



Kalibre edilmiş teçhizat kullanılmalıdır:

1. Isıtmalı 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 tüpleri (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 ölçeklenen pH indikatör şeritler)
10. Nemli kap
11. Floresan dereceli mikroskoplensi immersiyon yağı
12. Tezgah üstü santrifüj
13. Mikroskop lamaları
14. 24x24 lamel
15. Zamanlayıcı
16. 37°C inkübatör
17. Kauçuk çözelti yapıştırıcısı
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. Artılmış 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 <sub>maks</sub> [nm]	Emisyon <sub>maks</sub> [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 çalıştırdığınızdan 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 set, laboratuvar ya da kurumsal kılavuzlara göre hazırlanmış olan, Carnoy çözeltisi (3:1 metanol/asetik asit) fiksatifinde 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, kültürlenme, hasat ve lam yapımı için öneriler içermektedir<sup>4</sup>.

#### Çözelti Hazırlama

##### Etanol Çözeltileri

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

- %70 Etanol - 7 birim %100 etanol ve 3 birim artılmış su
  - %85 Etanol - 8.5 birim %100 etanol ve 1.5 birim artılmış su
- Çözeltileri hava geçirmez bir kaptaki, 6 ay boyunca, oda sıcaklığında muhafaza edin.

##### 2xSSS Çözeltisi

1 birim 20xSSS Çözeltiyi 9 birim artılmış suyla seyreltin ve iyice karıştırın. pH'i 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 artılmış suyla seyreltin ve iyice karıştırın. pH'i 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 artılmış suyla seyreltin. Her 10 ml başına 5µl Tween-20 ekleyin ve iyice karıştırın. pH'i 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 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).
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.

#### Mezleştirme

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

#### Mezleme 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 0.4xSSS (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 kanşımı 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**).

#### 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, mezleştirme koşullarını olumsuz etkileyebilir
3. Bu sıcaklıklar 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 mezleştirme ilave ya da beklenmeyen sinyallerin ortaya çıkmasıyla sonuçlanabilir
7. Kullanıcılar, testi tanılama amaçlı olarak kullanmadan önce, protokdü kendi numunelerine göre optimize etmelidirler
8. Optimal altı koşullar, belirsiz bağlanmanın yanlış şekilde prob sinyali olarak yorumlanmasına neden olabilir

#### Sonuçların Yorumlanması

##### Lam Kalitesinin Değerlendirilmesi

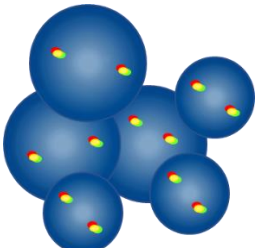
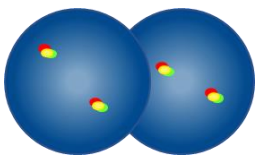
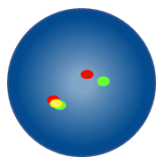
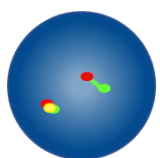
Aşağıdaki durumlarda lam analiz edilmemelidir:

- Sinyaller, tekli filtrelerle analiz yapmak için çok zayıf - 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 mezleştirilmemişse
- 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

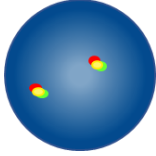
- Her numuneyi iki analist analiz etmeli ve yorumlamalıdır. Herhangi bir tutarsızlık üçüncü bir analist tarafından değerlendirilerek çözümlenmelidir
- Analistlerin hepsi geçerli ulusal standartların öngördüğü vasıflara sahip olmalıdır

- 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 kaçının
- Sinyal yoğunluğu, tek bir çekirdekte bile değişebilir. Bu durumlarda, teki filtreler kullanın ve/ya da odak düzlemini ayarlayın
- 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 sinyaltek olarak kabul edilir
- Üç renkli ayırma probunu analiz ederken aralarında iki sinyal genişliğinden daha dar olan bir boşluk bulunan kırmızı ve yeşil sinyaller varsa bunlar yeniden düzenlenmemiş/kaynaştırılmamış sinyal olarak sayılırlar
- Hücresinin 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
	Kırmızı ile yeşil sinyal arasında iki füzyon sinyali olarak sayılan boşluk iki sinyal genişliğinden daha dardır
	İki füzyon sinyali olarak sayılır, bir füzyon sinyali dağıtılır

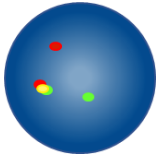
#### Beklenen Sonuçlar

##### Beklenen Normal Sinyal Örüntüsü



Normal bir hücrede, iki kırmızı/yeşil füzyon sinyali beklenir (2F).

##### Beklenen Anormal Sinyal Örüntüleri



RARA yeniden düzenlemesi olan bir hücrede, beklenen sinyal modeli bir kırmızı, bir yeşil ve bir füzyon olur (1K, 1Y, 1F).

Anöploid/dengesiz numunelerde diğer sinyal örüntüleri mümkündür.

#### Bilinen Çapraz Reaktivite

Bilinen çapraz reaktivite yok.

#### Olumsuz Durum Raporlaması

Eğer bu cihazın işlevini yeterli şekilde yerine getirmediyse ya da performansının olumsuz durumları (örn. gecikmiş ya da yanlış teşhis, gecikmiş ya da yanlış tedavi) daha da ağırlaştırarak 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 burada 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. RARα Breakapart Probe için Analitik Belirlilik

Prob	Hedef Lokus	Doğru Lokusa Hibridize Olan Sinyallerin Sayısı	Hibridize Sinyallerin Toplam Sayısı	Spesifite (%)
Kırmızı RARα	17q21.1	200	200	100
Yeşil RARα	17q21.2	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. RARα Breakapart Probe için Analitik Hassasiyet

Beklenen Sinyal Örüntülü Hücrelerin Sayısı	Skorlanabilir Sinyalli Hücrelerin Sayısı	Sensitivite (%)	%95 Güven Aralığı
473	500	94,6	3,5

##### Normal Kesim Değerleri Karakterizasyonu

FISH problemleri 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, Duyarlılık + Seçicilik-1'in maksimize olduğu eşik değeri bulmak için hesaplandı.

Tablo 3. RARα Breakapart Probe için Normal Kesim Değeri Karakterizasyonu

Anormal sinyal örüntüsü	Youden İndeksi	Normal Kesim (%)
1K, 1Y, 1F	0,99	3

Laboratuvarlar kesim değerlerini kendi verilerini kullanarak teyit ederler<sup>5,6</sup>.

##### Kesinlik ve Yeniden Üretilebilirlik

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 tekrarı 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. RARα Breakapart Probe için Yeniden Üretilebilirlik ve Kesinlik

Değişken	Standart Sapma (STDEV)
Kesinlik	0,38
Numuneden numuneye	0,19
Günden güne	0,38
Partiden partiye	0,38
Genel Sapma	0,72

### Klinik Performans

Klinik performans, ürünün hedef popülasyonunun temsili numunesiyle tespit edildi. Her numune için,  $\geq 100$  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. RAR $\alpha$  Breakapart Probe için Klinik Performans

Değişken	Sonuç
Klinik Sensitivite (gerçek pozitif oran, TPR)	%100
Klinik Sensitivite (gerçek negatif oran, TPR)	%100
Yanlış Pozitif oran (FPR) = 1 – Spesifite	%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@cytoCELL.com

Web sitesi: www.ogt.com

### Referanslar

1. Creutzig *et al.*, Blood 2012;120(16):3187-3205
2. Zhang *et al.*, Blood Reviews 2015;29(2):101-125
3. Tomita *et al.*, International Journal of Haematology 2013;97(6):717-725
4. Arsham, MS., Barch, M.J. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
5. 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.
6. 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: <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