A Sysmex Group Company

CytoCell

Lietošanas instrukcija

REF: LPH 038-S/LPH 038

Zonde BCR/ABL (ABL1) Plus Translocation, Dual Fusion Probe

CE IVD

TIKAI PROFESIONĀLAM LIETOJUMAM

www.cytocell.com

Papildinformācija un informācija citās valodās ir pieejama vietnē www.ogt.com

Ierobežojumi

Šī ierīce ir paredzēta pārkārtojumu ar pārtraukumpunktiem noteikšanai reģionā, ko nosedz sarkanie un zaļie kloni šajā zonžu komplektā, vai delēciju noteikšanai reģionā, ko nosedz zilie kloni šajā zonžu komplektā, kurā ietilpst *ABL*, *BCR* un *ASS1* reģioni. Izmantojot šo produktu, var netikt noteikti pārtraukumpunkti ārpus šī reģiona, pārkārtojumu varianti, kas pilnībā ietilpst šajā reģionā, vai daļēji šī reģiona zudumi.
Šis tests nav paredzēts: izmantošanai autonoma diagnostikas līdzekļa statusā, prenatālai testēšanai, konkrētu populāciju skrīningam, testēšanai ārpus laboratorijas un paštestēšanai. Šis produkts ir paredzēts tikai profesionālai lietošanai laboratorijās; visu rezultātu interpretēšana jāveic atbilstoši kvalificētiem darbiniekiem, ņemot vērā citu attiecināmo testu rezultātus.
Šis produkts nav apstiprināts lietošanai tādu tipu paraugiem vai slimībām, kas nav norādīti informācijā par paredzēto lietojumu.
Ziņošana par luminiscentās in situ hibridizācijas rezultātiem un to interpretēšana ir jāveic atbilstoši profesionālajiem prakses standartiem un ir jāņem vērā cita klīniskā un diagnostikas informācija. Šis komplekts ir paredzēts kā citu diagnostisko laboratorijas testu palīglīdzeklis, un lēmumus par terapiju nedrīkst pieņemt, vadoties tikai pēc luminiscentās in situ hibridizācijas rezultātiem.
Neievērojot attiecīgo protokolu, var tikt ietekmēta veikstpēja un iegūti kļūdaini pozitīvi vai kļūdaini negatīvi rezultāti.
Šis komplekts nav apstiprināts izmantošanai nolūkiem, kas neatbilst norādītajam paredzētajam lietojumam.

Paredzētais lietojums

Zonde CytoCell BCR/ABL (ABL1) Translocation, Dual Fusion Probe ir kvalitatīvs, neautomatizēts luminiscentās *in situ* hibridizācijas (fluorescence in situ hybridisation — FISH) tests, kas paredzēts hromosomālo pārkārtojumu noteikšanai starp 9. hromosomas reģionu 9q34.1 un 22. hromosomas reģionu 22q11 Karnuā šķīdumā (3:1 metanols/etiķskābe) fiksētās hematoloģiski iegūtās šūnu suspensijās no pacientiem, kuriem ir konstatēta hroniska mieloīda leikēmija (HML), akūta mieloīda leikēmija (AML) vai akūta limfoblastiskā leikēmija (ALL) vai arī pastāv aizdomas par tās esamību.

Indikācijas

Šis produkts ir paredzēts kā citu klīnisko un histopatoloģisko testu papildinājums atzītās diagnostikas un klīniskās aprūpes metodēs, kad informācija par *BCR-ABL1* translokācijas statusu ir svarīga klīniskajai pārvaldībai.

Testa principi

Luminiscentā *in situ* hibridizācija (fluorescence in situ hybridisation — FISH) ir metode, kas ļauj noteikt DNS sekvences metafāžu hromosomās vai interfāzes kodolos fiksētiem citoģenētiskiem paraugiem. Šajā metodē tiek izmantotas DNS zondes, kas hibridizējas ar veselām hromosomām vai atsevišķām unikālām sekvencēm un kalpo kā efektīvs G joslu citoģenētiskās analīzes palīglīdzeklis. Šo metodi tagad var lietot kā būtisku izmeklēšanas instrumentu prenatālajā, hematoloģiskajā un solīdu audzēju hromosomālajā analīzē. Mērķa DNS pēc fiksācijas un denaturēšanas ir pieejama hibridizācijai ar līdzīgi denaturētu, luminiscējoši marķētu DNS zondi, kurai ir papildu sekvence. Pēc hibridizācijas nesaistītā un nespecifiski saistītā DNA zonde tiek aizvākta un DNS tiek kontrastēta vizualizācijai. Pēc tam, izmantojot luminiscences mikroskopiju, hibridizēto zondi var vizualizēt mērķa materiālā.

Informācija par zondi

BCR (*RhoGEF un GTPase BCR aktivators*) gēna atrašanās vieta ir 22q11.23, ABL1 (*ABL protoonkogēns 1, nereceptoru tirozīnkināze*) gēna atrašanās vieta ir 9q34.12 un ASS1 (*1. arginīna-sukcināta sintāzes*) gēna atrašanās vieta ir 9q34.11. Translokācija starp BCR un ABL1 ir BCR-ABL1 fūzijas gēna pamatā un rada Filadelfijas hromosomu — redzamu šīs translokācijas rezultātu.

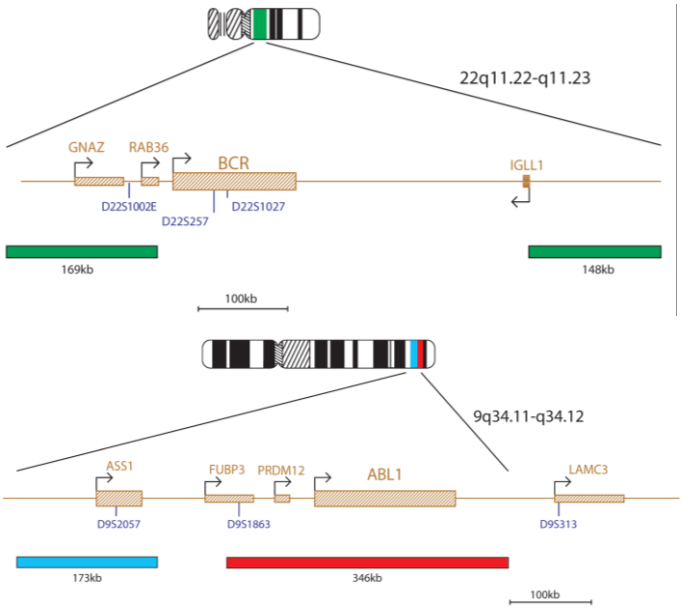
BCR-ABL1 fūzijas klātbūtne ir nozīmīga diagnožu un prognožu noteikšanā dažādu hematoloģisko traucējumu gadījumā.

Jānorāda, ka t(9;22)(q34.12;q11.23) translokācija ir raksturīga hroniskas mieloīdās leikēmijas (HML) iezīme un ir konstatējama 90–95% gadījumu[1]. Atlikušajos gadījumos pastāv variantu translokācija vai kriptiska translokācija starp reģionu 9q34.12 un 22q11.23, kuru nevar identificēt, izmantojot parasto citoģenētisko analīzi[1]. BCR-ABL1 fūzijas arī ir konstatējamas 25% akūtas limfoblastiskās leikēmijas (ALL) gadījumu pieaugušiem pacientiem un 2–4% ALL gadījumu pediatriskajiem pacientiem[1]. Šis pārkārtojums arī ir konstatējams retos akūtas mieloīdās leikēmijas (AML) gadījumos[2].

Vienlaikus ar translokāciju starp 9. un 22. hromosomu ir iespējams proksimālo sekvenču zudums 9. derivatīvajā hromosomā, tostarp ASS1(*1. arginīna-sukcināta sintāzes*) reģionā[3]. Vienlaicīgas ASS1 gēna delēcijas ir saistītas ar nelabvēlīgāku CML iznākuma prognozi, bet to iedarbību iespējams daļēji kompensēt ar tirozīnkināzes inhibitoru (TKI) terapiju[4]; līdz ar to atipisku modeļu noteikšana pacientiem ar BCR-ABL1 translokāciju var būt nozīmīga klīniskajā diagnostikā un prognozes noteikšanā.

Zondes specifikācija

ABL1, 9q34.11-q34.12, sarkana
BCR, 22q11.22-q11.23, zaļa
ASS1, 9q34.11-q34.12, zila



BCR/ABL1 zondes maisījumā ietilpst 169kb zaļā zonde, kas ir centromēriska BCR gēnam un ietver gēnus GNAZ un RAB36. Otra zaļā zonde nosedz 148kb reģionu, kas atrodas telomēriski attiecībā pret BCR gēnu un nosedz daļu IGLL1 gēna. Sarkana zonde nosedz 346kb reģionu, kurā ietverts gēns ABL1. Ir arī papildu zilā zonde, kas nosedz reģionu 173kb un aptver visu gēnu ASS1.

Nodrošinātie materiāli

Zonde: 50 µl flakonā (5 testi) vai 100 µl flakonā (10 testi)
Zondes tiek nodrošinātas iepriekš sajauktā veidā hibridizācijas šķīdumā (formamīds; dekstrāna sulfāts; citrāta fizioloģiskais šķīdums (saline-sodium citrate — SSC)) un ir gatavas lietošanai.

Kontrasta krāsviela: 150 µl flakonā (15 testi)
Kontrasta krāsviela ir DAPI luminiscences uzturēšanas šķīdums (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindols)).

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

1. Paredzēts lietošanai *in vitro* diagnostikā. Tikai profesionālai lietošanai.
2. Apejoties ar DNS zondēm un DAPI kontrasta krāsvielu, valkājiet cimdus.
3. Zondes maisījumos ietilpst formamīds, kas ir teratogēns, tādēļ nedrīkst pieļaut to izgarojumu ieelpošanu un nonākšanu saskarē ar ādu. Valkājiet cimdus, laboratorijas virsvalku un apiešanās laikā izmantojiet gāzu nosūcēju. Atbrīvojoties no šī produkta, noskalojiet to ar lielu daudzumu ūdens.
4. DAPI ir potenciāli kancerogēna viela. Rīkojieties ar to piesardzīgi; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku. Atbrīvojoties no šī produkta, noskalojiet to ar lielu daudzumu ūdens.
5. Atbrīvojieties no visām bīstamajām vielām atbilstoši jūsu iestādē spēkā esošajām vadlīnijām attiecībā uz bīstamu atkritumu utilizāciju.
6. Operatoriem jāspēj atšķirt sarkano, zilo un zaļo krāsu.

7. Neievērojot norādīto protokolu un norādījumus par reaģentiem, var tikt ietekmēta veiktspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi vai kļūdaini negatīvi rezultāti.
8. Zondi nedrīkst atšķaidīt vai veidot maisījumus ar citām zondēm.
9. Ja protokola priekšdenaturēšanas fāzes laikā netiek izmantoti 10 µl zondes, var tikt ietekmēta veiktspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi vai kļūdaini negatīvi rezultāti.

Uzglabāšana un apiešanās

Komplekts ir jāglabā saldētavā, temperatūras diapazonā no -25 ºC līdz -15 ºC, līdz pat derīguma termiņa beigu datumam, kas norādīts uz komplekta marķējuma. Zondes un kontrasta krāsvielas flakoni ir jāuzglabā tumsā.

Zonde paliek stabila normālas lietošanas gaitā notiekošajos sasaldēšanas/atkausēšanas ciklos (vienu cikluveido zondes izņemšana no saldētavas un ievietošana atpakaļ saldētavā) un ir fotostabila līdz pat 48 stundām pēc nonākšanas pastāvīgā apgaismojumā. Ir jāveic viss iespējamais, lai ierobežotu gaismas un temperatūras svārstību ietekmi.

Aprīkojums un materiāli, kas ir nepieciešami, bet nav iekļauti komplektācijā
Ir jāizmanto kalibrēts aprīkojums.
1. Sildierīce (ar cietu sildvirsmu un precīzu temperatūras regulēšanu līdz pat 80 ºC)
2. Kalibrētas dažāda tilpuma mikropipetes un uzgaļi 1–200 µl diapazonā.
3. Ūdens vanna ar precīzu temperatūras regulēšanu — 37 ºC un 72 ºC
4. Mikrocentrifūgas mēģenes (0,5 ml)
5. Luminiscences mikroskops (sk. sadaļu Ieteikumi attiecībā uz luminiscences mikroskopu)
6. Fāžu kontrasta mikroskops
7. Tīri plastmasas, keramikas vai karstumizturīga stikla Koplina trauki
8. Pincete
9. Kalibrēta pH mērierīce (vai pH indikatora strēmeles, ar kurām var veikt mērījumus pH 6,5–8,0 diapazonā)
10. Konteiners ar mitru vidi
11. Luminiscencei atbilstoša mikroskopa objektīva iegremdēšanas eļļa
12. Galda centrifūga
13. Mikroskopa priekšmetstikliņi
14. 24x24 mm segstikliņi
15. Taimeris
16. 37 ºC inkubators
17. Gumijas līme
18. Virpuļmaisītājs
19. Mērcilindri
20. Magnētiskais maisītājs
21. Kalibrēts termometrs

Papildaprīkojums, kas nav ietverts komplektācijā
1. Citoģenētiskā žāvēšanas kamera

Nepieciešamie reaģenti, kas nav ietverti komplektācijā
1. 20x citrāta fizioloģiskais šķīdums (saline-sodium citrate — SSC)
2. 100% etanols
3. Tween-20
4. 1M nātrija hidroksīds (NaOH)
5. 1M sālsskābe (HCl)
6. Attīrīts ūdens

Uz luminiscences mikroskopu attiecināmie ieteikumi
Lai nodrošinātu optimālu vizualizāciju, izmantojiet 100 W dzīvsudraba spuldzi vai ekvivalentu gaismas avotu un eļļā iegremdējamus 60/63x vai 100x objektīvus. Šajā zonžu komplektā izmantotie fluorofori tiks ierosināti un izstaros tālāk norādītā garuma viļņos.

Fluorofors	Ierosme$_{maks.}$ [nm]	Izstarošana$_{maks.}$ [nm]
Zils	418	467
Zaļš	495	521
Sarkans	596	615

Nodrošiniet, lai mikroskops būtu aprīkots ar iepriekš norādītajiem viļņa garumiem atbilstošiem ierosmes un izstarošanas filtriem. Lai nodrošinātu optimālu zaļo un sarkano fluoroforu vienlaicīgu vizualizāciju, izmantojiet trīsjoslu DAPI/zaļā spektra/sarkanā spektra filtru vai divjoslu zaļā spektra/sarkanā spektra filtru. Izmantojiet vienjoslas zilā spektra filtru zilā spektra optimālai vizualizācijai vai trīsjoslu sarkanā spektra/zaļā spektra/zilā spektra filtru vienlaicīgai zaļo, sarkano un zilo fluoroforu vizualizācijai.

Pirms lietošanas pārbaudiet luminiscences mikroskopu, lai pārliecinātos, vai tas darbojas pareizi. Izmantojiet iegremdēšanas eļļu, kas piemērota luminiscences mikroskopijai un nodrošina zemu autoluminiscences līmeni. Izvairieties no DAPI luminiscences uzturēšanas šķīduma sajaukšanās ar mikroskopa iegremdēšanas eļļu, jo pretējā gadījumā radīsies signāla traucējumi. Rīkojieties atbilstoši ražotāja ieteikumiem attiecībā uz spuldzes un filtru kalpošanas ilgumu.

Paraugu sagatavošana
Šis komplekts ir paredzēts izmantošanai ar hematoloģiski iegūtām šūnu suspensijām, kas fiksētas Karnuā šķīduma (3:1 metanols/etiķskābe) fiksatorā un ir sagatavotas atbilstoši laboratorijā vai iestādē spēkā esošajām vadlīnijām. Sagatavojiet gaisā nožāvētus paraugus uz mikroskopa priekšmetstikliņiem atbilstoši standarta citoģenētiskajām procedūrām. AGT *citoģenētikas laboratorijas rokasgrāmatā* ir ietverti ieteikumi par paraugu ņemšanu, kulturēšanu, ievākšanu un priekšmetstikliņu sagatavošanu[5].

Šķīdumu sagatavošana
Etanola šķīdumi
Atšķaidiet 100% etanolu ar attīrītu ūdeni atbilstoši tālāk norādītajām proporcijām un rūpīgi samaisiet.
- 70% etanols — 7 daļas 100% etanola ar 3 daļām attīrīta ūdens
- 85% etanols — 8,5 daļas 100% etanola ar 1,5 daļām attīrīta ūdens

Glabājiet šķīdumus līdz pat 6 mēnešiem istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

2xSSC šķīdums
Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 9 daļām attīrīta ūdens un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 mēnešu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

0.4xSSC šķīdums
Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 49 daļām attīrīta ūdens un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 mēnešu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

2xSSC, 0,05% Tween-20 šķīdums
Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 9 daļām attīrīta ūdens. Pievienojiet 5 µl Tween-20 uz 10 ml un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 mēnešu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

Luminiscentās in situ hibridizācijas protokols
(Piezīme. Nodrošiniet, lai zonde un kontrasta krāsviela pēc iespējas mazāk tiktu pakļauta laboratorijas apgaismojuma iedarbībai.)

Priekšmetstikliņa sagatavošana
1. Novietojiet šūnu paraugu uz mikroskopa priekšmetstikliņa, kas izgatavots no stikla. Ļaujiet nožūt. (**Pēc izvēles, ja tiek izmantota citoģenētiska žāvēšanas kamera**: priekšmetstikliņu sagatavošanai jāizmanto citoģenētiskā žāvēšanas kamera. Lai nodrošinātu optimālu šūnu parauga sagatavošanu, kamera jādarbina, iestatot aptuveni 25 °C temperatūru un 50% mitruma. Ja citoģenētiskā žāvēšanas kamera nav pieejama, kā alternatīvu var izmantot gāzu nosūcēju).
2. Iegremdējiet priekšmetstikliņu 2xSSC šķīdumā istabas temperatūrā uz 2 minūtēm, neveicot maisīšanu.
3. Veiciet dehidrēšanas etanola sērijas (70%, 85% un 100%), katru 2 minūtes istabas temperatūrā.
4. Ļaujiet nožūt.

Priekšdenaturēšana
5. Izņemiet zondi no saldētavas un ļaujiet tai sasilt līdz istabas temperatūrai. Pirms mēģeņu lietošanas brīdi tās centrifugējiet.
6. Izmantojot pipeti, pārliecinieties, vai zondes šķīdums ir viendabīgi samaisīts.
7. Paņemiet 10 µl zondes šķīduma katram testam un pārnesiet to uz mikrocentrifūgas mēģeni. Atlikušo zondes šķīdumu nekavējoties ievietojiet atpakaļ saldētavā.
8. Novietojiet zondi un parauga priekšmetstikliņu uz sildierīces un veiciet priekšsildīšanu 37 ºC (+/- 1 ºC) temperatūrā 5 minūtes.
9. Uzlieciet 10 µl zondes maisījuma uz šūnu parauga un rūpīgi uzlieciet segstikliņu. Hermetizējiet ar gumijas līmi un ļaujiet līmei pilnībā nožūt.

Denaturēšana
10. Veiciet parauga un zondes vienlaicīgu denaturēšanu, sildot priekšmetstikliņu uz sildierīces 75 ºC (+/- 1 ºC) temperatūrā 2 minūtes.

Hibridizācija
11. Ievietojiet priekšmetstikliņu gaismu necaurlaidīgā konteinerā ar mitru vidi un atstājiet to 37 ºC (+/- 1 ºC) temperatūrā līdz nākamajai dienai.

Skalošana pēc hibridizācijas
12. Izņemiet DAPI no saldētavas un ļaujiet tam sasilt līdz istabas temperatūrai.
13. Noņemiet segstikliņu un rūpīgi notīriet visas līmes atliekas.
14. Iegremdējiet priekšmetstikliņu 0,4xSSC (pH 7,0) 72 ºC (+/- 1 ºC) temperatūrā uz 2 minūtēm nemaisot.
15. Noteciniet šķidrumu no priekšmetstikliņa un iegremdējiet to 2xSSC, 0,05% Tween-20 šķīdumā istabas temperatūrā (pH 7,0) uz 30 sekundēm nemaisot.
16. Noteciniet šķidrumu no priekšmetstikliņa un katram paraugam pievienojiet 10 µl DAPI luminiscences uzturēšanas līdzekli.
17. Uzlieciet segstikliņu, likvidējiet burbuļus un ļaujiet krāsai tumsā attīstīties 10 minūtes.
18. Skatiet luminiscences mikroskopā (sk. **Ieteikumi attiecībā uz luminiscences mikroskopu**).

Sagatavoto priekšmetstikliņu stabilitāte
Sagatavotie priekšmetstikliņi ir analizējami 1 mēneša periodā, ja tiek glabāti tumsā un istabas temperatūrā vai par istabas temperatūru zemākā temperatūrā.

Ieteikumi attiecībā uz procedūru
1. Priekšmetstikliņu karsēšana vai novecošana var samazināt signāla luminiscenci.
2. Tādu reaģentu izmantošana, kas nav uzņēmuma Cytocell Ltd. norādīti vai ieteiktie reaģenti, var nelabvēlīgi ietekmēt hibridizācijas apstākļus.

3. Šķīdumu, ūdens vannu un inkubatoru temperatūras mērīšanai jāizmanto kalibrēts termometrs, jo norādītās temperatūras ievērošana ir kritiski svarīga produkta optimālas veiktspējas nodrošināšanai.
4. Skalošanas šķīdumu koncentrācijas, pH vērtības un temperatūras vērtības ir svarīgas, jo pārāk lielas pielaides gadījumā iespējama nespecifiska sasaiste, savukārt pārāk mazas pielaides gadījumā iespējama signāla nepietiekamība.
5. Nepilnīga denaturēšana var izraisīt signāla nepietiekamību, savukārt pārmērīga denaturēšana arī var izraisīt nespecifisku sasaisti.
6. Pārmērīgas hibridizācijas dēļ iespējami papildu vai neparedzēti signāli.
7. Pirms testa izmantošanas diagnostikas nolūkiem lietotājiem ir jāveic protokola optimizācija atbilstoši saviem paraugiem.
8. Ja apstākļi nav pietiekami optimāli, iespējama nespecifiska sasaiste, kas var tikt nepareizi interpretēta kā zondes signāls.

Rezultātu interpretēšana

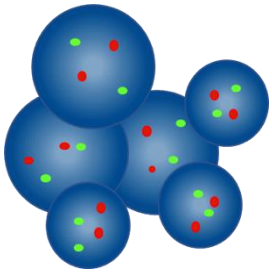
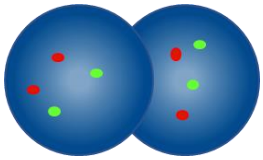
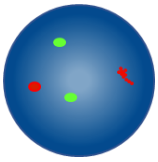
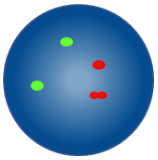
Sagatavotā priekšmetstikliņa ar paraugu kvalitātes novērtēšana

Paraugu nedrīkst analizēt tālāk norādītajos gadījumos.

- Signāli ir pārāk vāji analizēšanai atsevišķos filtros — lai veiktu analīzi, signāliem jābūt spilgtiem, labi izšķiramiem un viegli novērtējamiem.
- Ir daudz salipušu/pārklājošos šūnu, kas traucē veikt analīzi.
- >50% šūnu nav hibridizētas.
- Starp šūnām atrodas pārāk daudz luminiscējošo daļiņu un/vai luminiscējošs aizmiglojums, kas rada signāla traucējumus, — optimālā priekšmetstikliņā ar paraugu fonam jābūt tumšam vai melnam un tīram.
- Šūnu kodolu robežas nav izšķiramas un nav veselas.

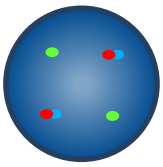
Uz analīzi attiecināmās vadlīnijas

- Katra parauga analīzi un interpretēšanu ir jāveic diviem laboratorijas speciālistiem. Visas neatbilstības ir jānovērš, novērtēšanu veicot trešajam laboratorijas speciālistam.
- Katram laboratorijas speciālistam jābūt attiecīgi kvalificētam atbilstoši spēkā esošajiem valsts līmeņa standartiem.
- Katram laboratorijas speciālistam neatkarīgi jāveic novērtēšana 100 kodoliem no katra parauga. Pirmajam laboratorijas speciālistam jāsāk analīze no priekšmetstikliņa kreisās puses, savukārt otram laboratorijas speciālistam — no priekšmetstikliņa labās puses.
- Katram laboratorijas speciālistam jādokumentē savi rezultāti atsevišķās lapās.
- Ir jāanalizē tikai veseli kodoli, nevis pārklājošies kodoli, sablīvējušies kodoli vai kodoli, kurus sedz citoplazmatiskās atliekas vai augsta līmeņa autoluminiscence.
- Jāizvairās no zonām ar pārmērīgu citoplazmatisko atlieku apjomu vai nespecifisku hibridizāciju.
- Signāla intensitāte var būt mainīga, pat vienā kodolā. Šādos gadījumos izmantojiet atsevišķus filtrus un/vai pielāgojiet fokālo plakni.
- Ja apstākļi nav pietiekami optimāli, signāli var šķist izkliedēti. Ja divi vienādas krāsas signāli savstarpēji saskaras vai attālums starp tiem nepārsniedz divus signāla platumus, vai arī abus signālus savieno tikko redzams pavediens, šie signāli ir uzskatāmi par vienu signālu.
- Ja pastāv šaubas, vai šūna ir analizējama, neveiciet tās analīzi.

Uz analīzi attiecināmās vadlīnijas	
	Neskaitīt — kodoli atrodas pārāk tuvu viens otram, lai varētu noteikt to robežas
	Neskaitīt pārklājošos kodolus — nav redzamas visas abu kodolu zonas
	Skaitīt kā divus sarkanus signālus un divus zaļus signālus — viens no abiem sarkanajiem signāliem ir difūzs
	Skaitīt kā divus sarkanus signālus un divus zaļus signālus — atstarpe vienā sarkanajā signālā ir mazāka nekā divi signāla platumi

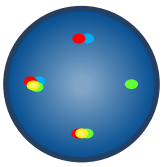
Paredzamie rezultāti

Paredzamais normālu signālu modelis

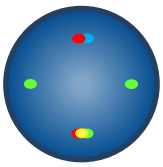


Normālā šūnā ir paredzami divi sarkani/zili fūzijas signāli un divi zaļi signāli (2SZi, 2Z).

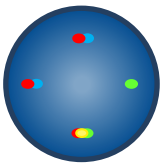
Paredzamais anormālo signālu modelis



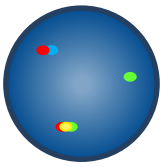
Šūnā ar t(9;22)(q34;q11) pārkārtojumu paredzamais signālu modelis ir viens sarkans/zaļš fūzijas signāls, viens sarkans/zaļš/zils fūzijas signāls, viens sarkans/zils fūzijas signāls un viens zaļš signāls (1F, 1SZZi, 1SZi, 1Z).



Šūnā ar t(9;22)(q34;q11) pārkārtojumu ar proksimālā 9q delēciju paredzamais signālu modelis ir viens sarkans/zaļš fūzijas signāls, divi zaļi signāli un viens sarkans/zils fūzijas signāls (1F, 2Z, 1SZi).



Šūnā ar t(9;22)(q34;q11) pārkārtojumu ar distālā 22q delēciju paredzamais signālu modelis ir viens sarkans/zaļš fūzijas signāls, viens zaļš signāls un divi sarkans/zils fūzijas signāli (1F, 1Z, 2SZi).



Šūnā ar t(9;22)(q34;q11) pārkārtojumu ar proksimālā 9q un distālā 22q delēciju paredzamais signālu modelis ir viens sarkans/zaļš fūzijas signāls, viens zaļš signāls un viens sarkans/zils fūzijas signāls (1F, 1Z, 1SZi).

Zilā ASS1 zonde var atšķirt nejaušu signālu pārklāšanos no īstas BCR/ABL1 fūzijas interfāzes šūnās. Nejaušas signālu pārklāšanās rezultātā rastos zilā signāla klātbūtne, savukārt īstas fūzijas rezultātā zilais signāls nav klātesošs.

Citi signālu modeļi ir iespējami aneiploīdos/nelīdzsvarotos paraugos.

Zināmā krusteniskā reakcija

Zaļā BCR distālā zonde var uzrādīt līdz pat 2 krusteniskās hibridizācijas signāliem B, C vai E grupas hromosomām.

Ziņošana par nevēlamiem notikumiem

Ja uzskatāt, ka ir radušies šīs ierīces darbības traucējumi vai tās veiktspējas rādītāji ir pasliktinājušies, iespējami izraisot nelabvēlīgu notikumu (piemēram, novēlotu vai nepareizu diagnozi, novēlotu vai nepiemērotu terapiju), par to nekavējoties jāziņo ražotājam (**e-pasta adrese:** vigilance@ogt.com).

Bar šādu notikumu arī var būt jāziņo kompetentajai iestādei attiecīgajā valstī. Kontaktpersonu medicīnas ierīču kontroles jautājumos saraksts ir atrodams šajā vietnē: http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/.

Specifiskās veiktspējas raksturlielumi

Analītiskais specifiskums

Analītiskais specifiskums tiek izteikts kā to signālu procentuālā vērtība, kas hibridizējas ar pareizo lokusu un nekādu citu vietu. Analītiskais specifiskums tika noteikts, veicot 200 mērķa lokusu analīzi. Analītiskais specifiskums tika noteikts, luminiscentās in situ hibridizācijas signālu, kas hibridizējās ar pareizo lokusu, skaitu izdalot ar hibridizēto luminiscentās in situ hibridizācijas signālu kopskaitu.

1. tabula Zondes BCR/ABL *Plus* Translocation, Dual Fusion Probe analītiskais specifiskums

Zonde	Mērķa lokuss	Ar pareizo lokusu hibridizēto signālu skaits	Hibridizēto signālu kopskaits	Specifiskums (%)
Sarkanā ABL1	9q34	182	182	100
Zaļā BCR	22q11.23	182	182	100
Zilā ASS1	9q34	182	182	100

Analītiskais jutīgums
Analītiskais jutīgums tiek izteikts kā novērtējamu interfāzes šūnu ar paredzamu normālo signālu modeli procentuālā vērtība. Analītiskais jutīgums tika noteikts, analizējot interfāzes šūnas dažādos normālos paraugos. Jutīgums tika aprēķināts kā novērtējamo šūnu ar paredzamo signālu modeli procentuālā vērtība (ar 95% ticamības intervālu).

2. tabula Zondes BCR/ABL *Plus* Translocation, Dual Fusion Probe analītiskais jutīgums

Šūnu ar paredzamiem signālu modeļiem skaits	Šūnu ar novērtējamiem signāliem skaits	Jutīgums (%)	95% ticamības intervāls
468	500	93,6	2,1

Normalitātes robežvērtību raksturojums
Uz luminiscentās in situ hibridizācijas zondēm attiecināmā normalitātes robežvērtība ir novērtējamu interfāzes šūnu ar specifisku anormālo signālu modeli, ar kādu paraugs ir uzskatāms par normālu attiecībā uz šādu signālu modeli, maksimālā procentuālā vērtība.

Normalitātes robežvērtība tika noteikta, izmantojot paraugus no normāliem un pozitīviem pacientiem. Katram paraugam tika reģistrēti 100 šūnu signālu modeļi. Tika aprēķināts Jūdena indekss, lai noteiktu robežvērtību, kurai ir maksimizēts jutīgums + specifiskums -1.

3. tabula Zondes BCR/ABL *Plus* Translocation, Dual Fusion Probe normalitātes robežvērtību raksturojums

Anomālu signālu modelis	Jūdena indekss	Normalitātes robežvērtība (%)
1F, 1SZZi, 1SZi, 1Z; 1F, 2Z, 1SZi; 1F. 1Z, 2SZi; 1F, 1Z, 2SZi	1,00	2

Laboratorijām jāveic robežvērtību verifikācija, izmantojot savus datus[6,7].

Precizitāte un reproducējamība
Precizitāte ir testa dabīgo atšķirību rādītājs, testu atkārtojot vairākas reizes vienādos apstākļos. Šis rādītājs tika noteikts, analizējot atkārtotu viena parauga testēšanu ar zondēm no vienas partijas, vienādos apstākļos un vienā dienā.

Reproducējamība ir testa variabilitātes rādītājs un ir noteikta, ņemot vērā paraugu līmeņa, dienas līmeņa un partijas līmeņa variabilitāti. Dienas līmeņa reproducējamība tika noteikta, analizējot vienus un tos pašus paraugus trīs dažādās dienās. Partijas līmeņa reproducējamība tika noteikta, vienā dienā analizējot vienus un tos pašus paraugus un izmantojot zondes no trīs dažādām partijām. Paraugu līmeņa reproducējamība tika noteikta, analizējot trīs parauga replikātus vienā dienā. Katram paraugam tika reģistrēti 100 interfāzes šūnu signālu modeļi un tika aprēķināta šūnu ar paredzamo signālu modeli procentuālā vērtība.

Reproducējamība un precizitāte tika aprēķinātas kā standartnovirze (Standard Deviation — STDEV) starp replikātiem katram mainīgajam, kā arī vispārējā vidējā STDEV.

4. tabula Zondes BCR/ABL *Plus* Translocation, Dual Fusion Probe reproducējamība un precizitāte

Mainīgais	Standartnovirze (STDEV)
Precizitāte	0,19
Paraugu līmeņa	0,19
Dienas līmeņa	0,38
Partijas līmeņa	0,00
Vispārīgā novirze	0,30

Klīniskā veiktspēja
Klīniskā veiktspēja tika noteikta, izmantojot produkta paredzēto populāciju reprezentējošu paraugu. Katram paraugam tika reģistrēti ≥100 interfāzes šūnu signālu modeļi. Normalitāte/anormalitāte tika noteikta, salīdzinot šūnu ar specifisku anormālo signālu modeli procentuālo vērtību ar normalitātes robežvērtību. Rezultāti pēc tam tika salīdzināti ar zināmo parauga statusu.

Klīnisko datu rezultāti tika analizēti, lai iegūtu jutīguma, specifiskuma un normalitātes vērtības, izmantojot viendimensionālu pieeju.

5. tabula Zondes BCR/ABL *Plus* Translocation, Dual Fusion Probe klīniskā veiktspēja

Mainīgais	Rezultāts
Klīniskais jutīgums (pareizi pozitīvo rezultātu rādītājs (true positive rate — TPR))	96,9%
Klīniskais specifiskums (pareizi negatīvo rezultātu rādītājs (true negative rate — TPR))	100%
Kļūdaini pozitīvo rezultātu rādītājs (false positive rate — FPR) = 1 – specifiskums	0%

Papildinformācija
Lai saņemtu papildinformāciju par produktu, sazinieties ar CytoCell tehniskā atbalsta nodaļu.
Tālr.: +44 (0)1223 294048
E-pasts: techsupport@cytocell.com
Tīmeklī: www.ogt.com

Atsauces

1. Swerdlow *et al.*, (eds,) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
2. Soupir *et al.*, Am J Clin Pathol 2007;127:642-650
3. Robinson *et al.*, Leukemia 2005;19(4):564-71
4. Siu *et al.*, BMC Blood Disorders 2009;9:4
5. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
6. 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.
7. 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.

Simbolu skaidrojums

REF	**lv:** Kataloga numurs
IVD	**lv:** *In vitro* diagnostikai paredzēta medicīnas ierīce
LOT	**lv**: Partijas kods
	lv: Skatīt lietošanas instrukciju
	lv: Ražotājs
	lv: Derīguma termiņš
-15°C -25°C	**lv:** Temperatūras ierobežojums
	lv: Sargāt no saules gaismas
Σ	**lv:** Saturs ir pietiekams <n> testiem
CONT	**lv:** Saturs

Patenti un preču zīmes
CytoCell ir SIA Cytocell reģistrēta preču zīme.

Cytocell Ltd.
Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, Apvienotā Karaliste
Tālr.: +44(0)1223 294048
Fakss: +44(0)1223 294986
E-pasts: probes@cytocell.com
Tīmeklī: www.ogt.com