



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika

REF: LPH 027-S / LPH 027

AML1 (RUNX1) Breakapart Probe



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO



www.cytoCELL.com

Dalsze informacje oraz dokumenty w innych językach są dostępne pod adresem www.ogt.com

Ograniczenia

Ten wyrób jest przeznaczony do wykrywania rearanżacji z miejscami złamań w regionie, do którego wiążą się czerwone i zielone klony zawarte w tym zestawie sond, a który obejmuje region genu *AML1* (*RUNX1*). Produkt ten może nie umożliwić wykrycia miejsc złamań, do których doszło poza tym regionem, lub wariantowych rearanżacji całkowicie zawierających się w tym regionie.

Ze względu na rozproszenie regionu miejsca złamania w przypadku niektórych rearanżacji obecnych w ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL) użytkownicy mogą obserwować wariantowe wzorce sygnału.

Ten test nie jest przeznaczony do użytku jako samodzielny test diagnostyczny, do badań prenatalnych, populacyjnych badań przesiewowych, badań przyłóżkowych ani do samotestowania. Ten produkt jest przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego w laboratorium; wszystkie wyniki powinny być interpretowane przez personel posiadający odpowiednie kwalifikacje, z uwzględnieniem innych istotnych wyników testów.

Ten produkt nie został zatwierdzony do stosowania dla typów próbek lub chorób innych niż określone w części dotyczącej przeznaczenia.

Raportowanie i interpretacja wyników metody FISH powinny być zgodne z profesjonalnymi standardami praktyki i dokonywane z uwzględnieniem innych informacji klinicznych i diagnostycznych. Zestaw ten należy traktować jako uzupełnienie innych diagnostycznych testów laboratoryjnych. Z tego względu nie należy inicjować żadnych działań terapeutycznych wyłącznie na podstawie wyniku uzyskanego metodą FISH.

Nieprzestrzeganie protokołu może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.

Ten zestaw nie został zatwierdzony do stosowania w celach innych niż określone w części dotyczącej przeznaczenia.

Przeznaczenie

Produkt CytoCell AML1 (RUNX1) Breakapart Probe to jakościowy, nieautomatyzowany test wykonywany metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) przeznaczony do detekcji chromosomowych rearanżacji w regionie 21q22.1 chromosomu 21. w utrwalonych w roztworze Carnoya (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1) zawiesinach komórek pochodzenia hematologicznego pobranych od pacjentów z rozpoznaniem lub podejrzeniem ostrej białaczki szpikowej (Acute Myeloid Leukaemia, AML) lub ostrej białaczki limfoblastycznej (Acute Lymphoblastic Leukaemia, ALL).

Wskazania

Ten produkt zaprojektowano jako produkt uzupełniający inne testy kliniczne i histopatologiczne wykonywane w ramach przyjętych ścieżek diagnostycznych i opieki klinicznej, w przypadku których znajomość statusu rearanżacji genu *AML1* (*RUNX1*) w istotny sposób wpływałaby na postępowanie kliniczne.

Zasady działania testu

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują do całych chromosomów lub pojedynczych unikalnych sekwencji, i stanowi istotne uzupełnienie cytogenetycznej analizy prążków G. Technika ta może być obecnie wykorzystywana jako kluczowe narzędzie diagnostyczne w

chromosomalnych analizach prenatalnych, hematologicznych i guzów litych. Docelową sekwencją DNA, po utrwaleniu i denaturacji, staje się dostępna do przyłączenia do zdenaturowanej w podobny sposób, fluorescencyjnie wyznakowanej sondy DNA o sekwencji komplementarnej. Po hybrydyzacji niezwiązane i nieswoicie związane sondy DNA są usuwane, a DNA jest barwiony kontrastowo w celu jego uwidocznienia. Sondy zhybrydyzowane do materiału docelowego można obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Informacje o sondzie

Gen *RUNX1* (*RUNX family transcription factor 1*) zlokalizowany w regionie 21q22.1 jest jednym z najczęstszych celów rearanżacji chromosomowych obserwowanych w ludzkich ostrych białaczkach.

Do najczęściej występujących rearanżacji należą fuzje ETV6-RUNX1 i RUNX1-RUNX1T1. Fuzja ETV6-RUNX1 powstaje w wyniku translokacji t(12;21)(p13;q22) wykrywanej w około 21% przypadków ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) z komórek B u dzieci¹, natomiast fuzja RUNX1-RUNX1T1 powstaje w wyniku translokacji t(8;21)(q22;q22) wykrywanej u 10–22% pacjentów chorych na ostrą białaczkę szpikową (AML) typu M2 według klasyfikacji francusko-amerykańsko-brytyjskiej (FAB) oraz w 5–10% przypadków AML ogółem^{2,3}. Obie te rearanżacje są uważane za dobre wskaźniki prognostyczne w tych chorobach^{4,5}.

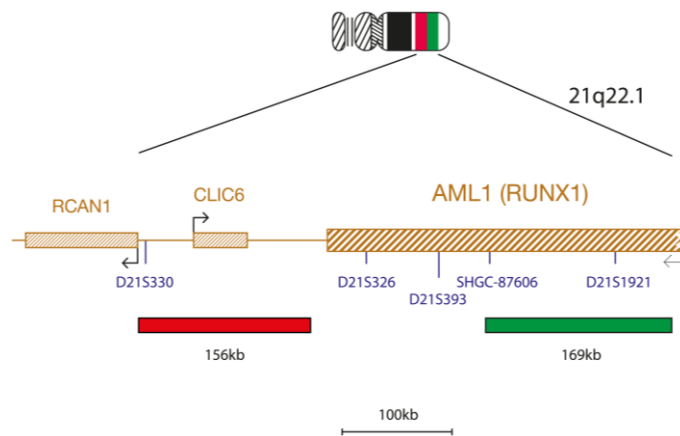
Gen *RUNX1* ulega również rearanżacji w wielu innych, rzadziej występujących translokacjach, przy czym partnerzy tego genu znajdują się na chromosomach 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 9., 10., 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20. i chromosomie X⁶. Konstrukt sondy Breakapart Probe umożliwia wykrycie rearanżacji niezależnie od partnera genowego biorącego w niej udział.

Rearanżacje genu *RUNX1* nie są ograniczone do translokacji. Z użyciem techniki FISH stwierdzono również amplifikacje chromosomu 21. (*iAMP21*), w tym genu *RUNX1*, u dzieci z ALL^{7,8}. Amplifikacje te powiązane z gorszym wynikiem leczenia⁹.

Specyfikacja sondy

AML1, 21q22.1, kolor czerwony

AML1, 21q22.1, kolor zielony



Mieszanka sond AML1 zawiera sondę o długości 156 kZ, wyznakowaną czerwonym fluoroforem, zlokalizowaną centromerycznie względem genu *AML1* (*RUNX1*) i obejmującą gen *CLIC6*, oraz sondę o długości 169 kZ, wyznakowaną zielonym fluoroforem, obejmującą część genu *AML1* (*RUNX1*), w tym markery *SHGC-87606* i *D21S1921*.

Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)

Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydyzacyjnym (formamid; siarczan dekantranu; roztwór soli fizjologicznej i cytrynianu sodu (SSC)) i są gotowe do użycia.

Barwnik kontrastowy: 150 µl na fiolkę (15 testów)

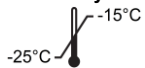
Barwnikiem kontrastowym jest odczynnik DAPI antyfade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol)).

Ostrzeżenia i środki ostrożności

1. Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego.
2. Podczas pracy z sondami DNA i barwnikiem kontrastowym DAPI należy nosić rękawiczki.
3. Mieszanie sond zawierających formamid, który wykazuje działanie teratogenne; nie wdychać oparów i nie dopuszczać do kontaktu ze skórą. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny.
4. DAPI jest potencjalnym czynnikiem rakotwórczym. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny.
5. Wszystkie materiały stwarzające zagrożenie należy wyrzucać zgodnie z wytycznymi placówki dotyczącymi usuwania odpadów stwarzających zagrożenie.
6. Operatorzy muszą być w stanie rozróżniać czerwony, niebieski i zielony kolor.
7. Nieprzestrzeganie wskazanego protokołu oraz nieużywanie właściwych odczynników może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.
8. Nie należy rozcieńczać sondy ani mieszać jej z innymi sondami.

9. Niezastosowanie 10 µl sondy podczas fazy denaturacji wstępnej wykonywanej w ramach protokołu może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.

Przechowywanie i postępowanie z produktem



Zestaw należy przechowywać w zamrażarce w temperaturze od -25°C do -15°C do daty ważności wskazanej na etykiecie zestawu. Fiolki z sondami i barwnikiem kontrastowym należy przechowywać w ciemności.



Sonda zachowuje stabilność przez wszystkie cykle zamrażania i rozmrażania wykonywane podczas standardowego użytkowania produktu (jeden cykl jest definiowany jako wyjęcie sondy z zamrażarki i ponowne umieszczenie jej w zamrażarce) i zachowuje fotostabilność przez maksymalnie 48 godzin ciągłej ekspozycji na światło. Należy dołożyć wszelkich starań, aby ograniczyć ekspozycję produktów na światło i zmiany temperatury.

Sprzęt i materiały wymagane, ale niedostarczane

Należy używać następującego skalibrowanego sprzętu:

1. Płyta grzewcza (ze stabilną płytą i możliwością dokładnej kontroli temperatury do 80°C)
2. Skalibrowane mikropipety i końcówki umożliwiające przenoszenie różnych objętości cieczy w zakresie 1–200 µl
3. Łażnia wodna z możliwością dokładnej kontroli temperatury na poziomie 37°C i 72°C
4. Probówki mikrowirówkowe (0,5 ml)
5. Mikroskop fluorescencyjny (patrz część „Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego”)
6. Mikroskop z kontrastem fazowym
7. Czyste barwiacze Coplina z tworzywa sztucznego, ceramiki lub szkła żaroodpornego
8. Szczypczyki
9. Skalibrowany pH-metr (lub papierki wskaźnikowe pH umożliwiające pomiar pH w zakresie 6,5–8,0)
10. Pojemnik zapewniający dużą wilgotność powietrza
11. Olejek imersyjny odpowiedni do obiektów mikroskopowych klasy fluorescencyjnej
12. Wirówka laboratoryjna
13. Szkiełka mikroskopowe
14. Szkiełka nakrywkowe o wymiarach 24x24 mm
15. Stoper
16. Inkubator nastawiony na temperaturę 37°C
17. Klej kauczukowy
18. Wytrząsarka
19. Cylindry miarowe
20. Mieszadło magnetyczne
21. Skalibrowany termometr

Opcjonalny sprzęt niedostarczany

1. Komora do suszenia próbek do badań cytogenetycznych

Odczynniki wymagane, ale niedostarczane

1. Roztwór soli fizjologicznej i cytrynianu sodu (SSC), 20x
2. Etanol, 100%
3. Tween-20
4. Wodorotlenek sodu (NaOH), 1 M
5. Kwas solny (HCl), 1 M
6. Woda oczyszczona

Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego

W celu optymalnej wizualizacji sondy zalecane jest używanie 100-watowej lampy rtęciowej lub równoważnej lampy i obiektów planapochromatycznych umożliwiających stosowanie olejku imersyjnego przy powiększeniu 60/63x lub 100x. Fluorofory użyte w tym zestawie sond charakteryzują się następującymi długościami fal wzbudzenia i emisji:

Fluorofor	Wzbudzenie _{maks.} [nm]	Emisja _{maks.} [nm]
Zielony	495	521
Czerwony	596	615

Należy upewnić się, że w mikroskopie zamontowane są odpowiednie filtry wzbudzenia i emisji, które obejmują wymienione powyżej długości fal. Do jednoczesnej obserwacji zielonych i czerwonych fluoroforów optymalnie nadaje się potrójny filtr pasmowo-przepustowy dla barwnika DAPI/widma zielonego/widma czerwonego lub podwójny filtr pasmowo-przepustowy dla widma zielonego/widma czerwonego.

Przed użyciem mikroskopu fluorescencyjnego należy sprawdzić, czy działa on prawidłowo. Należy stosować olejek imersyjny odpowiedni do mikroskopii fluorescencyjnej o składzie odpowiednim do niskiej autofluorescencji. Należy unikać mieszanina barwnika DAPI antyfade z mikroskopowym olejkiem imersyjnym, ponieważ spowoduje to zaciemnienie sygnałów. Należy przestrzegać zaleceń wytwórcy dotyczących okresu żywotności lampy i wieku filtrów.

Przygotowanie próbkki

Zestaw zaprojektowano do użytku na utrwalonych w roztworze Carnoya (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1) zawiesinach komórek pochodzenia hematologicznego. Komórki należy przygotować zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w laboratorium lub placówce. Należy przygotować próbki suszone na powietrzu na szkiełkach mikroskopowych zgodnie ze standardowymi

procedurami cytogenetycznymi. Podręcznik AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* zawiera zalecenia dotyczące pobierania próbek, prowadzenia hodowli komórek, zbierania komórek z hodowli oraz przygotowywania preparatów¹⁰.

Przygotowanie roztworów

Roztwory etanolu

Rozcieńczyć 100-procentowy etanol wodą oczyszczoną w określonych poniżej proporcjach i dokładnie wymieszać.

- 70-procentowy etanol — dodać 7 części 100-procentowego etanolu do 3 części wody oczyszczonej
- 85-procentowy etanol — dodać 8,5 części 100-procentowego etanolu do 1,5 części wody oczyszczonej

Przechowywać roztwory przez maksymalnie 6 miesięcy w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

2x stężony roztwór SSC

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 9 częściami wody oczyszczonej; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

0,4x stężony roztwór SSC

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 49 częściami wody oczyszczonej; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

2x stężony roztwór SSC ze środkiem Tween-20 w stężeniu 0,05%

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 9 częściami wody oczyszczonej. Dodać 5 µl środka Tween-20 na 10 ml roztworu; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

Protokół FISH

(Uwaga: Należy możliwie ograniczać ekspozycję sondy i barwnika kontrastowego na światło w laboratorium).

Przygotowanie szkiełek

1. Wkropić próbkę komórek na szkiełko mikroskopowe. Pozostawić do wyschnięcia. (Opcjonalnie, w przypadku korzystania z komory do suszenia próbek do badań cytogenetycznych: próbki należy nanieść przy użyciu komory do suszenia próbek do badań cytogenetycznych. Komora powinna mieć temperaturę około 25°C i zapewniać wilgotność 50%, aby umożliwić optymalne naniesienie próbki komórek. Jeśli komora do suszenia próbek do badań cytogenetycznych nie jest dostępna, należy pozostawić próbki pod wyciągiem).
2. Zanurzyć szkiełko w 2x stężonym roztworze SSC w temperaturze pokojowej na 2 minuty; nie wstrząsać.
3. Odwodnić próbkę, korzystając z szeregu alkoholowego (etanol w stężeniu 70%, 85% i 100%); zanurzać szkiełko w każdym roztworze alkoholu na 2 minuty w temperaturze pokojowej.
4. Pozostawić do wyschnięcia.

Denaturacja wstępna

5. Wyjąć roztwór sond z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej. Przed użyciem roztworu należy krótko odwirować probówki.
6. Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
7. Pobrać 10 µl roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość do probówki mikrowirówkowej. Bezwzględnie włożyć pozostały roztwór do powrotem do zamrażarki.
8. Umieścić roztwór sond i szkiełko z próbką na płycie grzewczej o temperaturze 37°C (+/-1°C) na 5 minut w celu ich wstępnego ogrzania.
9. Wkropić 10 µl mieszaniny sond na próbkę komórek i ostrożnie nanieść szkiełko nakrywkowe. Zakleić szkiełko klejem kauczukowym i poczekać na jego całkowite wyschnięcie.

Denaturacja

10. Denaturować jednocześnie próbkę i mieszaninę sond, ogrzewając szkiełko na płycie grzewczej o temperaturze 75°C (+/-1°C) przez 2 minuty.

Hybrydyzacja

11. Umieścić szkiełko w wilgotnym, światłoszczelnym pojemniku w temperaturze 37°C (+/-1°C) na noc.

Płukania po hybrydyzacji

12. Wyjąć barwnik DAPI z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej.
13. Ostrożnie zdjąć szkiełko nakrywkowe i usunąć wszelkie pozostałości kleju.
14. Zanurzyć szkiełko w 0,4x stężonym roztworze SSC (pH 7,0) w temperaturze 72°C (+/-1°C) na 2 minuty; nie wstrząsać.
15. Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie zanurzyć je w 2x stężonym roztworze SSC ze środkiem Tween-20 w stężeniu 0,05% (pH 7,0) w temperaturze pokojowej na 30 sekund; nie wstrząsać.
16. Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie nanieść 10 µl barwnika DAPI antyfade na każdą próbkę.
17. Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić rozwój barw.
18. Obejrzeć pod mikroskopem fluorescencyjnym. (Patrz **Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego**).

Stabilność wykonanych preparatów

Preparaty poddane procedurze nadają się do analizy przez maksymalnie 1 miesiąc, o ile są przechowywane w ciemności w temperaturze pokojowej lub niższej.

Zalecenia dotyczące procedury

1. Wypiekanie lub postarzanie preparatów może zmniejszyć fluorescencję sygnału.
2. Stosowanie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę Cytocell Ltd może mieć negatywny wpływ na warunki hybrydyzacji.
3. Do pomiaru temperatury roztworów, łaźni wodnych i inkubatorów należy używać skalibrowanego termometru, ponieważ temperatury te są kluczowe dla optymalnego działania produktu.
4. Stężenia, wartości pH i temperatury roztworów wykorzystywanych do płukania są istotne, gdyż mało surowe warunki mogą doprowadzić do nieswoistego wiązania sondy, a zbyt surowe warunki mogą spowodować brak sygnału.
5. Niecałkowita denaturacja może spowodować brak sygnału, a nadmierna denaturacja może również doprowadzić do nieswoistego wiązania.
6. Nadmierna hybrydyzacja może spowodować otrzymanie dodatkowych lub nieoczekiwanych sygnałów.
7. Przed użyciem testu do celów diagnostycznych użytkownicy powinni zoptymalizować protokół dla własnych próbek.
8. Suboptymalne warunki mogą prowadzić do nieswoistego wiązania sond, które może zostać błędnie zinterpretowane jako sygnał sondy.

Interpretacja wyników

Ocena jakości preparatów

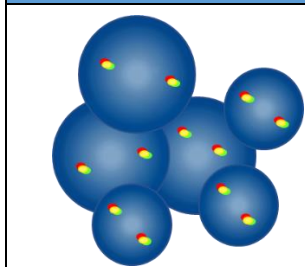
Preparatu nie należy oceniać w następujących przypadkach:

- Sygnały są zbyt słabe, aby można było analizować je w pojedynczych filtrach — do analizy można przystąpić jedynie, jeśli sygnały są jasne, wyraźne i łatwe do oceny.
- Widoczna jest duża liczba zlepionych/nakładających się na siebie komórek, co utrudnia analizę.
- W >50% komórek nie doszło do hybrydyzacji.
- Pomiedzy komórkami znajdują się liczne cząstki fluorescencyjne i/lub widoczne jest „zamglenie” fluorescencyjne, które zakłóca sygnały — w przypadku preparatów optymalnych do oceny tło powinno być ciemne lub czarne i klarowne.
- Nie można rozróżnić granic jądra komórkowego lub są one nieciągłe.

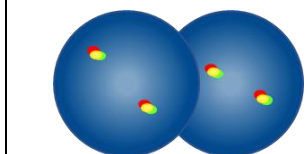
Wytyczne dotyczące analizy

- Każda próbka powinna być analizowana i interpretowana przez dwóch analityków. Wszelkie rozbieżności powinny zostać rozwiązane w wyniku oceny dokonanej przez trzeciego analityka.
- Każdy analityk powinien posiadać odpowiednie kwalifikacje zgodne z normami krajowymi.
- Każdy analityk powinien dokonać niezależnej oceny 100 jąder dla każdej próbki. Pierwszy analityk powinien rozpocząć analizę od lewej strony preparatu, a drugi od prawej strony preparatu.
- Każdy analityk powinien zapisać własne wyniki w odrębnym arkuszu.
- Należy analizować wyłącznie nienaruszone jądra, nie wolno analizować jąder nakładających się na siebie, zlepionych, pokrytych resztkami cytoplazmy ani jąder wykazujących wysoki stopień autofluorescencji.
- Należy unikać obszarów, w których występuje nadmierna ilość resztek cytoplazmy lub nieswoista hybrydyzacja.
- Intensywność sygnału może się różnić nawet w obrębie jednego jądra. W takich przypadkach należy użyć filtrów pojedynczych i/lub wyregulować płaszczyznę ogniskowania.
- W warunkach suboptymalnych sygnały mogą wyglądać na rozlane. Jeśli dwa sygnały o tym samym kolorze stykają się ze sobą, odległość między nimi jest nie większa niż dwie szerokości sygnału lub istnieje cienkie pasmo łączące oba sygnały, należy zliczać je jako jeden sygnał.
- Dotyczy analizy wyników uzyskanych za pomocą dwukolorowych sond wykrywających miejsca złamań: jeśli pomiędzy sygnałem czerwonym a zielonym występuje przerwa nieprzekraczająca dwóch szerokości sygnału, sygnał należy zliczyć jako brak rearanżacji/sygnał fuzyjny
- W przypadku wątpliwości, czy komórka nadaje się do analizy, nie należy jej analizować.

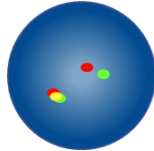
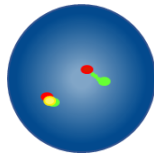
Wytyczne dotyczące analizy



Nie zliczać — jądra są za blisko siebie, aby można było określić ich granice

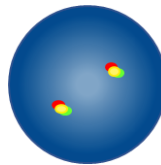


Nie zliczać jąder nakładających się na siebie — nie są widoczne całe obszary obu jąder

	Zliczyć jako dwa sygnały fuzyjne — przerwa widoczna między czerwonym a zielonym sygnałem jest mniejsza niż dwie szerokości sygnału
	Zliczyć jako dwa sygnały fuzyjne — jeden sygnał fuzyjny jest rozlany

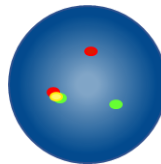
Wyniki oczekiwane

Oczekiwany wzorec sygnału wskazujący na stan prawidłowy



W komórce prawidłowej oczekiwane są dwa sygnały fuzyjne (czerwony/zielony, 2F).

Oczekiwany wzorec sygnału wskazujący na stan nieprawidłowy



Oczekiwany wzorec sygnału w komórce ze zrównoważoną rearanżacją genu *AML1 (RUNX1)* to jeden sygnał czerwony, jeden sygnał zielony i jeden sygnał fuzyjny (1C, 1Z, 1F).

W przypadku próbek aneuploidalnych/z rearanżacją niezrównoważoną mogą wystąpić inne wzorce sygnału.

Znana reaktywność krzyżowa

Brak znanej reaktywności krzyżowej.

Zgłaszanie zdarzeń niepożądanych

W przypadku podejrzenia nieprawidłowego działania tego wyrobu lub pogorszenia jego właściwości użytkowych, które mogło przyczynić się do wystąpienia zdarzenia niepożądanego (np. opóźnienia diagnozy lub postawienia błędnej diagnozy, opóźnienia leczenia lub podjęcia niewłaściwego leczenia), należy bezzwłocznie zgłosić ten fakt wytwórcy (**e-mail**: vigilance@ogt.com).

Jeśli ma to zastosowanie, zdarzenie należy zgłosić także właściwemu organowi krajowemu. Wykaz punktów kontaktowych ds. nadzoru nad produktami (ang. vigilance) jest dostępny na stronie: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Specyficzne parametry skuteczności

Swoistość analityczna

Swoistość analityczna to odsetek sygnałów, które hybrydują do właściwego locus i nie hybrydują do żadnej innej lokalizacji. Swoistość analityczną ustalono poprzez analizę łącznie 200 loci docelowych. Swoistość analityczną obliczono jako liczbę sygnałów FISH zhybrydowanych do prawidłowego locus podzieloną przez całkowitą liczbę zhybrydowanych sygnałów FISH.

Tabela 1. Swoistość analityczna dla produktu AML1 Breakapart Probe

Sonda	Locus docelowe	L. sygnałów zhybrydowanych do prawidłowego locus	Łączna liczba zhybrydowanych sygnałów	Swoistość (%)
Czerwony AML1	21q22	200	200	100
Zielony AML1	21q22	200	200	100

Czułość analityczna

Czułość analityczna to odsetek komórek interfazowych nadających się do oceny z oczekiwanym wzorcem sygnału wskazującym na stan prawidłowy. Czułość analityczną ustalono poprzez analizę komórek interfazowych w różnych próbkach prawidłowych. Czułość obliczono jako odsetek komórek nadających się do oceny, w których zaobserwowano oczekiwany wzorec sygnału (z 95-procentowym przedziałem ufności).

Tabela 2. Czulość analityczna dla produktu AML1 Breakapart Probe

L. komórek z oczekiwanym wzorcem sygnału	L. komórek z sygnałami nadającymi się do oceny	Czulość (%)	95-procentowy przedział ufności
4974	5000	99,48	99,24–99,64

Charakterystyka wartości odcięcia dla stanu prawidłowego

Wartość odcięcia dla stanu prawidłowego, określana w odniesieniu do sond FISH, to maksymalny odsetek komórek interfazowych nadających się do oceny, dla których obserwowany jest określony wzorzec sygnału charakterystyczny dla stanu nieprawidłowego, przy którym próbka jest uznawana za prawidłową pod względem tego wzorca sygnału.

Wartość odcięcia dla stanu prawidłowego ustalono przy użyciu próbek ujemnych pod względem rearanżacji, do której wykrywania przeznaczona jest sonda, oraz funkcji odwrotności beta. Dla każdej próbki dwóch niezależnych analityków rejestrowało wzorce sygnałów 100 jąder interfazowych, co dało łącznie 200 przeanalizowanych jąder na próbkę.

Tabela 3. Charakterystyka wartości odcięcia dla stanu prawidłowego dla produktu AML1 Breakapart Probe

Wzorzec sygnału wskazujący na stan nieprawidłowy	Liczba próbek przeanalizowanych w celu ustalenia wartości odcięcia	Liczba jąder ocenianych na próbkę	Maks. l. fałszywie dodatnich wzorców sygnału	Wartość odcięcia dla stanu prawidłowego (%)
1C, 1Z, 1F	25	200	2	3,5

Laboratoria muszą zweryfikować wartości odcięcia w oparciu o własne dane^{11, 12}.

Precyzja i odtwarzalność

Odtwarzalność ustalono na podstawie danych otrzymanych z trzech odrębnych laboratoriów, w których wykonywano testy na sześciu zaślepionych próbkach (dwie próbki ujemne względem rearanżacji, dwie próbki nisko dodatnie, dla których odsetek komórek dodatnich był od 1 do 3 razy większy od wartości odcięcia, i dwie próbki wysoko dodatnie, które zawierały ponad 45% komórek dodatnich względem rearanżacji). Analizy prowadzono w ciągu pięciu nienastępujących po sobie dni, wykonując po dwa powtórzenia dla każdej próbki.

We wszystkich trzech ośrodkach przeprowadzono badania odtwarzalności wyników w ramach dnia, między dniami i między ośrodkami przy użyciu tej samej serii sond, a w jednym z ośrodków przeprowadzono również badanie odtwarzalności wyników między seriami z użyciem trzech różnych serii sond.

Odtwarzalność obliczono na podstawie zgodności między zmiennymi ocenianymi w każdym z badań.

Tabela 4. Odtwarzalność i precyzja dla produktu AML1 Breakapart Probe

Badanie odtwarzalności	Próbka	Zgodność (%)
W ramach dnia / między dniami / między ośrodkami	Ujemna	100
	Wysoko dodatnia	100
Między seriami	Ujemna	100
	Wysoko dodatnia	100

Skuteczność kliniczna

Skuteczność kliniczną ustalono przy użyciu reprezentatywnego zestawu 100 kolejnych próbek pobranych od pacjentów skierowanych na badania pod kątem AML lub MDS. Częstości występowania rearanżacji wykrywanych przez sondę porównano z danymi zebranymi na podstawie przeglądu źródeł literaturowych.

Aby umożliwić to porównanie, obliczono wskazany w źródłach literaturowych przedział ufności w populacji o liczebności 100 próbek poprzez obliczenie testu proporcji dla 1 próby z poprawką na ciągłość.

Tabela 5. Skuteczność kliniczna dla produktu AML1 Breakapart Probe

Rearanżacja	Częstość występowania			
	Przegląd literatury (%)	95% LCI (%)	Badanie kliniczne (%)	95% UCL (%)
AML z rearanżacjami genu RUNX1	3,8	1,2	2	10,2

Dodatkowe informacje

W celu uzyskania dodatkowych informacji na temat produktu należy skontaktować się z działem wsparcia technicznego firmy CytoCell.

Tel.: +44 (0)1223 294048

E-mail: techsupport@cytoCELL.com

Strona WWW: www.ogt.com

Piśmiennictwo

- Jamil A *et al.*, Cancer Genet Cytogenet 2000;122(2):73-8
- Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
- Reikvam H, *et al.*, J Biomed Biotechnol. 2011; 2011:104631.

- Shurtleff *et al.*, Leukemia. 1995 Dec;9(12):1985-9
- Cho *et al.*, Korean J Intern Med. 2003 Mar;18(1):13-20
- De Braekeleer *et al.*, Anticancer Research 2009;29(4):1031-1038
- Niini T, Haematologica 2000;85(4):362-6
- Harewood *et al.*, Leukemia. 2003 Mar;17(3):547-53
- Robinson HM *et al.*, Leukemia 2003;17(11):2249-50
- Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. Genet Med. 2011;13(7):667-675.
- Wiktor AE, Dyke DLV, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16–23.

Objaśnienie symboli

	pl: Numer katalogowy
	pl: Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>
	pl: Kod partii
	pl: Zajrzyj do instrukcji używania
	pl: Wytwórca
	pl: Użyć do daty
	pl: Dopuszczalna temperatura
	pl: Trzymać z dala od światła słonecznego
	pl: Zawartość wystarczająca do <n> testów
	pl: Zawartość

Patenty i znaki towarowe

CytoCell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy CytoCELL Ltd.

CytoCELL Ltd.
Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, UK
Tel.: +44(0)1223 294048
Faks.: +44(0)1223 294986
E-mail: probes@cytoCELL.com
Strona WWW: www.ogt.com

