekstran sülfat; salin-sodyum sitrat (SSS)) karıştırılmış olarak tedarik edilir ve kullanıma hazırdır.

Karşıit Boya: Viyal başına 150µl (15 test)

Karşıit boya, DAPI renk solması karşıtı karışımdır (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

Uyarılar ve Tedbirler

1. Yalnızca *in vitro* tanılama amaçlıdır. Yalnızca profesyonel kullanım içindir.
2. DNA problemlerini ve DAPI karşıit boyasını kullanırken eldiven giyin.
3. Prob karışımları bir teratojen olan formamit içermektedir; buharı solumayın ya da cildinize temas ettirmeyin. Kullanırken özen gösterin; eldiven ve laboratuvar önlüğü giyin.
4. DAPI'nın kanserojen potansiyeli vardır. Kullanırken özen gösterin; eldiven ve laboratuvar önlüğü giyin.
5. Tüm tehlikeli malzemeleri, kurumuzun tehlikeli atık boşaltımı kılavuzuna göre boşaltın.
6. Operatörler, kırmızı, mavi ve yeşil renkleri ayırt edebiliyor olmalıdır.
7. Belirtilen protokol ve reaktiflere bağlı kalınmaması, performansı etkileyebilir ve yanlış pozitif/negatif sonuçlara neden olabilir.
8. Bir prob diğer problemlerle seyreltilmemelidir ya da karıştırılmamalıdır.
9. Protokolün ön denatürasyon aşaması sırasında 10µl prob kullanılmaması performansı etkileyebilir ve yanlış pozitif/negatif sonuçlara neden olabilir.

Muhafaza ve Kullanım

Kiti, setin etiketinde belirtilen son kullanma tarihine kadar -25°C ile -15°C arasında bir dondurucuda muhafaza edilmelidir. Prob ve karşıit boya şişeleri karanlık bir ortamda muhafaza edilmelidir.



Prob, normal kullanım sırasında deneyimlenen donma-çözülme çevrimleri sırasında istikrarlı kalır (bir çevrim, probun dondurucudan alınması ve tekrar dondurucuya koyulmasından oluşur) ve sürekli ışığa maruz bırakılmasının ardından 48 saate kadar fotostabilir. Işığa ve sıcaklık değişimlerine maruz kalınmasının önüne geçmek için her türlü çaba sarf edilmelidir.

Gerekli Olan Fakat Tedarik Edilmemiş Teçhizat ve Malzemeler

Kalibre edilmiş teçhizat kullanılmalıdır:

1. Isıtılmalı tabla (sert bir tabla ve 80°C'ye kadar doğru sıcaklık kontrolü)
2. Kalibre edilmiş değişken hacimli mikropipet ve uç aralığı 1µl - 200µl
3. Doğru sıcaklık kontrolünde (37°C ve 72°C) su banyosu
4. Mikrosantrifüj tüpler (0.5ml)
5. Floresan mikroskop (Lütfen Floresan Mikroskop Önerisi bölümüne bakınız)
6. Faz kontrast mikroskobu
7. Temiz plastik, seramik ya da ısıya dayanıklı cam Coplin kavanozlar
8. Forseps
9. Kalibre edilmiş pH ölçüm cihazı (ya da pH 6.5 - 8.0 ölçebilen pH indikatör şeritler)
10. Nemli kap
11. Floresan dereceli mikroskop lensi immersiyon yağı
12. Tezgah üstü santrifüj
13. Mikroskop lamaları
14. 24x24 lamel
15. Zamanlayıcı
16. 37°C inkübatör
17. Kauçuk çözelti yapıstırıcısı
18. Vorteks mikser
19. Dereceli silindirler
20. Manyetik karıştırıcı
21. Kalibre edilmiş termometre

Tedarik Edilmeyen Tercihe Bağlı Teçhizat

1. Sitogenetik kurutma kabini

Gerekli Olan Fakat Tedarik Edilmeyen Reaktifler

1. 20x salin-sodyum sitrat (SSS) Çözeltisi
2. %100 Etanol
3. Tween-20
4. 1M Sodyum Hidroksit (NaOH)
5. 1M Hidroklorik asit (HCl)
6. Arıtılmış su

Floresan Mikroskop Önerisi

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

| Flofor | Eksitasyon _{maks} [nm] | Emisyon _{maks} [nm] |
|---------|---------------------------------|------------------------------|
| Mavi | 418 | 467 |
| Yeşil | 495 | 521 |
| Kırmızı | 596 | 615 |

Yukarıda listelenen ses dalgalarını kapsayan eksitasyon ve emisyon filtrelerinin mikroskoba uyduğundan emin olun. Yeşil ve kırmızı floroforların optimal eş zamanlı vizüalizasyonu için, üçlü DAPI/yeşil spektrum/kırmızı spektrum bant geçirci filtre ya da ikili yeşil/kırmızı spektrum bant geçirci filtre kullanın. Aqua spektrumun optimum şekilde görüntülenmesi için tek bant geçirimli bir su spektrum filtresi veya yeşil, kırmızı ve aqua floroforların eş zamanlı görüntülenmesi için üçlü kırmızı spektrum/yeşil spektrum/aqua spektrum bant geçirci 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 karışımlı 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) fiksatifinde sabitlenmiş, periferik kan hücreleri veya kemik iliği hücrelerinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Havaıyla kurutulmuş numuneleri mikroskop lamaları üzerinde standart sitogenetik prosedürlere uygun şekilde hazırlayın. AGT *Sitogenetik Laboratuvar Kılavuzu*, numune toplama, kültürlenme, hasat ve lam yapımı için öneriler içermektedir¹⁴.

Çözelti Hazırlama

Etanol Çözeltileri

Takip eden oranları ve karışımları kullanarak %100 etanolü arıtılmış su ile seyreltin:

- %70 Etanol - 7 birim %100 etanol ve 3 birim arıtılmış su
- %85 Etanol - 8.5 birim %100 etanol ve 1.5 birim arıtılmış su

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

2xSSS Çözeltisi

1 birim 20xSSS Çözeltiyi 9 birim artılmış 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 kapta, 4 haftaya kadar muhafaza edin.

0.4xSSS Çözeltisi

1 birim 20xSSS Çözeltiyi 49 birim artılmış 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 kapta, 4 haftaya kadar muhafaza edin.

2xSSS, %0.05 Tween-20 Çözeltisi

1 birim 20xSSS Çözeltiyi 9 birim artılmış suyla seyreltin. Her 10 ml başına 5µl 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 kapta, 4 haftaya kadar muhafaza edin.

FISH Protokolü

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

Lam Hazırlama

- Hücre numunesini cam mikroskop lam üzerine yerleştirin. Kurumaya izin verin. **(Sitogenetik bir kurutma kabini kullanıyorsanız tercihe bağlıdır:** lam üzerine damlatma sitogenetik kurutma kabini içinde yapılmalıdır. 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 2xSSS 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 probtan 10µl 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 10µl alıp hücre numunesi üzerine damlatın ve dikkatlice bir lamel uygulayın. Kauçuk çözelti yapıştırıcısıyla kapatın ve yapıştırıcının tamamen kurumasına izin verin.

Denatürasyon

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

Melezleştirme

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

Mezleme 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 0.4xSSS (pH 7.0) içine daldırın.
- Lamı kurutun ve 30 saniye boyunca, oda sıcaklığında (pH 7.0) 2xSSS, %0.05 Tween-20 içine daldırın.
- Lamı kurutun ve her bir numuneye 10µl 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 izleme yapın (bkz. **Floresan Mikroskop Önerisi**).

Kullanılmış Lamaların Stabilitesi

Eğer karanlık ve oda sıcaklığında ya da oda sıcaklığının altında bir ortamda muhafaza edilirse, kullanılmış lamalarla 1 aya kadar yeniden analiz yapılabilir.

Prosedürel Öneriler

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

Sonuçların Yorumlanması

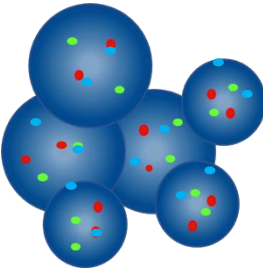
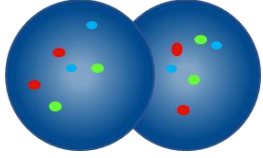
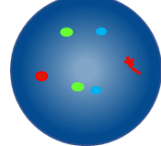
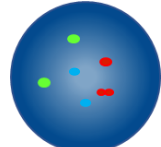
Lam Kalitesinin Değerlendirilmesi

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 lamlarda arka plan koyu ya da siyah ve temiz görünmelidir
- Hücre çekirdekleri arasında sınırlar ayırt edilemiyorsa ve intakt değilse

Analiz Kılavuzları

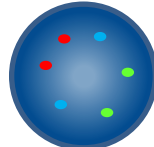
- Her numuneyi iki analist analiz etmeli ve yorumlamalıdır. Herhangi bir tutarsızlık üçüncü bir analist tarafından değerlendirilerek çözümlenmelidir
- Analistlerin hepsi geçerli ulusal standartların öngördüğü vasıflara sahip olmalıdır
- Her analist, her numune için bağımsız olarak 100 çekirdek almalıdır. Birinci analist lamin sol tarafından, ikinci analist lamin sağ tarafından analize başlamalıdır
- Her bir analist elde ettiği sonuçları ayrı tablolara kaydetmelidir
- Yalnızca intakt 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 kaçın
- Sinyal yoğunluğu, tek bir çekirdekte bile değişebilir. Bu durumlarda, tekli filtreler kullanın ve/ya da odak düzlemini ayarlayın
- Optimal altı koşullarda difüze olarak görünebilir. Eğer aynı rengin iki sinyali birbirine değişirse 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
- Hücrenin analiz edilebilir olup olmadığından emin değilseniz, analiz yapmayın

| Analiz Kılavuzları | |
|--|---|
|  | Saymayın - çekirdeklerin sınırları belirlenemeyecek kadar birbirine çok yakın |
|  | Örtüşen çekirdekleri saymayın - her iki çekirdeğin tüm alanları görünmez |
|  | İki kırmızı, iki mavi ve iki yeşil sinyal olarak sayılır - iki kırmızı sinyalden biri difüzdür |
|  | İki kırmızı, iki mavi ve iki yeşil sinyal olarak sayılır - bir kırmızı sinyaldeki boşluk iki sinyal genişliğinden azdır |

Beklenen Sonuçlar

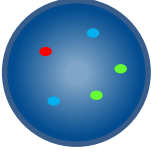
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe

Beklenen Normal Sinyal Örüntüsü

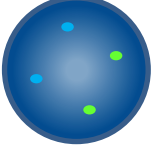


Normal bir hücrede, iki kırmızı, iki mavi ve iki yeşil sinyal (2K, 2M, 2Y) beklenir.

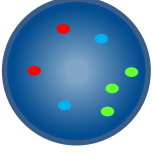
Beklenen Anormal Sinyal Örüntüleri



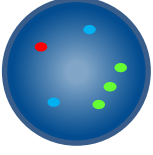
D13S319 lokusunun hemizigos silinmesi olan bir hücrede, beklenen sinyal modeli bir kırmızı, iki mavi ve 2 yeşil sinyal (1K, 2M, 2Y) olacaktır.



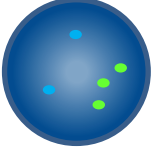
D13S319 homozigos silinmesi olan bir hücrede, beklenen sinyal modeli sıfır kırmızı, iki mavi ve iki yeşil sinyal (0K, 2M, 2Y) olacaktır.



Trizomi 12 ve normal D13S319 durumundaki bir hücrede, beklenen sinyal modeli iki kırmızı, iki mavi ve üç yeşil sinyal (2K, 2M, 3Y) olacaktır.



Trizomi 12 ve hemizigos D13S319 silinmesi olan bir hücrede, beklenen sinyal modeli bir kırmızı, iki mavi ve üç yeşil sinyal (1K, 2M, 3Y) olacaktır.

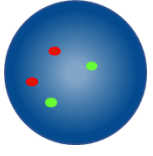


Trizomi 12 ve homozigos D13S319 silinmesi olan bir hücrede, beklenen sinyal modeli sıfır kırmızı, iki mavi ve üç yeşil sinyal (0K, 2M, 3Y) olacaktır.

Anöploid/dengesiz numunelerde diğer sinyal örüntüleri mümkündür.

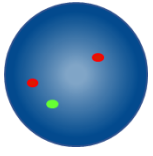
P53/ATM Probe

Beklenen Normal Sinyal Örüntüsü

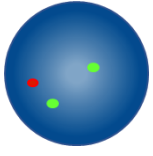


Normal bir hücrede, iki kırmızı ve iki yeşil sinyal (2K, 2Y) olması beklenir.

Beklenen Anormal Sinyal Örüntüleri



ATM silinmesi olan bir hücrede, beklenen sinyal modeli iki kırmızı ve bir yeşil olur (2K, 1Y).



P53 silinmesi olan bir hücrede beklenen sinyal modeli bir kırmızı ve iki yeşil sinyal olur (1K, 2Y).

Anöploid/dengesiz numunelerde diğer sinyal örüntüleri mümkündür.

Bilinen Çapraz Reaktivite

Yeşil D12Z3 probu 3c, 6c, 7c ve 10c'ye çapraz hibridizasyon gösterebilir.

Olumsuz Durum Raporlaması

Eğer bu cihazın işlevini yeterli şekilde yerine getirmediğini ya da performansının olumsuz durumları (örn. gecikmiş ya da yanlış teşhis, gecikmiş ya da yanlış tedavi) daha da ağırlaştıracak şekilde kötüleştiğini düşünüyorsanız bunu hemen üreticiye bildirin (**e-posta**: vigilance@ogt.com).

Eğer mümkünse durumu yetkili ulusal makama da bildirmelisiniz. Vjilans temas noktalarının bir listesini <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/> şurada bulabilirsiniz.

Spesifik Performans Özellikleri

Analitik Spesifite

Analitik spesifite, yalnızca doğru lokusa hibritleşen sinyallerin yüzdesidir. Analitik spesifite, toplam 200 hedef lokusun analiziyle tespit edildi. Analitik spesifite, doğru lokusa hibridize olan FISH sinyalleri sayısının, toplam hibridize FISH sinyallerine bölünmesiyle hesaplandı.

Tablo 1. CLL PROFILER Kit için Analitik Belirlilik

| Kit | Prob | Hedef Lokus | Doğru Lokusa Hibridize Olan Sinyallerin Sayısı | Hibridize Sinyallerin Toplam Sayısı | Spesifite (%) |
|--|-----------------|---------------|--|-------------------------------------|---------------|
| D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe | Kırmızı D13S319 | 13q14.2 | 200 | 200 | 100 |
| | Mavi 13qter | 13q34 | 200 | 200 | 100 |
| | Yeşil D12Z3 | 12p11.1-q11.1 | 200 | 200 | 100 |
| P53/ATM Probe | Kırmızı P53 | 17p13 | 200 | 200 | 100 |
| | Yeşil ATM | 11q22.3 | 200 | 200 | 100 |

Analitik Sensitivite

Analitik sensitivite, beklenen normal sinyal örüntüsü olan, skorlanabilir arafaz hücrelerinin yüzdesidir. Analitik sensitivite, farklı normal numuneler üzerinden arafaz hücreler analiz edilerek belirlenmiştir. Sensitivite, beklenen sinyal örüntüsüne sahip, skorlanabilir hücrelerin yüzdesi olarak hesaplanmıştır (%95 güven aralığı).

Tablo 2. CLL PROFILER Kiti için Analitik Hassasiyet

| Kit | Beklenen Sinyal Örüntülü Hücrelerin Sayısı | Skorlanabilir Sinyalli Hücrelerin Sayısı | Sensitivite (%) | %95 Güven Aralığı |
|--|--|--|-----------------|-------------------|
| D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe | 467 | 500 | 93,4 | 2,6 |
| P53/ATM Probe | 479 | 500 | 95,8 | 1,7 |

Normal Kesim Değerleri Karakterizasyonu

FISH problemleriyle birlikte normal kesim değeri, bir numunenin bu sinyal örüntüsünün normal kabul edileceği spesifik anormal sinyal örüntülü, skorlanabilir arafaz hücresi maksimum yüzdesidir.

Normal kesim değeri, normal ve pozitif hastalardan alınan numuneler kullanılarak belirlendi. Her numune için, 100 hücrenin sinyal örüntüleri kaydedildi. Youden indeksi, Sensitivite + Spesifite-1'in maksimize olduğu eşik değeri bulmak için hesaplandı.

Tablo 3. CLL PROFILER Kiti için Normal Kesim Değerlerinin Karakterizasyonu

| Kit | Yeniden Düzenleme | Anormal sinyal örüntüsü | Youden İndeksi | Normal Kesim (%) |
|--|-------------------------|-------------------------|----------------|------------------|
| D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe | D13S319 hemizigos silme | 1K, 2M, 2Y | 0,96 | 6 |
| | Trizomi 12 | 2K, 2M, 3Y | 0,99 | 4 |
| P53/ATM Probe | P53 silme | 1K, 2Y | 0,99 | 8 |
| | ATM silme | 2K, 1Y | 0,99 | 8 |

Laboratuvarlar kesim değerlerini kendi verilerini kullanarak teyit ederler^{15,16}.

Kesinlik ve Yeniden Üretilirlik

Kesinlik, aynı koşullar altında, birkaç kez tekrar edilen bir testin doğal varyasyonunun ölçümüdür. Bu, aynı numune üzerinde, aynı koşullarda ve aynı gün test edilen probun aynı lot numarasının tekrarları analiz edilerek değerlendirildi.

Yeniden üretilebilirlik, bir testin değişebilirliğinin ölçülmesidir. Numuneden numuneye, günden güne ve partiden partiye değişebilirlik testleriyle belirlenir. Günden güne yeniden üretilebilirlik, aynı numunelerin farklı üç günde analiz edilmesiyle değerlendirildi. Partiden partiye yeniden üretilebilirlik, aynı numunelerin bir gün içinde üç farklı lot kullanılarak analiz edilmesiyle değerlendirildi. Numuneden numuneye yeniden üretilebilirlik, bir numunenin üç tekrarının bir gün içinde analiz edilmesiyle değerlendirildi. Her bir numune için, 100 arafaz hücrenin sinyal örüntüleri kaydedildi. Beklenen sinyal örüntülü hücrelerin yüzdesi de hesaplandı.

Yeniden üretilebilirlik ve kesinlik, her değişken ve genel ortalama açısından, tekrarlar arasındaki Standart Sapma (STDEV) olarak hesaplandı.

Tablo 4. CLL PROFILER Kiti için Yeniden Üretilirlik ve Kesinlik

| Değişken | Standart Sapma (STDEV) | |
|--------------------|--|---------------|
| | D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe | P53/ATM Probe |
| Kesinlik | 1,28 | 1,37 |
| Numuneden numuneye | 1,30 | 1,60 |
| Günden güne | 4,12 | 2,27 |
| Partiden partiye | 2,04 | 1,77 |
| Genel Sapma | 3,30 | 1,98 |

Klinik Performans

Klinik performans, ürünün hedef popülasyonunun temsili numunesiyle tespit edildi. Her numune için, ≥ 100 arafaz hücrelerinin sinyal örüntüleri kaydedildi. Normal/anormal determinasyonu, spesifik anormal sinyal örüntülü hücrelerin yüzdesinin normal kesim değeriyle karşılaştırılması vasıtasıyla belirlendi. Sonuçlar daha sonra numunenin bilinen durumuyla karşılaştırıldı.

Klinik verilerin sonuçları, sensitivite, spesifite ve kesim değerleri üretmek için tek boyutlu bir yaklaşım kullanılarak analiz edildi.

Tablo 5. CLL PROFILER Kitin Klinik Performansı

| Yeniden Düzenleme | Klinik Sensitivite (gerçek pozitif oran, TPR) | Klinik Spesifite (gerçek negatif oran, TNR) | Yanlış Pozitif oran (FPR) = 1 - Spesifite |
|--|---|---|---|
| D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe | | | |
| D13S319 Silme | %96,6 | %99,5 | %0,5 |
| Trizomi 12 | %100 | %100,0 | %0 |
| P53/ATM Probe | | | |
| P53 silme | %100 | %100 | %0 |
| ATM silme | %100 | %100 | %0 |

Ek Bilgiler

Ürünle 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

- Rossi D, et al., Blood. 2013 Feb 21;121(8):1403-12
- Baliakas P, et al., Leukemia. 2014;(April):1-8
- Stankovic et al., Blood 2004;103(1):291-300
- Dohner et al., N Eng J Med 2000;343:1910-1916
- Khanna et al., Nature Genetics 1998;20(4):398-400
- Juliusson G et al., N Eng J Med 1990;323:720-4
- Puiggros et al., Biomed Res Int 2014;1-13
- Kasar et al., Nature Communications 2015;6:1-12
- Hammarsund M et al., FEBS Letters 2004;556:75-80
- Van Dyke DL et al., Br J Haematology 2009;148:544-50
- Liu Y et al., Oncogene 1997;15:2463-73
- Wolf S et al., Hum Mol Genet 2001;10:1275-85
- Swerdlow et al., (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
- Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. Genet Med. 2011;13(7):667-675.
- Wiktor AE, Dyke DLV, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16-23.

Sembol Kılavuzu

| | |
|------|---|
| REF | tr: Katalog numarası |
| IVD | tr: <i>In vitro</i> tıbbi tanılama cihazı |
| LOT | tr: Parti kodu |
| | tr: Kullanım talimatlarına bakın |
| | tr: Üretici |
| | tr: Son kullanım tarihi |
| | tr: Sıcaklık sınırı |
| | tr: Güneş ışığından koruyun |
| | tr: <n> testleri için yeterlidir |
| CONT | tr: İçindekiler |

Patentler ve Markalar

CytoCell, Cytozell Ltd.'nin tescilli ticari markasıdır.

Cytozell Ltd.

Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, UK
Tel: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E-posta: probes@cytozell.com
Web sitesi: www.ogt.com