



A Sysmex Group Company



Kullanım Talimatları

REF: LPH 087-S / LPH 087

CLL Plus Screening Panel



YALNIZCA PROFESYONEL KULLANIM İÇİNDİR



www.cytoCELL.com

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

Sınırlamalar

Bu cihazlar; 13q14.3, ATM, P53 (TP53) ve MYB bölgelerini ve kromozom 12 sentromerini içeren bu prob setlerindeki kırmızı klonlarla kaplanan bölgelerden daha büyük genomik alımları veya kayıpları tespit etmek için tasarlanmıştır. Bu bölgeler dışındaki genomik kayıplar ve kazançlar veya bu bölgelerdeki kısmi kayıplar ve kazançlar bu ürünle tespit edilemeyebilir.

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 kullanılmalıdır; 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 raporlanması ve yorumlanması, profesyonel uygulama standartlarıyla tutarlı olmalıdır ve diğer klinik ve tanılama bilgilerini de göz önünde bulundurulmalıdır. Bu set, tanılama amaçlı diğer laboratuvar testlerine yardımcı olması için kullanılmalıdır. 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

CLL Plus Screening Panel, doğrulanmış veya şüpheli kronik lenfositik lösemili (KLL) hastalardan alınan hematolojik olarak türetilmiş hücre süspansiyonlarında sabitlenmiş kromozom 11 üzerindeki 11q22.3 bölgesinde, kromozom 17 üzerindeki 17p13.1 bölgesinde veya kromozom 13 üzerindeki 13q14.2-q14.3 ve/veya kromozom 12 üzerindeki sentromerik bölge ve/veya Carnoy çözeltisinde (3:1 metanol/asetik asit) bulunan 6q23.3 konumundaki kromozom 6 üzerindeki MYB bölgesini içeren kromozomal silmeleri 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 durumunun ve/veya kromozom 12 sentromer durumunun kazancının 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

Kronik lenfositik lösemi (KLL) için hematoloji problemleri ve alpha-satellite probu seçenekleri.

Alpha Satellite 12 Plus for CLL

Trisomi 12, vakaların %20'sinde görülen KLL'de tekrarlayan bir anormalliktir¹ ve sıklıkla benzersiz sitogenetik sapma olarak görülür (trisomi 12'li vakaların %40-60'ı)². Diğer herhangi bir genetik lezyonun yokluğunda, trizomi 12 düşük riskli olarak sınıflandırılır³. Bu ürün 5 (LPH 069-S) ve 10 (LPH 069) test kiti boyutlarında da bulunur ve tek gecelik hibridizasyon için optimize edilmiştir.

13q14.3

13q14'ü etkileyen silmeler KLL'de en sık görülen yapısal genetik sapmalardır^{3,4,5}. Bu bölgenin %30-60'ında heterozigöz olarak silindiği ve KLL'li hastaların %10-20'sinde homozigöz olarak silindiği bulunmuştur⁶. 13q14 silmeleri olan hastalar, diğer herhangi bir genetik lezyonun yokluğunda, çok düşük riskli olarak sınıflandırılır³.

P53 (TP53) (17p13.1)

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. TP53 kaybı, KLL'li hastaların %10'unda bildirilmiştir ve en zayıf prognostik işaretleyici olarak kabul edilir^{3,7}.

ATM (11q22.3)

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 çalışmaktır⁸. ATM kaybı, KLL'li hastaların %18'inde bildirilmiştir ve KLL'de kötü prognostik bir işaretleyicisi olarak kabul edilir⁹.

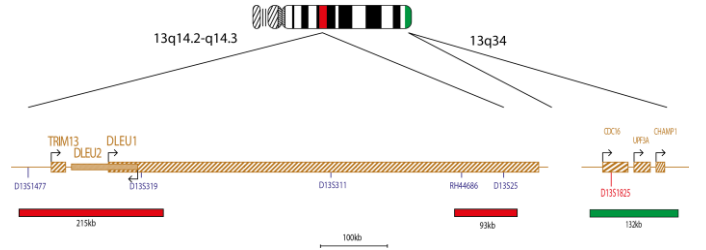
MYB (6q23.3)

Kromozom 6q'nun silmeleri KLL'de tekrarlar. MYB (MYB proto-onkojen, transkripsiyon faktörü) geni hematopoietik hücre proliferasyonunda ve farklılaşmasında temel rol oynar^{10,11}. 6q23.3 bandında bulunur ve 6q silme için bir işaretleyici olarak bulunur.

Prob Spesifikasyonu

13q14.3 Deletion Probe

13q14.2-q14.3, Kırmızı
13qter, 13q34, Yeşil

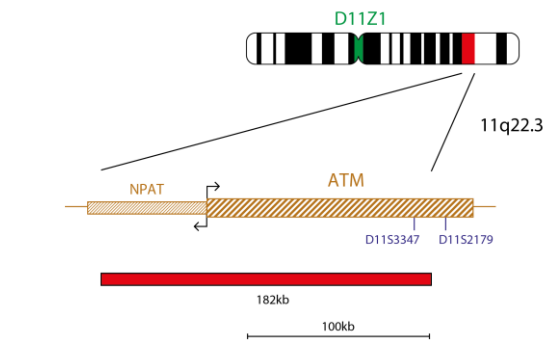


Kırmızı ile işaretlenmiş olan 13q14.2-q14.3 problemleri D13S319 ve D13S25 işaretleyicilerini kapsar. Yeşil renkle etiketlenmiş 13qter subtelomer spesifik prob (klon 163C9), kromozom 13'ün tanımlanmasına izin verir ve kontrol probu olarak işlev görür.

ATM Deletion Probe

ATM, 11q22.3, Kırmızı
D11Z1, 11p11.1-q11.1, Yeşil

CMP-H006 v005.00



ATM probu, NPAT geninin telomerik ucunu kaplayan kırmızı etiketli bir 182kb ve D11S3347 işaretçisinin hemen ötesindeki ATM geninin sentromerik ucundan oluşur. Prob karışımı yeşil renkle etiketlenmiş 11 sentromer (D11Z1) için bir kontrol probu da içerir.

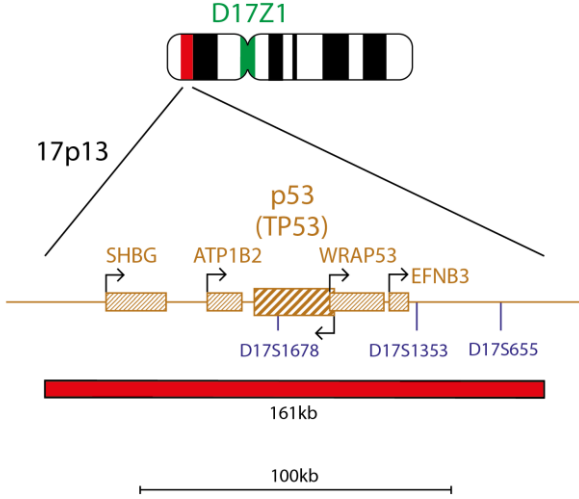


Alpha-Satellite 12 Plus Probe, sentromerik tekrar sekansı D12Z3'ü tanıyan kırmızı ile etiketlenmiş bir tekrar sekansı probudur.

P53 (TP53) Deletion Probe

P53, 17p13, Kırmızı
D17Z1, 17p11.1-q11.1, Yeşil

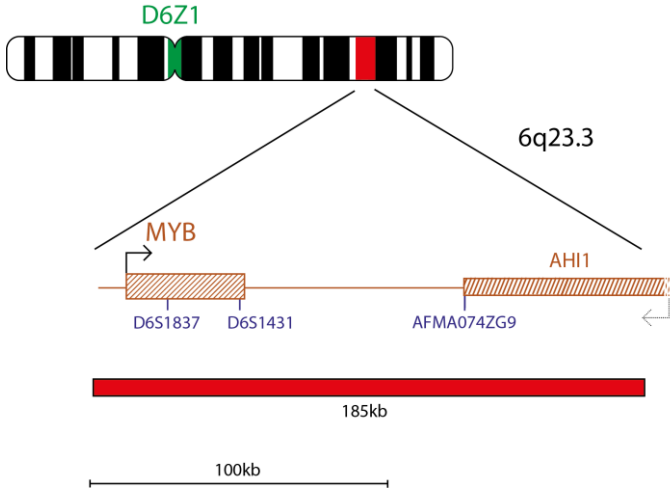
CMP-H039 V007.00



p53 (TP53) probu kırmızı renkte etiketlenmiş 161kb olup, tüm p53 (TP53) genini ve yan bölgeleri kapsar. Prob karışımı, yeşil renkle etiketlenmiş 17 sentromer (D17Z1) için bir kontrol probu da içerir.

MYB Deletion Probe

MYB, 6q23.3, Kırmızı
D6Z1, 6p11.1-q11.1, Yeşil



MYB probu karışımı, tüm MYB genini kapsayan kırmızı renkle etiketlenmiş bir 185kb probdan ve AHI1 geninin sentromerik bir bölümünü içeren gene telomerik bir bölgeden oluşur. Bu prob karışımı yeşil renkle etiketlenmiş 6 sentromer (D6Z1) için bir kontrol probu da içerir.

Tedarik Edilen Materyaller

Problar: 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.

Karşıt Boya:

Viyal başına 150µl (15 test)
Karşıt boya, DAPI renk solması karşıtı karışımdır (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

Uyarılar ve Tedbirler

- Yalnızca *in vitro* tanılama amaçlıdır. Yalnızca profesyonel kullanım içindir.
- DNA problemlerini ve DAPI karşıt boyasını kullanırken eldiven giyin.

- Prob karışımları bir teratojen olan formamit içermektedir; buharı solumayın ya da cildinize temas ettirmeyin. Kullanırken özen gösterin; eldiven ve laboratuvar önlüğü giyin.
- DAPI'nın kanserojen potansiyeli vardır. Kullanırken özen gösterin; eldiven ve laboratuvar önlüğü giyin.
- Tüm tehlikeli malzemeleri, kurumuzun tehlikeli atık boşaltımı kılavuzuna göre boşaltın.
- 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 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 karşıt 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:

- Isıtmalı tabla (sert bir tabla ve 80°C'ye kadar doğru sıcaklık kontrolü)
- Kalibre edilmiş değişken hacimli mikropipet ve uç aralığı 1µl - 200µl
- Doğru sıcaklık kontrolünde (37°C ve 72°C) su banyosu
- Mikrosantrifüj tüpler (0.5ml)
- 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 ölçülebilen pH indikatör şeritler)
- Nemli kap
- Floresan dereceli mikroskop lensi immersiyon yağı
- Tezgah üstü santrifüj
- Mikroskop lamaları
- 24x24 lamel
- 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

- 20x salin-sodyum sitrat (SSS) Çözeltisi
- %100 Etanol
- Tween-20
- 1M Sodyum Hidroksit (NaOH)
- 1M Hidroklorik asit (HCl)
- Aritılmış 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:

Florofor	Eksitasyon _{maks} [nm]	Emisyon _{maks} [nm]
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 geçirici filtre ya da ikili yeşil/kırmızı spektrum bant geçirici filtre kullanın.

Doğru şekilde çalıştığından emin olmak için, floresan mikroskopu 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 kaçınınız. Bu, sinyalleri bozacaktır. Lamba ömrü ve filtrelerin yaşıyla ilgili olarak üreticilerin önerilerine riayet edin.

Numune Hazırlama

Bu set, laboratuvar ya da kurumsal kılavuzlara göre hazırlanmış olan, Carnoy çözeltisi (3:1 metanol/asetik asit) fiksatifli 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, kültürlene, hasat ve lam yapımı için öneriler içermektedir¹².

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 geçirmez bir kaptaki, 6 ay boyunca, oda sıcaklığında muhafaza edin.

2xSSS Çözeltisi

1 birim 20xSSS Çözeltiyi 9 birim arıtılmış 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 kaptaki, 4 haftaya kadar muhafaza edin.

0.4xSSS Çözeltisi

1 birim 20xSSS Çözeltiyi 49 birim arıtılmış 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 kaptaki, 4 haftaya kadar muhafaza edin.

2xSSS, %0.05 Tween-20 Çözeltisi

1 birim 20xSSS Çözeltiyi 9 birim arıtılmış 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 kaptaki, 4 haftaya kadar muhafaza edin.

FISH Protokolü

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

Lam hazırlama

1. Hücre numunesini cam mikroskop lam üzerine yerleştirin. Kurumaya izin verin. **(Sitogenetik bir kurutma kabini kullanıyorsanız tercihe bağlıdır: lam üzerine damlatma sitogenetik kurutma kabiniinde 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).**
2. Lamı 2 dakika boyunca, oda sıcaklığında ve ajitasyon olmadan 2xSSS 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 pipetle karıştırıldığından ve çözeltinin eşit olarak dağıldığından emin olun.
7. Test başına probtan 10µl 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 10µl alıp hücre numunesi üzerine damlatın ve dikkatlice bir lamel uygulayın. Kauçuk çözelti yapıştırıcısıyla kapatın ve yapıştırıcının tamamen kurumasına izin verin.

Denatürasyon

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

Melezleştirme

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

Melezleme Sonrası Yıkamalar

12. DAPI'yı 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 0.4xSSS (pH 7.0) içine daldırın.
15. Lamı kurutun ve 30 saniye boyunca, oda sıcaklığında (pH 7.0) 2xSSS, %0.05 Tween-20 içine daldırın.
16. Lamı kurutun ve her bir numuneye 10µl 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 mikroskopa görüntüleyin. (Bkz. **Floresan Mikroskop Önerisi.**)

Kullanılmış Lamaların Stabilitesi

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

Prosedürel Öneriler

1. Lamaların ısıtılması ya da yıpranması, sinyal floresanını düşürebilir
2. Cytocell Ltd.'nin tedarik ettiği ya da önerdiği reaktifler haricinde reaktifler kullanmak, melezleştirme 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 konsantrasyonlar, pH ve sıcaklıklar önemlidir
5. Tamamlanmamış denatürasyon sinyal yokluğuna, aşırı denatürasyon ise belirsiz bağlanmaya neden olabilir

6. Aşırı melezleştirme 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

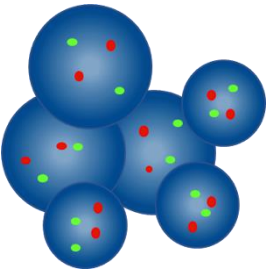
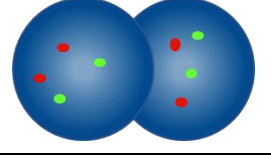
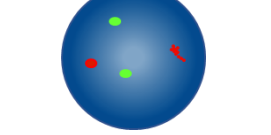
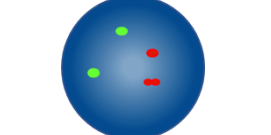
Lam Kalitesinin Değerlendirilmesi

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 intakt değilse

Analiz Kılavuzları

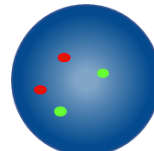
- Her numuneyi iki analist analiz etmeli ve yorumlamalıdır. Herhangi bir tutarsızlık üçüncü bir analist tarafından değerlendirilerek çözümlenmelidir
- Analistlerin hepsi geçerli ulusal standartların öngördüğü vasıflara sahip olmalıdır
- Her analist, her numune için bağımsız olarak 100 çekirdek almalıdır. 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 sinyal ve iki yeşil sinyal olarak sayın - iki kırmızı sinyalden biri dağınmıştır
	İki kırmızı sinyal ve iki yeşil sinyal olarak sayın - bir kırmızı sinyaldeki boşluk iki sinyal genişliğinden azdır

Beklenen Sonuçlar

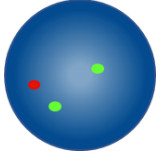
13q14.3 Deletion Probe

Beklenen Normal Sinyal Örüntüsü

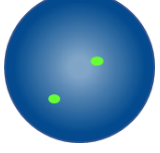


Normal bir hücrede, iki kırmızı ve iki yeşil sinyal (2K, 2Y) olması beklenir.

Beklenen Anormal Sinyal Örüntüleri



13q14.3'ün hemizigot silinmesi olan bir hücrede, beklenen sinyal örüntüsü bir kırmızı ve iki yeşil sinyal (1K, 2Y) şeklinde olacaktır.



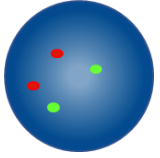
Homozigot silinmesi olan bir hücrede, beklenen sinyal örüntüsü kırmızı olmayacak ve iki yeşil sinyal (0K, 2Y) olacak şekildedir.

KLL'deki 13q silinmeleri, heterojen olarak algılanır; 13q bölgesindeki küçük silinmeler, bu prob seti ile küçük bir kalıntı sinyalle sonuçlanabilir.

Anöploid/dengesiz numunelerde diğer sinyal örüntüleri mümkündür.

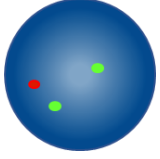
ATM Deletion Probe

Beklenen Normal Sinyal Örüntüsü



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

Beklenen Anormal Sinyal Örüntüleri

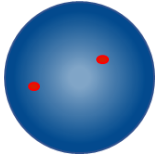


ATM silinmesi olan bir hücrede, beklenen sinyal modeli bir kırmızı ve iki yeşil sinyal olur (1K, 2Y).

Anöploid/dengesiz numunelerde diğer sinyal örüntüleri mümkündür.

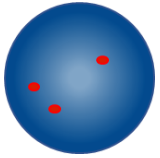
Alpha Satellite 12 Plus for CLL

Beklenen Normal Sinyal Örüntüsü



Normal bir hücrede, iki kırmızı sinyal (2K) beklenir.

Beklenen Anormal Sinyal Örüntüleri

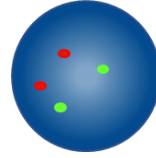


Trizomi 12'li bir hücrede, beklenen sinyal modeli üç kırmızı sinyal (3K) olacaktır.

Anöploid/dengesiz numunelerde diğer sinyal örüntüleri mümkündür.

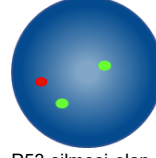
P53 (TP53) Deletion Probe

Beklenen Normal Sinyal Örüntüsü



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

Beklenen Anormal Sinyal Örüntüleri

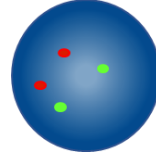


P53 silinmesi olan bir hücrede beklenen sinyal modeli bir kırmızı ve iki yeşil sinyal olur (1K, 2Y).

Anöploid/dengesiz numunelerde diğer sinyal örüntüleri mümkündür.

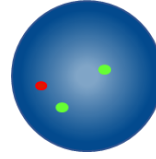
MYB Deletion Probe

Beklenen Normal Sinyal Örüntüsü



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

Beklenen Anormal Sinyal Örüntüleri



MYB 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

Prob	Bilinen Çapraz reaktivite
13q14.3 Deletion Probe	Yeşil 13qter probu, kromozom 19'un merkezine ve diğer kromozomların p-kollarına çapraz hibridizasyon gösterebilir.
ATM Deletion Probe	Yeşil D11Z1 probu, Xc ve 17c'ye 4'e varan çapraz hibridizasyon sinyali gösterebilir.
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	Prob; 3c, 6c, 7c ve 10c'ye kırmızı çapraz hibridizasyon gösterebilir.
P53 Deletion Probe	Yeşil D17Z1 probu, kromozom 11'in ve X'in merkezine çapraz hibridizasyon gösterebilir.
MYB Deletion Probe	Bilinen çapraz hibridizasyon yok

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. Vijilans temas noktalarının bir listesini [şurada](http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/) bulabilirsiniz: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

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 Plus Screening Panel için Analitik Belirlilik

Kit	Prob	Hedef Lokus	Doğru Lokusa Hibridize Olan Sinyallerin Sayısı	Hibridize Sinyallerin Toplam Sayısı	Spesifite (%)
13q14.3 Deletion Probe	Kırmızı 13q14.3	13q14.3	200	200	100
	Yeşil 13qter	13qter, 13q34	200	200	100
ATM Deletion Probe	Kırmızı ATM	11q22.3	200	200	100
	Yeşil D11Z1	11q11.1-q11.1	200	200	100
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	D12Z3 Kırmızı	12p11.1-q11.1	200	200	100
P53 Deletion Probe	Kırmızı P53	17p13.1	200	200	100
	Yeşil D17Z1	17p11.1-q11.1	200	200	100
MYB Deletion Probe	Kırmızı MYB	6q23	200	200	100
	Yeşil D6Z1	6p11.1-q11.1	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 Plus Screening Panel için Analitik Hassasiyet

Kit	Beklenen Sinyal Örüntülü Hücrelerin Sayısı	Skorlanabilir Sinyalli Hücrelerin Sayısı	Sensitivite (%)	%95 Güven Aralığı
13q14.3 Deletion Probe	481	500	96,2	1,6
ATM Deletion Probe	482	500	96,4	1,0
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	487	500	97,4	1,0
P53 Deletion Probe	471	500	94,2	2,7
MYB Deletion Probe	479	500	95,8	1,7

Normal Kesim Değerleri Karakterizasyonu

FISH problarıyla 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 Plus Screening Panel Normal Kesim Değeri Karakterizasyonu

Kit	Anormal sinyal örüntüsü	Youden İndeksi	Normal Kesim (%)
13q14.3 Deletion Probe	1K, 2Y veya OK, 2Y	0,95	7
ATM Deletion Probe	1K, 2Y	0,99	9
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	3K	0,99	3
P53 Deletion Probe	1K, 2Y	0,90	10
MYB Deletion Probe	1K, 2Y	0,97	8

Laboratuvarlar kesim değerlerini kendi verilerini kullanarak teyit ederler^{13, 14}.

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 üretilirlik, bir testin değişebilirliğinin ölçülmesidir. Numuneden numuneye, günden güne ve partiden partiye değişebilirlik testleriyle belirlenir. Günden güne yeniden üretilirlik, aynı numunelerin farklı üç günde analiz edilmesiyle değerlendirildi. Partiden partiye yeniden üretilirlik, aynı numunelerin bir gün içinde üç farklı lot kullanılarak analiz edilmesiyle değerlendirildi. Numuneden numuneye yeniden üretilirlik, 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 üretilirlik ve kesinlik, her değişken ve genel ortalama açısından, tekrarlar arasındaki Standart Sapma (STDEV) olarak hesaplandı.

Tablo 4. CLL Plus Screening Panel için Tekrar Üretilirlik ve Kesinlik

Değişken	Standart Sapma (STDEV)				
	13q14.3 Deletion Probe	ATM Deletion Probe	Alpha Satellite 12 Plus for CLL	P53 Deletion Probe	MYB Deletion Probe
Kesinlik	0,72	0,38	0,72	2,63	1,09
Numuneden numuneye	0,58	0,38	0,89	2,30	1,19
Günden güne	0,96	0,58	0,51	2,39	1,20
Partiden partiye	1,40	1,27	1,27	1,68	0,90
Genel Sapma	1,03	1,01	1,15	2,16	1,06

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 Plus Screening Panel için Klinik Performans

Prob	Klinik Sensitivite (gerçek pozitif oran, TPR)	Klinik Sensitivite (gerçek negatif oran, TPR)	Yanlış Pozitif oran (FPR) = 1 - Spesifite
13q14.3 Deletion Probe	%96,3	%99,1	%0,9
ATM Deletion Probe	%100	%99,2	%0,8
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	%100	%100	%0
P53 Deletion Probe	%92,5	%97,1	%2,9
MYB Deletion Probe	%97,8	%99,6	%0,4

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

1. Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
2. Puiggros *et al.*, Biomed Res Int 2014;1:1-13
3. Rossi *et al.*, Blood 2013;121(8):1403-1412
4. Juliusson G *et al.*, N Eng J Med 1990;323:720-4
5. Kasar *et al.*, Nature Communications 2015;6:1-12
6. Hammarsund M *et al.*, FEBS Letters 2004;556:75-80
7. Baliakas P, *et al.*, Leukemia. 2014;(April):1-8
8. Stankovic *et al.*, Blood 2004;103(1):291-300
9. Dohner *et al.*, N Eng J Med 2000;343:1910-1916
10. Clappier *et al.*, Blood 2007;110(4):1251-1261
11. Stilgenbauer *et al.*, Leukemia, 1999;13:1331-1334
12. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
13. 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.
14. 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, CytoCell Ltd.'nin tescilli ticari markasıdır.



CytoCell 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@cytoCell.com
Web sitesi: www.ogt.com