



A Sysmex Group Company



Οδηγίες χρήσης

ΚΩΔ. ΑΝΑΦ.: LPH 013-S / LPH 013

MLL (KMT2A) Breakapart Probe



ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΓΙΑ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ



www.cytocell.com

Μπορείτε να βρείτε περαιτέρω πληροφορίες και άλλες γλώσσες στον ιστότοπο www.ogt.com

Περιορισμοί

Το προϊόν αυτό έχει σχεδιαστεί για να ανιχνεύει αναδιατάξεις με σημεία διάσπασης στην περιοχή που δεσμεύει τους κόκκινους και πράσινους κλώνους σε αυτό το σετ ιχνηθετών, η οποία περιλαμβάνει το γονίδιο *MLL (KMT2A)*. Σημεία διάσπασης που βρίσκονται εκτός της εν λόγω περιοχής ή παραλλαγές αναδιατάξεων που περιέχονται εξ ολοκλήρου σε αυτή την περιοχή μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμα με αυτό το προϊόν.

Η εξέταση δεν προορίζεται για: χρήση ως μεμονωμένος διαγνωστικός προγεννητικός έλεγχος, προσυμπτωματικό έλεγχο βάσει πληθυσμού, εξέταση κοντά στον ασθενή ή αυτοεξέταση. Το προϊόν αυτό προορίζεται μόνο για επαγγελματική χρήση εντός του εργαστηρίου. Όλα τα αποτελέσματα πρέπει να ερμηνεύονται από κατάλληλα εξειδικευμένο προσωπικό λαμβανομένων υπόψη άλλων σχετικών αποτελεσμάτων εξετάσεων.

Το προϊόν αυτό δεν έχει επικυρωθεί για χρήση σε τύπους δειγμάτων ή τύπους ασθενειών πέραν εκείνων που καθορίζονται στην προβλεπόμενη χρήση.

Κατά την αναφορά και ερμηνεία των αποτελεσμάτων FISH, θα πρέπει να τηρούνται τα επαγγελματικά πρότυπα πρακτικής και να λαμβάνονται υπόψη άλλες κλινικές και διαγνωστικές πληροφορίες. Αυτό το kit προορίζεται για χρήση ως συμπλήρωμα σε άλλες διαγνωστικές εργαστηριακές εξετάσεις και δεν θα πρέπει να ξεκινάει καμία θεραπευτική ενέργεια μόνο βάσει του αποτελέσματος FISH.

Η μη τήρηση του πρωτοκόλλου ενδέχεται να επηρεάσει την απόδοση και να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά/αρνητικά αποτελέσματα.

Αυτό το kit δεν έχει επικυρωθεί για άλλους σκοπούς πέραν της καθορισμένης προβλεπόμενης χρήσης.

Προβλεπόμενη χρήση

Το CytoCell MLL (KMT2A) Breakapart Probe είναι μια ποιοτική, μη αυτοματοποιημένη, εξέταση φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH) που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση χρωμοσωμικών αναδιατάξεων στην περιοχή 11q23.3 του χρωμοσώματος 11 σε μονιμοποιημένα σε διάλυμα Carnoy (μεθανόλη/οξικό οξύ 3:1) κυτταρικά εναιωρήματα αιματολογικής προέλευσης από ασθενείς με επιβεβαιωμένη ή πιθανολογούμενη οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ) ή οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ).

Ενδείξεις

Το προϊόν αυτόν είναι σχεδιασμένο ως συμπληρωματικό σε άλλες κλινικές και ιστοπαθολογικές εξετάσεις σε αναγνωρισμένα μονοπάτια διάγνωσης και κλινικής φροντίδας, όπου η γνώση της ύπαρξης της αναδιατάξης του *MLL (KMT2A)* θα ήταν σημαντική για την κλινική αντιμετώπιση.

Αρχές της εξέτασης

Ο φθορίζων *in situ* υβριδισμός (FISH) είναι μια τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση αλληλουχιών DNA σε μεταφασικά χρωμοσώματα ή σε μεσοφασικούς πυρήνες από μονιμοποιημένα κυτταρογενετικά δείγματα. Η τεχνική χρησιμοποιεί ιχνηθέτες DNA που υβριδοποιούνται σε ολόκληρα χρωμοσώματα ή μεμονωμένες μοναδικές αλληλουχίες και χρησιμεύει ως ένα σημαντικό συμπλήρωμα στην κυτταρογενετική ανάλυση με G-ζώνωση. Αυτή η τεχνική μπορεί πλέον να εφαρμοστεί ως ένα σημαντικό ερευνητικό εργαλείο στα πλαίσια προγεννητικών και αιματολογικών αναλύσεων, καθώς και χρωμοσωμικών αναλύσεων συμπαγών όγκων. Μετά τη μονιμοποίηση και τη μετουσίωση, το DNA-στόχος είναι διαθέσιμο για αναδιάταξη σε έναν παρόμοιο μετουσιωμένο, φθορίζοντα σημασμένο ιχνηθέτη DNA, ο οποίος

έχει συμπληρωματική αλληλουχία. Μετά τον υβριδισμό, γίνεται αφαίρεση του μη δεσμευμένου και μη ειδικά δεσμευμένου ιχνηθέτη DNA και το DNA υπερβάλλεται σε αντίχρωση για απεικόνιση. Στη συνέχεια, η μικροσκοπία φθορισμού καθιστά δυνατή την απεικόνιση του υβριδοποιημένου ιχνηθέτη στο υλικό-στόχο.

Πληροφορίες για τον ιχνηθέτη

Το γονίδιο *KMT2A (lysine methyltransferase 2A)* στην περιοχή 11q23.3 αναδιατάσσεται συχνά σε οξείες λευχαιμίες, ιδιαίτερα στη νεογνική λευχαιμία και τη δευτεροπαθή λευχαιμία, μετά από θεραπεία με αναστολείς της τοποϊσομεράσης II του DNA¹.

Το γονίδιο *KMT2A* έχει υψηλή ομολογία με το γονίδιο *trithorax* της Δροσόφιλας και κωδικοποιεί μια μεθυλτρανσφεράση ιστονών, η οποία λειτουργεί ως επιγενετικός ρυθμιστής της μεταγραφής. Οι μεταθέσεις του *KMT2A* προκαλούν την παραγωγή μιας χιμαιρικής πρωτεΐνης στην οποία το αμινοτελικό τμήμα του *KMT2A* εκφράζεται σε σύντηξη με το καρβοξυτελικό τμήμα της άλλης πρωτεΐνης του ζεύγους σύντηξης. Η λειτουργική πρωτεΐνη έχει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη και την αιμοποίηση του εμβρύου^{1,2,3,4}.

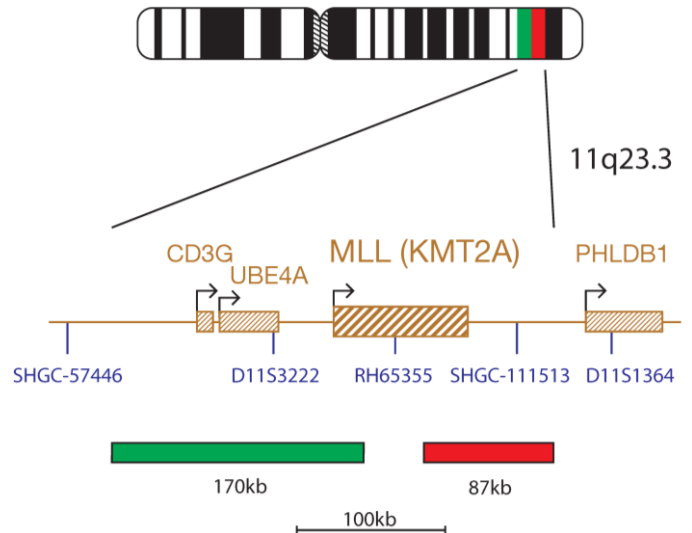
Οι αναδιατάξεις του *KMT2A* μπορούν να ανιχνευτούν στο περίπου 80% νεογνών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) και σε 5-10% παιδιατρικών και ενήλικων μορφών ΟΛΛ^{3,4}. Μπορούν επίσης να εντοπιστούν στο 60% των νεογνικών οξείων μυελογενών λευχαιμιών (ΟΜΛ) και στο 3% των *de novo* και το 10% των σχετιζόμενων με τη θεραπεία περιπτώσεων ΟΜΛ ενηλίκων^{3,5}. Έως σήμερα, έχουν εντοπιστεί περισσότερα από 70 γονίδια να συμμετέχουν μαζί με το *MLL* στη μετάθεση, με τις πλέον συχνές μεταθέσεις να είναι οι: *MLL-AFF1 t (4;11) (q21;q23.3)*, *MLL-MLL4 t(6;11)(q27;q23.3)*, *MLL-MLL3 t (9;11) (p22;q23.3)* και *MLL-MLL1 t(11;19)(q23.3;p13.3)*¹.

Ιστορικά, οι αναδιατάξεις του *KMT2A* στην οξεία λευχαιμία συσχετιζόταν με δυσμενέστερη έκβαση, αλλά πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η πρόγνωση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το δεύτερο γονίδιο της σύντηξης και αυτό μπορεί να διαφέρει μεταξύ παιδιών και ενηλίκων¹.

Προδιαγραφές ιχνηθετών

MLL, 11q23.3, Κόκκινος

MLL, 11q23.3, Πράσινος



Το προϊόν *MLL* αποτελείται από έναν ιχνηθέτη 87kb, σημασμένο κόκκινο, που καλύπτει μια περιοχή τελομερικά του γονιδίου *MLL (KMT2A)*, που περιλαμβάνει τον δείκτη *SHGC-111513*, και έναν πράσινο ιχνηθέτη που καλύπτει μια περιοχή 170kb κεντρομερικά του γονιδίου *MLL*, που καλύπτει τα γονίδια *CD3G* και *UBE4A*.

Παρεχόμενα υλικά

Ιχνηθέτης: 50 ml ανά φιαλίδιο (5 εξετάσεις) ή 100 ml ανά φιαλίδιο (10 εξετάσεις)
Οι ιχνηθέτες παρέχονται προαναμιγμένοι σε διάλυμα υβριδισμού (φορμαμίδο, θειική δεξτράνη, αλατούχο διάλυμα-κιτρικό νάτριο (SSC)) και είναι έτοιμοι προς χρήση.

Αντίχρωση: 150 ml ανά φιαλίδιο (15 εξετάσεις)

Η αντίχρωση είναι DAPI antifade (ES: 0,125 μg/ml DAPI (4,6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη)).

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

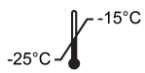
1. Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Αποκλειστικά για επαγγελματική χρήση.
2. Να φοράτε γάντια κατά τον χειρισμό ιχνηθετών DNA και αντίχρωσης DAPI.
3. Τα μίγματα των ιχνηθετών περιέχουν φορμαμίδιο, το οποίο είναι τερατογόνο. Μην αναπνεύετε αναθυμιάσεις και αποφύγετε την επαφή με το δέρμα. Απαιτείται προσεκτικός χειρισμός. Να φοράτε γάντια και εργαστηριακή ποδιά. Το DAPI είναι δυνητικά καρκινογόνο. Απαιτείται προσεκτικός χειρισμός. Να φοράτε γάντια και εργαστηριακή ποδιά.
4. Απορρίψτε όλα τα επικίνδυνα υλικά σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του ιδρύματός σας για την απόρριψη επικινδύνων αποβλήτων.
5. Οι χειριστές πρέπει να έχουν την ικανότητα να διακρίνουν το κόκκινο, το μπλε και το πράσινο χρώμα.
6. Η μη τήρηση του περιγραφόμενου πρωτοκόλλου των αντιδραστηρίων ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση και να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά/αρνητικά αποτελέσματα.

DS083/CE-el v011.00/2020-12-01 (H036 v6)

Σελίδα 1 από 4

- Ο ιχνηθέτης δεν θα πρέπει να αραιώνεται ή να αναμιγνύεται με άλλους ιχνηθέτες.
- Η μη χρήση 10μl ιχνηθέτη στο στάδιο του πρωτοκόλλου πριν από τη μετουσίωση ενδέχεται να επηρεάσει την απόδοση και να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά/αρνητικά αποτελέσματα.

Αποθήκευση και χειρισμός



Το kit θα πρέπει να αποθηκεύεται σε θερμοκρασία από -25 °C έως και -15 °C σε καταψύκτη μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του kit. Τα φιαλίδια ιχνηθετών και αντίχρωσης πρέπει να αποθηκεύονται σε σκοτεινό χώρο.



Ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός καθ' όλη τη διάρκεια των κύκλων ψύξης/απόψυξης που πραγματοποιούνται στο πλαίσιο της φυσιολογικής χρήσης (ένας κύκλος αντιστοιχεί στην αφαίρεση του ιχνηθέτη από τον καταψύκτη και την εκ νέου τοποθέτησή του σε αυτόν) και είναι φωτοσταθερός για έως και 48 ώρες μετά την έκθεσή του σε συνθήκες συνεχούς φωτισμού. Πρέπει να καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια ώστε η έκθεση σε μεταβαλλόμενες συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας να περιορίζεται στο ελάχιστο.

Εξοπλισμός και υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Πρέπει να χρησιμοποιείται βαθμονομημένος εξοπλισμός:

- Θερμή πλάκα (με στερεή πλάκα και διάταξη ακριβούς ελέγχου θερμοκρασίας έως και 80 °C)
- Βαθμονομημένες μικροπιπέτες μεταβλητού όγκου και ρύγχη, από 1 μl έως 200 μl
- Υδατόλουτρο με διάταξη ακριβούς ελέγχου θερμοκρασίας στους 37 °C και στους 72 °C
- Σωλήνες μικροφυγοκέντρισης (0,5 ml)
- Μικροσκόπιο φθορισμού (ανατρέξτε στην ενότητα «Σύσταση για το μικροσκόπιο φθορισμού»)
- Μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων
- Καθαρά πλαστικά, κεραμικά ή θερμοανθεκτικά γυάλινα δοχεία Corlin
- Λαβίδα
- Βαθμονομημένο πεχάμετρο (ή πεχαμετρικές ταινίες με δυνατότητα μέτρησης τιμών pH 6,5 – 8,0)
- Περιέκτης υγρασίας
- Φακός μικροσκοπίου φθορισμού καταδυτικός σε λάδι
- Φυγόκεντρος πάγκου εργασίας
- Αντικειμενοφόρα μικροσκοπίου
- Καλυπτρίδες 24 x 24 mm
- Χρονόμετρο
- Επωστήρας 37 °C
- Κόλλα με διάλυμα ελαστικού
- Μίκτης περιδίνησης
- Διαβαθμισμένοι κύλινδροι
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Βαθμονομημένο θερμόμετρο

Προαιρετικός εξοπλισμός που δεν παρέχεται

- Κυτταρογενετικός θάλαμος ξήρανσης

Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

- Διάλυμα αλατούχου διαλύματος-κιτρικού νατρίου (SSC) 20x
- Αιθανόλη 100%
- Tween-20
- Υδροξείδιο του νατρίου 1M (NaOH)
- Υδροχλωρικό οξύ 1M (HCl)
- Απιονισμένο νερό

Σύσταση για το μικροσκόπιο φθορισμού

Χρησιμοποιείτε λάμπα υδραργύρου 100 watt ή ισοδύναμη και επίπεδους αποχρωματικούς αντικειμενικούς φακούς καταδυτικούς σε λάδι με μεγέθυνση 60/63x ή 100x για βέλτιστη απεικόνιση. Οι φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιούνται σε αυτό το σετ ιχνηθετών θα διεγερθούν και θα εκπέμψουν στα ακόλουθα μήκη κύματος:

Φθοροφόρο	Διέγερση _{μ.μ.} [nm]	Εκπομπή _{μ.μ.} [nm]
Πράσινο	495	521
Κόκκινο	596	615

Βεβαιωθείτε ότι στο μικροσκόπιο έχουν τοποθετηθεί τα κατάλληλα φίλτρα διέγερσης και εκπομπής, τα οποία καλύπτουν τα μήκη κύματος που αναφέρονται παραπάνω. Χρησιμοποιήστε φίλτρο διέλευσης τριπλής ζώνης DAPI/πράσινου φάσματος/κόκκινου φάσματος ή φίλτρο διέλευσης διπλής ζώνης πράσινου φάσματος/κόκκινου φάσματος για βέλτιστη ταυτόχρονη απεικόνιση των πράσινων και κόκκινων φθορίζοντων ουσιών.

Ελέγξτε το μικροσκόπιο φθορισμού πριν από τη χρήση για να διασφαλίσετε ότι λειτουργεί σωστά. Χρησιμοποιήστε λάδι κατάδυσης που ενδείκνυται για μικροσκοπία φθορισμού και έχει παρασκευαστεί για χαμηλό αυτοφθορισμό. Αποφύγετε την ανάμιξη του DAPI antifade με λάδι κατάδυσης μικροσκοπίου, δόσι κάτι τέτοιο θα καλύψει τα σήματα. Τηρήστε τις συστάσεις του κατασκευαστή όσον αφορά τη διάρκεια ζωής της λάμπας και την ηλικία των φίλτρων.

Προετοιμασία δειγμάτων

Το kit έχει σχεδιαστεί για χρήση σε κυτταρικά εναιωρήματα αιματολογικής προέλευσης που έχουν μονομοιωθεί σε διάλυμα Carnoy (μεθανόλη/οξικό οξύ 3:1) και έχουν προετοιμαστεί σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του εργαστηρίου ή του ιδρύματος. Προετοιμάστε δείγματα που έχουν υποστεί ξήρανση με αέρα σε

αντικειμενοφόρους μικροσκοπίου σύμφωνα με τις τυπικές κυτταρογενετικές διαδικασίες. Το εγχειρίδιο AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* περιέχει συστάσεις για τη συλλογή, καλλιέργεια και μεταφορά δειγμάτων, καθώς και για την προετοιμασία των αντικειμενοφόρων πλακών⁶.

Προετοιμασία διαλυμάτων

Διαλύματα αιθανόλης

Αραιώστε αιθανόλη 100% με απιονισμένο νερό με βάση τις ακόλουθες αναλογίες και αναμίξτε καλά.

- Αιθανόλη 70% - 7 μέρη αιθανόλης 100% σε 3 μέρη απιονισμένου νερού
 - Αιθανόλη 85% - 8,5 μέρη αιθανόλης 100% σε 1,5 μέρη απιονισμένου νερού
- Αποθηκεύστε τα διαλύματα για έως και 6 μήνες σε θερμοκρασία δωματίου σε αεροστεγή περιέκτη.

Διάλυμα 2xSSC

Αραιώστε 1 μέρος διαλύματος 20xSSC με 9 μέρη απιονισμένου νερού και αναμίξτε καλά. Ελέγξτε την τιμή pH και ρυθμίστε σε pH 7,0 χρησιμοποιώντας NaOH ή HCl κατά περίπτωση. Αποθηκεύστε το διάλυμα για έως και 4 εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου σε αεροστεγή περιέκτη.

Διάλυμα 0,4xSSC

Αραιώστε 1 μέρος διαλύματος 20xSSC με 49 μέρη απιονισμένου νερού και αναμίξτε καλά. Ελέγξτε την τιμή pH και ρυθμίστε σε pH 7,0 χρησιμοποιώντας NaOH ή HCl κατά περίπτωση. Αποθηκεύστε το διάλυμα για έως και 4 εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου σε αεροστεγή περιέκτη.

2xSSC, Διάλυμα Tween-20, 05%

Αραιώστε 1 μέρος διαλύματος 20xSSC με 9 μέρη απιονισμένου νερού. Προσθέστε 5 μl Tween-20 ανά 10 ml και αναμίξτε καλά. Ελέγξτε την τιμή pH και ρυθμίστε σε pH 7,0 χρησιμοποιώντας NaOH ή HCl, κατά περίπτωση. Αποθηκεύστε το διάλυμα για έως και 4 εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου σε αεροστεγή περιέκτη.

Πρωτόκολλο FISH

(Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι η έκθεση του ιχνηθέτη και της αντίχρωσης στα φώτα του εργαστηρίου είναι πάντα περιορισμένη).

Προετοιμασία αντικειμενοφόρου

- Τοποθετήστε μια κηλίδα από το κυτταρικό δείγμα σε μια γυάλινη αντικειμενοφόρο μικροσκοπίου. Αφήστε τη να στεγνώσει. (**Προαιρετικά, εάν χρησιμοποιείτε κυτταρογενετικό θάλαμο ξήρανσης:** η τοποθέτηση του δείγματος στις αντικειμενοφόρους θα πρέπει να γίνεται με τη χρήση κυτταρογενετικού θαλάμου ξήρανσης. Ο θάλαμος πρέπει να λειτουργεί σε θερμοκρασία περίπου 25 °C και υγρασία 50% για τη βέλτιστη λήψη κυτταρικού δείγματος. Εάν δεν υπάρχει διαθέσιμος κυτταρογενετικός θάλαμος ξήρανσης χρησιμοποιήστε έναν απαγωγό ως εναλλακτική).
- Βυθίστε την αντικειμενοφόρο σε διάλυμα 2xSSC για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς ανακίνηση.
- Αφυδατώστε σε διαφορετικά ποσοστά αιθανόλης (70%, 85% και 100%), διαδοχικά, το καθένα για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφήστε τη να στεγνώσει.

Πριν από τη μετουσίωση

- Αφαιρέστε τον ιχνηθέτη από τον καταψύκτη και αφήστε τον να θερμανθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Εκτελέστε σύντομη φυγοκέντριση πριν από τη χρήση.
- Βεβαιωθείτε ότι το διάλυμα ιχνηθέτη έχει αναμιχθεί ομοιόμορφα με τη χρήση πιπέτας.
- Αφαιρέστε 10 μl ιχνηθέτη για κάθε εξέταση και μεταφέρετέ τα σε έναν σωλήνα μικροφυγοκέντρισης. Τοποθετήστε γρήγορα ξανά τον υπόλοιπο ιχνηθέτη στον καταψύκτη.
- Τοποθετήστε τον ιχνηθέτη και την αντικειμενοφόρο δείγματος σε μια θερμή πλάκα με θερμοκρασία 37 °C (+/- 1 °C) για 5 λεπτά για προθέρμανση.
- Τοποθετήστε 10 μl μίγματος ιχνηθέτη στο κυτταρικό μίγμα και εφαρμόστε μια καλυπτρίδα προσεκτικά. Σφραγίστε με κόλλα με διάλυμα ελαστικού και αφήστε τη να στεγνώσει εντελώς.

Μετουσίωση

- Μετουσίωση το δείγμα και τον ιχνηθέτη ταυτόχρονα θερμαίνοντας την αντικειμενοφόρο σε μια θερμή πλάκα στους 75 °C (+/- 1 °C) για 2 λεπτά.

Υβριδισμός

- Τοποθετήστε την αντικειμενοφόρο σε έναν υγρό, φωτοσκληρό περιέκτη σε θερμοκρασία 37 °C (+/- 1 °C) για μια ολόκληρη νύχτα.

Πλύσεις μετά τον υβριδισμό

- Αφαιρέστε το DAPI από τον καταψύκτη και αφήστε το να θερμανθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαιρέστε την καλυπτρίδα και όλα τα υπολείμματα κόλλας προσεκτικά.
- Βυθίστε την αντικειμενοφόρο σε διάλυμα 0,4xSSC (pH 7,0) σε θερμοκρασία 72 °C (+/- 1 °C) για 2 λεπτά χωρίς ανακίνηση.
- Αποστραγγίστε την αντικειμενοφόρο και βυθίστε τη σε διάλυμα 2xSSC, 0,05% Tween-20 σε θερμοκρασία δωματίου (pH 7,0) για 30 δευτερόλεπτα χωρίς ανακίνηση.
- Αποστραγγίστε την αντικειμενοφόρο και τοποθετήστε 10 μl DAPI antifade σε κάθε δείγμα.
- Καλύψτε τη με μια καλυπτρίδα, αφαιρέστε τυχόν φυσαλίδες και περιμένετε 10 λεπτά μέχρι να αναπυχθεί το χρώμα στο σκοτάδι.
- Παρατηρήστε σε μικροσκόπιο φθορισμού (ανατρέξτε στην ενότητα **Σύσταση για το μικροσκόπιο φθορισμού**).

Σταθερότητα έτοιμων αντικειμενοφόρων πλακών

Οι έτοιμες αντικειμενοφόροι μπορούν να αναλυθούν έως και 1 μήνα μετά εάν αποθηκευτούν σε σκοτεινό χώρο σε θερμοκρασία δωματίου ή χαμηλότερη.

Συστάσεις για τη διαδικασία

1. Η θέρμανση ή ωρίμανση των αντικειμενοφόρων μπορεί να μειώσει τον φθορισμό των σημάτων
2. Οι συνθήκες υβριδισμού μπορεί να επηρεαστούν δυσμενώς από τη χρήση αντιδραστηρίων πέραν εκείνων που παρέχονται ή συστήνονται από τη Cytocell Ltd
3. Χρησιμοποιήστε ένα βαθμονομημένο θερμόμετρο για τη μέτρηση θερμοκρασιών διαλυμάτων, υδατόλουτρων και επωαστήρων, καθώς οι εν λόγω θερμοκρασίες είναι κρίσιμης σημασίας για τη βέλτιστη απόδοση του προϊόντος.
4. Οι συγκεντρώσεις, οι τιμές pH και οι θερμοκρασίες πλύσης είναι σημαντικές καθώς οι συνθήκες χαμηλής αυστηρότητας μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα μη ειδική δέσμευση του ιχνηθέτη ενώ οι συνθήκες υπερβολικά υψηλής αυστηρότητας μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την έλλειψη σήματος
5. Η ατελής μετουσίωση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια σήματος και η υπερβολική μετουσίωση μπορεί επίσης να έχει ως αποτέλεσμα τη μη ειδική δέσμευση
6. Ο υπερβολικός υβριδισμός μπορεί να οδηγήσει σε πρόσθετα ή μη αναμενόμενα σήματα
7. Οι χρήστες θα πρέπει να βελτιστοποιούν το πρωτόκολλο για τα δείγματά τους πριν από τη χρήση της εξέτασης για διαγνωστικούς σκοπούς
8. Τυχόν υποβέλτιστες συνθήκες μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα μη ειδική δέσμευση, η οποία μπορεί να παρερμηνευτεί ως σήμα ιχνηθέτη

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Εκτίμηση ποιότητας αντικειμενοφόρων πλακών

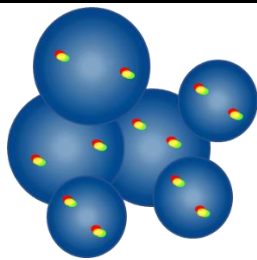
Η αντικειμενοφόρος δεν θα πρέπει να αναλύεται εάν:

- Τα σήματα είναι πολύ ασθενή για να πραγματοποιηθεί ανάλυση σε μεμονωμένα φίλτρα. Για να προχωρήσετε με την ανάλυση, τα σήματα θα πρέπει να είναι φωτεινά, διακριτά και εύκολα αξιολογήσιμα
- Υπάρχει μεγάλος αριθμός συσταδοποιημένων/αλληλοεπικαλυπτόμενων κυττάρων που εμποδίζουν την ανάλυση
- >50% των κυττάρων δεν έχουν υβριδοποιηθεί
- Υπάρχει περίσσεια φθορίζοντων σωματιδίων μεταξύ των κυττάρων ή/και φθορίζουσα αχλή που προκαλεί παρεμβολές στα σήματα. Ιδανικά, το υπόβαθρο των αντικειμενοφόρων θα πρέπει να φαίνεται σκοτεινό ή μαύρο και καθαρό
- Τα όρια του κυτταρικού πυρήνα δεν είναι διακριτά και δεν είναι άθικτα

Κατευθυντήριες οδηγίες για την ανάλυση

- Κάθε δείγμα θα πρέπει να αναλύεται και να ερμηνεύεται από δύο αναλυτές. Τυχόν ασυμφωνίες θα πρέπει να επιλύονται μέσω εκτίμησης από τρίτο αναλυτή
- Κάθε αναλυτής θα πρέπει να είναι κατάλληλα εξειδικευμένος σύμφωνα με τα αναγνωρισμένα εθνικά πρότυπα
- Κάθε αναλυτής θα πρέπει να βαθμολογεί μεμονωμένα 100 πυρήνες για κάθε δείγμα. Ο πρώτος αναλυτής θα πρέπει να ξεκινά την ανάλυση από την αριστερή πλευρά της αντικειμενοφόρου και ο δεύτερος αναλυτής από τη δεξιά πλευρά
- Κάθε αναλυτής θα πρέπει να τεκμηριώνει τα αποτελέσματά του σε χωριστά έντυπα
- Αναλύετε μόνο άθικτους πυρήνες και όχι επικαλυπτόμενους ή συσσωρευμένους πυρήνες ή πυρήνες που καλύπτονται από κυτταροπλασματικά υπολείμματα ή υψηλό επίπεδο αυτοφθορισμού
- Αποφύγετε περιοχές με περίσσεια κυτταροπλασματικών υπολειμμάτων ή μη ειδικό υβριδισμό
- Η ένταση των σημάτων μπορεί να ποικίλλει, ακόμα και στην περίπτωση ενός μόνο πυρήνα. Σε τέτοιες περιπτώσεις, να χρησιμοποιείτε μονά φίλτρα ή/και να ρυθμίζετε το εστιακό επίπεδο
- Σε υποβέλτιστες συνθήκες, τα σήματα μπορεί να φαίνονται διάχυτα. Εάν δύο σήματα του ίδιου χρώματος βρίσκονται σε επαφή μεταξύ τους, ή η απόσταση μεταξύ τους δεν είναι μεγαλύτερη από δύο πλάτη σήματος, ή συνδέονται με ένα αχνό νήμα, μετρήστε τα ως ένα σήμα
- Κατά την ανάλυση δίχρωμων ιχνηθετών διάσπασης, εάν υπάρχει διάστημα μεταξύ του κόκκινου και του πράσινου σήματος που δεν υπερβαίνει τα πλάτη 2 σημάτων, προσμετρήσατε ως σήμα που δεν αντιστοιχεί σε αναδιάταξη/σύντηξη
- Εάν έχετε αμφιβολίες για το εάν ένα κύτταρο μπορεί να αναλυθεί ή όχι, μην προχωρήσετε στην ανάλυσή του

Κατευθυντήριες οδηγίες για την ανάλυση

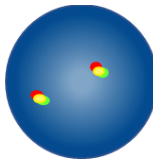


Μην προσμετράτε - οι πυρήνες είναι υπερβολικά κοντά ο ένας στον άλλον για τον καθορισμό ορίων

	Μην προσμετράτε αλληλοκαλυπτόμενους πυρήνες - δεν είναι ορατή ολόκληρη η έκταση και των δύο πυρήνων
	Προσμετρήσατε ως δύο υβριδικά σήματα - το διάστημα μεταξύ του κόκκινου και του πράσινου σήματος είναι μικρότερο από τα πλάτη δύο σημάτων
	Προσμετρήσατε ως δύο υβριδικά σήματα - το ένα υβριδικό σήμα είναι διάχυτο

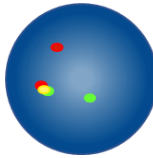
Αναμενόμενα αποτελέσματα

Αναμενόμενο φυσιολογικό πρότυπο σημάτων



Σε ένα φυσιολογικό κύτταρο, αναμένονται δύο υβριδικά σήματα κόκκινου/πράσινου (2Y).

Αναμενόμενο μη φυσιολογικό πρότυπο σημάτων



Σε ένα κύτταρο με ισορροπημένη αναδιάταξη MLL (KMT2A), το αναμενόμενο πρότυπο σημάτων θα είναι ένα κόκκινο, ένα πράσινο και ένα υβριδικό (1K, 1Π, 1Υ).

Μπορούν να προκύψουν και άλλα πρότυπα σημάτων σε ανεπτυγμένη/μη ισορροπημένα δείγματα.

Γνωστή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Χωρίς γνωστή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα.

Αναφορά ανεπιθύμητων συμβάντων

Εάν πιστεύετε ότι το προϊόν αυτό παρουσίασε δυσλειτουργία ή υποβάθμιση στα χαρακτηριστικά απόδοσης, η οποία ενδέχεται να συνέβαλε σε ένα ανεπιθύμητο συμβάν (π.χ. καθυστέρηση ή εσφαλμένη διάγνωση ή ακατάλληλη θεραπεία), θα πρέπει να το αναφέρετε αμέσως στον κατασκευαστή (**email**: vigilance@ogt.com).

Το συμβάν θα πρέπει να αναφερθεί και στην αρμόδια αρχή της χώρας σας, εάν υπάρχει. Μπορείτε να βρείτε τον κατάλογο με τα σημεία επικοινωνίας για θέματα επαγρύπνησης στο: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Ειδικά χαρακτηριστικά απόδοσης

Αναλυτική ειδικότητα

Η αναλυτική ειδικότητα είναι το ποσοστό των σημάτων που υβριδοποιούνται μόνο στη σωστή θέση και σε καμία άλλη θέση. Η αναλυτική ειδικότητα καθορίστηκε με την ανάλυση συνολικά 200 θέσεων-στόχων. Η αναλυτική ειδικότητα υπολογίστηκε ως ο αριθμός των σημάτων FISH που υβριδοποιήθηκαν στη σωστή θέση διαιρεμένος με τον συνολικό αριθμό των υβριδοποιημένων σημάτων FISH.

Πίνακας 1. Αναλυτική ειδικότητα του MLL (KMT2A) Breakapart Probe

Ιχνηθέτης	Θέση-στόχος	Αριθμός σημάτων υβριδοποιήθηκαν στη σωστή θέση	Συνολικός αριθμός υβριδοποιημένων σημάτων	Ειδικότητα (%)
Κόκκινος MLL	11q23.3	200	200	100
Πράσινος MLL	11q23.3	200	200	100

Αναλυτική ευαισθησία

Η αναλυτική ευαισθησία είναι το ποσοστό των αξιολογήσιμων μεσοφασικών κυττάρων με το αναμενόμενο πρότυπο φυσιολογικών σημάτων. Η αναλυτική ευαισθησία καθορίστηκε με την ανάλυση μεσοφασικών κυττάρων από διαφορετικά φυσιολογικά δείγματα. Η ευαισθησία υπολογίστηκε ως το ποσοστό των αξιολογήσιμων κυττάρων με το αναμενόμενο πρότυπο σημάτων (με διάστημα εμπιστοσύνης 95%).

Πίνακας 2. Αναλυτική ευαισθησία του MLL (KMT2A) Breakpart Probe

Αριθμός κυττάρων με τα αναμενόμενα πρότυπα σημάτων	Αριθμός κυττάρων με αξιολογήσιμα σήματα	Ευαισθησία (%)	Διάστημα εμπιστοσύνης 95%
4965	5000	99,30	99,03 - 99,50

Χαρακτηρισμός των φυσιολογικών τιμών αποκοπής

Η φυσιολογική τιμή αποκοπής, σε σχέση με τους ιχνηθέτες FISH, είναι το μέγιστο ποσοστό αξιολογήσιμων μεσοφασικών κυττάρων με ειδικό μη φυσιολογικό πρότυπο σημάτων, στο οποίο ένα δείγμα θεωρείται φυσιολογικό για το συγκεκριμένο πρότυπο σημάτων.

Η φυσιολογική τιμή αποκοπής καθορίστηκε με τη χρήση δαγμάτων αρνητικών για την αναδιάταξη που προορίζεται να ανιχνεύει ο ιχνηθέτης και τη β αντίστροφη συνάρτηση. Για κάθε δείγμα, καταγράφηκαν τα πρότυπα σημάτων 100 μεσοφασικών πυρήνων από δύο ανεξάρτητους αναλυτές, με σύνολο 200 ανά δείγμα.

Πίνακας 3. Χαρακτηρισμός των φυσιολογικών τιμών αποκοπής του MLL (KMT2A) Breakpart Probe

Μη φυσιολογικό πρότυπο σημάτων	Αριθμός δειγμάτων που αναλύθηκαν για την εύρεση της τιμής αποκοπής	Αριθμός πυρήνων που αξιολογήθηκαν ανά δείγμα	Μέγιστος αριθμός ψευδώς θετικών προτύπων σημάτων	Φυσιολογική τιμή αποκοπής (%)
1K, 1Π, 1Υ	1600	200	3	3,8

Τα εργαστήρια πρέπει να επιβεβαιώνουν τις τιμές αποκοπής χρησιμοποιώντας τα δικά τους δεδομένα^{7,8}.

Αναπαραγωγιμότητα

Η αναπαραγωγιμότητα υπολογίστηκε από τρία ανεξάρτητα εργαστήρια, τα οποία εξέτασαν έξι τυφλοποιημένα δείγματα (δύο αρνητικά για την αναδιάταξη, δύο δείγματα χαμηλής θετικότητας, τα οποία ήταν 1 έως 3 φορές πάνω από την τιμή αποκοπής, και δύο έντονα θετικά δείγματα, τα οποία περιείχαν περισσότερο από 45% κύτταρα θετικά για την αναδιάταξη). Η ανάλυση διενεργήθηκε χρησιμοποιώντας δύο επαναλήψεις για κάθε δείγμα κατά τη διάρκεια πέντε μη διαδοχικών ημερών.

Και τα τρία κέντρα διενήργησαν δοκιμές σύγκρισης εντός της ημέρας, μεταξύ ημερών και μεταξύ κέντρων χρησιμοποιώντας την ίδια παρτίδα ιχνηθέτη, ενώ ένα από τα κέντρα διενήργησε και δοκιμές αναπαραγωγιμότητας μεταξύ παρτίδων χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές παρτίδες ιχνηθέτη.

Η αναπαραγωγιμότητα υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη συμφωνία μεταξύ των μεταβλητών που εξετάστηκαν κατά τη διάρκεια κάθε δοκιμής.

Πίνακας 4. Αναπαραγωγιμότητα του MLL (KMT2A) Breakpart Probe

Μελέτη αναπαραγωγιμότητας	Δείγμα	Συμφωνία (%)
Εντός ημέρας / μεταξύ ημερών / μεταξύ κέντρων	Αρνητικό	100
	Έντονα θετικό	100
Μεταξύ παρτίδων	Αρνητικό	100
	Έντονα θετικό	100

Κλινική απόδοση

Η κλινική απόδοση υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας ένα αντιπροσωπευτικό σύνολο μη επιλεγμένων ασθενών που παραπέμφθηκαν για ΟΜΛ ή ΜΔΣ σε δύο διαφορετικά κέντρα (με συλλογή 100 δειγμάτων από το πρώτο κέντρο και 413 από το δεύτερο κέντρο). Τα ποσοστά επίπτωσης των αναδιατάξεων που ανιχνεύθηκαν από τον ιχνηθέτη συγκρίθηκαν με εκείνα που συλλέχθηκαν από ανασκόπηση βιβλιογραφικών πηγών.

Για να καταστεί εφικτή η σύγκριση αυτή, το διάστημα εμπιστοσύνης που εμφανίζεται στη βιβλιογραφία σε πληθυσμό μεγέθους 100 δειγμάτων εξήχθη υπολογίζοντας με έλεγχο αναλογιών 1 δείγματος με διόρθωση συνέχειας.

Πίνακας 5. Κλινική απόδοση του MLL (KMT2A) Breakpart Probe

Αναδιάταξη	Επιπολασμός				
	Βιβλιογραφική ανασκόπηση (%)	Κατώτερο διάστημα εμπιστοσύνης 95% (ΚΔΕ) (%)	Κέντρο 1 (%)	Κέντρο 2 (%)	95% UCL (%)
ΟΜΛ με ανωμαλία t(11;v)(q23;v)/11q23 / αναδιάταξη MLL	2,9	0,7	2	1,45	9,0
ΜΔΣ με t(11;v)(q23;v)	0,2	0			5,0

Πρόσθετες πληροφορίες

Για πρόσθετες πληροφορίες, επικοινωνήστε με το Τμήμα Τεχνικής Υποστήριξης της CytoCell.

Τηλ.: +44 (0)1223 294048

Email: techsupport@cytoCELL.com

Ιστότοπος: www.ogt.com

Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Tamai, Inokuchi, J Clin Exp Hematopathol 2010;50(2):91-98
2. Wright, Vaughan, Critical Reviews in Oncology/Hematology 2014;91(3):283-291
3. Van der Burg *et al.*, Leukemia 2004;18(5):895-908
4. Tomizawa, Pediatr Int 2015;57(8):811-819
5. Grossman *et al.*, Leukemia 28 March 2013; doi:10.1038/leu.2013.90
6. Arsham, MS., Barch, M.J. and Lawce H.J. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
7. 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.
8. 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.

Οδηγός συμβόλων

	eI: Αριθμός καταλόγου
	eI: <i>In vitro</i> διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	eI: Αριθμός παρτίδας
	eI: Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	eI: Κατασκευαστής
	eI: Ημερομηνία λήξης
	eI: Όριο θερμοκρασίας
	eI: Να διατηρείται μακριά από το ηλιακό φως
	eI: Περιέχει επαρκή ποσότητα για <n> εξετάσεις
	eI: Περιεχόμενα

Διπλώματα ευρεσιτεχνίας και εμπορικά σήματα

Το CytoCell είναι εμπορικό σήμα της CytoCELL Ltd.



CytoCELL Ltd.
Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, UK
Τηλ.: +44(0)1223 294048
Φαξ: +44(0)1223 294986
Email: probes@cytoCELL.com
Ιστότοπος: www.ogt.com