



A Sysmex Group Company



Οδηγίες χρήσης

ΚΩΔ. ΑΝΑΦ.: LPH 065-S / LPH 065

## RARα (RARA) Breakapart Probe



ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΓΙΑ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ



www.cytocell.com

Μπορείτε να βρείτε περαιτέρω πληροφορίες και άλλες γλώσσες στον ιστότοπο [www.ogt.com](http://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 την περιοχή του *RARA*. 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 κιτ 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 κιτ δεν έχει επικυρωθεί για άλλους σκοπούς πέραν της καθορισμένης προβλεπόμενης χρήσης.

### Προβλεπόμενη χρήση

Το CytoCell RARα (RARA) Breakapart Probe είναι μια ποιοτική, μη αυτοματοποιημένη, εξέταση φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH) που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση χρωμοσωμικών αναδιατάξεων στην περιοχή 17q21.1-q21.2 του χρωμοσώματος 17 σε μονοποιημένα σε διάλυμα Carnoy (μεθανόλη/οξικό οξύ 3:1) κυτταρικά εναιωρήματα αιματολογικής προέλευσης από ασθενείς με επιβεβαιωμένη ή πιθανολογούμενη οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ).

### Ενδείξεις

Το προϊόν αυτό 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 *RARA* 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 μονοποιημένα κυτταρογενετικά δείγματα. Η τεχνική χρησιμοποιεί ιχνηθέτες DNA που υβριδοποιούνται σε ολόκληρα χρωμοσώματα ή μεμονωμένες μοναδικές αλληλουχίες και χρησιμοποιεί 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 σηματοδοτούμενο ιχνηθέτη DNA, ο οποίος έχει συμπληρωματική αλληλουχία. Μετά τον υβριδισμό, γίνεται αφαίρεση του μη

δεσμευμένου και μη ειδικά δεσμευμένου ιχνηθέτη DNA και το DNA υποβάλλεται 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 PML (*promyelocytic leukemia*) βρίσκεται στην περιοχή 15q24.1 και το γονίδιο RARA (*retinoic acid receptor alpha*) βρίσκεται στην περιοχή 17q21.2. Στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας (ΟΠΛ), το γονίδιο RARA στην περιοχή 17q21.2 υφίσταται σύντηξη με το γονίδιο PML στην περιοχή 15q24.1. Ωστόσο, σε <5% των περιπτώσεων ΟΠΛ, το RARA υφίσταται σύντηξη με κάποιο άλλο γονίδιο<sup>1</sup>.

Γνωστές παραλλαγές του ζεύγους σύντηξης συμπεριλαμβάνουν τα NPM1 στην περιοχή 5q35, NUMA1 στην περιοχή 11q13, ZBTB16 (PLZF) στην περιοχή 11q23, STAT5B στην περιοχή 17q21, PRKARIA στην περιοχή 17q24, FIP1L1 στην περιοχή 4q12 και BCOR στην περιοχή Χp11<sup>2,3</sup>.

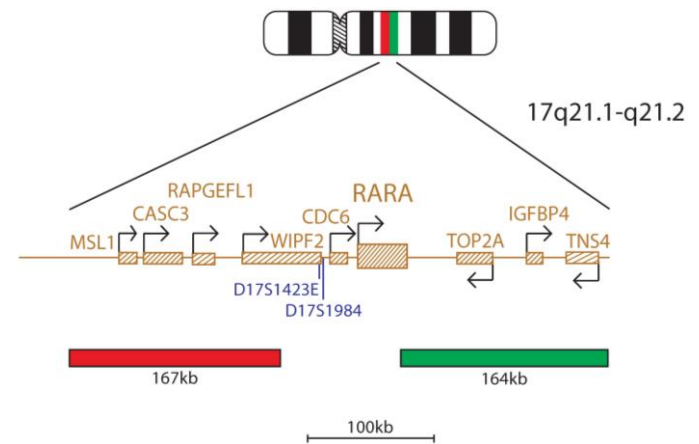
Οι ασθενείς με παραλλαγές μεταθέσεων RARA μπορεί να επιδείξουν μεταβλητή ευαισθησία στη θεραπεία, με ορισμένους ασθενείς να επιδεικνύουν ανεκτικότητα στα θεραπευτικά πρωτόκολλα<sup>1,3</sup>. Συνεπώς, είναι σημαντική η διάκριση μεταξύ ασθενών με ΟΠΛ που έχουν τη σύντηξη PML-RARA και εκείνων που έχουν παραλλαγές μεταθέσεων RARA.

Ο συγκεκριμένος ιχνηθέτης διάσπασης θα ανιχνεύσει αναδιατάξεις του γονιδίου RARA, ανεξάρτητα από το ποιο άλλο γονίδιο ή χρωμόσωμα συμμετέχει σε αυτές.

### Προδιαγραφές ιχνηθετών

RARα, 17q21.1-q21.2, Κόκκινος

RARα, 17q21.1-q21.2, Πράσινος



Το μείγμα ιχνηθετών διάσπασης του RARA αποτελείται από έναν ιχνηθέτη 167kb κεντρομερικό του γονιδίου RARA, που περιλαμβάνει το γονίδιο CASC3, και έναν ιχνηθέτη 164kb, που περιλαμβάνει το τελομερικό άκρο του γονιδίου RARA καθώς και τα γονίδια TOP2A και IGFBP4.

### Παρεχόμενα υλικά

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

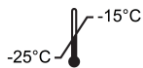
**Αντίχρωση:** 150 μl ανά φιαλίδιο (15 εξετάσεις)

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

### Προεidoποιήσεις 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 αναπνέετε αναθυμιάσεις και αποφύγετε την επαφή με το δέρμα. Απαιτείται προσεκτικός χειρισμός. Να φοράτε γάντια και εργαστηριακή ποδιά.
4. Το DAPI είναι δυνητικά καρκινογόνο. Απαιτείται προσεκτικός χειρισμός. Να φοράτε γάντια και εργαστηριακή ποδιά.
5. Απορρίψτε όλα τα επικίνδυνα υλικά σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του ιδρυματός σας για την απόρριψη επικίνδυνων αποβλήτων.
6. Οι χειριστές πρέπει να έχουν την ικανότητα να διακρίνουν το κόκκινο, το μπλε και το πράσινο χρώμα.
7. Η μη τήρηση του περιγραφόμενου πρωτοκόλλου των αντιδραστηρίων ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση και να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά/αρνητικά αποτελέσματα.
8. Ο ιχνηθέτης δεν θα πρέπει να αραιώνεται ή να αναμιγνύεται με άλλους ιχνηθέτες.
9. 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 (έναν κύκλο 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:

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

## Προαιρετικός εξοπλισμός που δεν παρέχεται

1. Κυτταρογενετικός θάλαμος ξήρανσης

## Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

1. Διάλυμα αλατούχου διαλύματος-κιτρικού νατρίου (SSC) 20x
2. Αιθανόλη 100%
3. Tween-20
4. Υδροξείδιο του νατρίου 1M (NaOH)
5. Υδροχλωρικό οξύ 1M (HCl)
6. 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 μέγ. [nm]	Εκπομπή μέγ. [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, δόκι 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 πλακών<sup>4</sup>.

## 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

1. 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).
2. Βυθίστε την αντικειμενοφόρο σε διάλυμα 2xSSC για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς ανακίνηση.
3. Αφυδατώστε σε διαφορετικά ποσοστά αιθανόλης (70%, 85% και 100%), διαδοχικά, το καθένα για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Αφήστε τη να στεγνώσει.

### Πριν από τη μετουσίωση

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

### Μετουσίωση

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

### Υβριδισμός

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

### Πλύσεις μετά τον υβριδισμό

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

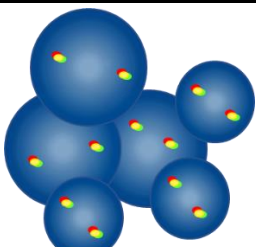
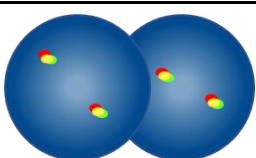
### Εκτίμηση ποιότητας αντικειμενοφόρων πλακών

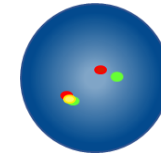
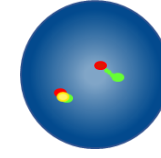
Η αντικειμενοφόρος δεν θα πρέπει να αναλύεται εάν:

- 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

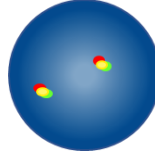
- Κάθε δείγμα θα πρέπει να αναλύεται και να ερμηνεύεται από δύο αναλυτές. Τυχόν ασυμφωνίες θα πρέπει να επιλύονται μέσω εκτίμησης από τρίτο αναλυτή
- Κάθε αναλυτής θα πρέπει να είναι κατάλληλα εξειδικευμένος σύμφωνα με τα αναγνωρισμένα εθνικά πρότυπα
- Κάθε αναλυτής θα πρέπει να βαθμολογεί μεμονωμένα 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
- Αποφεύγετε 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 δύο 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
	Μη 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

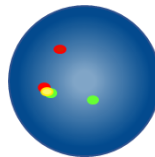
## Αναμενόμενα αποτελέσματα

### Αναμενόμενο φυσιολογικό πρότυπο σημάτων



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

### Αναμενόμενα μη φυσιολογικά πρότυπα σημάτων



Σε ένα κύτταρο με αναδιάταξη του RARA, το αναμενόμενο πρότυπο σημάτων θα είναι ένα κόκκινο, ένα πράσινο και ένα υβριδικό (1K, 1P, 1Y).

Μπορούν να προκύψουν και άλλα πρότυπα σημάτων σε ανευπλοειδή/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](mailto: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 RARα Breakpart Probe

Ιχνηθέτης	Θέση-στόχος	Αριθμός σημάτων που υβριδοποιήθηκαν στη σωστή θέση	Συνολικός αριθμός υβριδοποιημένων σημάτων	Ειδικότητα (%)
Κόκκινος RARα	17q21.1	200	200	100
Πράσινος RARα	17q21.2	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 RARα Breakpart Probe

Αριθμός κυττάρων με τα αναμενόμενα πρότυπα σημάτων	Αριθμός κυττάρων με αξιολογήσιμα σήματα	Ευαισθησία (%)	Διάστημα εμπιστοσύνης 95%
473	500	94,6	3,5

### 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 δειγμάτων από ασθενείς με φυσιολογικές και θετικές τιμές. Για κάθε δείγμα, καταγράφηκαν τα πρότυπα σημάτων 100 κυττάρων. Ο δείκτης Youden υπολογίστηκε ώστε να προκύψει η τιμή κατωφλίου για την οποία γίνεται μεγιστοποίηση Ευαισθησίας + Ειδικότητας-1.

Πίνακας 3. Χαρακτηρισμός των φυσιολογικών τιμών αποκοπής του RARα Breakpart Probe

Μη φυσιολογικό πρότυπο σημάτων	Δείκτης Youden	Φυσιολογική τιμή αποκοπής (%)
1K, 1Π, 1Υ	0,99	3

Τα εργαστήρια πρέπει να επιβεβαιώνουν τις τιμές αποκοπής χρησιμοποιώντας τα δικά τους δεδομένα<sup>5, 6</sup>.

### Ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα

Η ακρίβεια αποτελεί μέτρο της φυσιολογικής μεταβλητότητας μιας εξέτασης όταν επαναλαμβάνεται αρκετές φορές υπό τις ίδιες συνθήκες. Αξιολογήθηκε μέσω της ανάλυσης επαναληπτικών εξετάσεων του ίδιου αριθμού παρτίδας ιχνηθέτη στο ίδιο δείγμα, υπό τις ίδιες συνθήκες και την ίδια ημέρα.

Η αναπαραγωγιμότητα αποτελεί μέτρο της μεταβλητότητας μιας εξέτασης και καθορίζεται μεταξύ δειγμάτων, μεταξύ ημερών και μεταξύ παρτίδων. Η αναπαραγωγιμότητα μεταξύ ημερών αξιολογήθηκε με την ανάλυση των ίδιων δειγμάτων με την ανάλυση των ίδιων δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές ημέρες. Η αναπαραγωγιμότητα μεταξύ παρτίδων αξιολογήθηκε με την ανάλυση των ίδιων δειγμάτων στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί αριθμοί ιχνηθέτη σε μία ημέρα. Η αναπαραγωγιμότητα μεταξύ δειγμάτων αξιολογήθηκε με την ανάλυση τριών πανομοιότυπων δειγμάτων σε μία ημέρα. Για κάθε δείγμα, καταγράφηκαν πρότυπα σημάτων 100 μεσοφασικών κυττάρων και υπολογίστηκε το ποσοστό των κυττάρων με το αναμενόμενο πρότυπο σημάτων.

Η αναπαραγωγιμότητα και η ακρίβεια υπολογίστηκαν ως η Τυπική Απόκλιση (STDEV) μεταξύ των πανομοιότυπων δειγμάτων για κάθε μεταβλητή και η συνολική μέση STDEV.

Πίνακας 4. Αναπαραγωγιμότητα και ακρίβεια του RARα Breakpart Probe

Μεταβλητή	Τυπική απόκλιση (STDEV)
Ακρίβεια	0,38
Μεταξύ δειγμάτων	0,19
Μεταξύ ημερών	0,38
Μεταξύ παρτίδων	0,38
Συνολική απόκλιση	0,72

### Κλινική απόδοση

Η κλινική απόδοση καθορίστηκε βάσει αντιπροσωπευτικού δείγματος του πληθυσμού για τον οποίο προορίζεται το προϊόν. Για κάθε δείγμα, καταγράφηκαν τα πρότυπα σημάτων  $\geq 100$  μεσοφασικών κυττάρων. Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός φυσιολογικών/μη φυσιολογικών δεδομένων μέσω σύγκρισης του ποσοστού των κυττάρων με το συγκεκριμένο μη φυσιολογικό πρότυπο σημάτων και της φυσιολογικής τιμής αποκοπής. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τη γνωστή κατάσταση του δείγματος.

Τα αποτελέσματα των κλινικών δεδομένων αναλύθηκαν για να προκύψουν οι τιμές ευαισθησίας, ειδικότητας και αποκοπής, με τη χρήση μιας μονοδιάστατης προσέγγισης.

Πίνακας 5. Κλινική απόδοση του RARα Breakpart Probe

Μεταβλητή	Αποτέλεσμα
Κλινική ευαισθησία (ποσοστό αληθώς θετικών, TPR)	100%
Κλινική ευαισθησία (ποσοστό αληθώς αρνητικών, TNR)	100%
Ποσοστό ψευδώς θετικών (FPR) = 1 – Ειδικότητα	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. 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.

### Οδηγός συμβόλων

REF	eI: Αριθμός καταλόγου
IVD	eI: <i>In vitro</i> διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
LOT	eI: Αριθμός παρτίδας
	eI: Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	eI: Κατασκευαστής
	eI: Ημερομηνία λήξης
	eI: Όριο θερμοκρασίας
	eI: Περιέχει επαρκή ποσότητα για <n> εξετάσεις
CONT	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

