



A Sysmex Group Company



Návod k použití

REF: LPH 067-S / LPH 067

CLL PROFILER Kit



POUZE K PROFESIONÁLNÍMU POUŽITÍ



www.cytocell.com

Další informace a více jazyků k dispozici na www.ogt.com

Omezení

Tento prostředek je navržen tak, aby detekoval genomové ztráty větší než oblast pokrytá červenými a zelenými kopiemi v této sadě sond, což zahrnuje oblasti P53 (TP53), ATM a D13S319, nebo zisky větší než oblast pokrytá modrou kopií v této sadě sond, což zahrnuje centromeru chromozomu 12. Genomové zisky/ztráty mimo tyto oblasti nebo částečné zisky/ztráty těchto oblastí nemusí být tímto prostředkem detekovány.

Tento test není určen k použití v rámci samostatné diagnostiky, prenatálního testování, skríningu populace, testování přímo u pacientů nebo provádění autotestování. Tento produkt je určen pouze k profesionálnímu laboratornímu použití; veškeré výsledky musejí vyhodnotit kvalifikovaní pracovníci se zohledněním dalších relevantních výsledků testů.

Tento produkt nebyl validován pro použití na typech vzorků nebo jiných typech chorob kromě těch, které jsou specifikovány v odstavci předpokládané použití.

Hlášení a interpretace výsledků FISH musejí být v souladu s profesionálními standardy praxe a měly by zohledňovat další klinické a diagnostické informace. Tato sada je koncipována jako doplněk dalších diagnostických laboratorních testů. Terapeutické postupy nesmí být zahajovány pouze na základě výsledků testů FISH.

Nedodržení protokolu může ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům.

Tato sada nebyla validována pro jiné účely než ty, které jsou uvedeny v odstavci předpokládané použití.

Předpokládané použití

CytoCell CLL PROFILER Kit je kvalitativní, neautomatizovaný, fluorescenční *in situ* hybridizační test (FISH) používaný k detekci chromozomálních delecí v oblasti 11q22.3 na chromozomu 11, v oblasti 17p13.1 na chromozomu 17 nebo v oblasti 13q14.2-q14.3 na chromozomu 13 a/nebo zisků v centromerické oblasti na chromozomu 12 v hematologicky získaných buněčných suspenzích fixovaných v Carnoyově roztoku (3:1 metanol/kyselina octová) od pacientů s potvrzenou nebo předpokládanou chronickou lymfocytickou leukémií (CLL).

Indikace

Tento produkt byl vytvořen jako doplněk k dalším klinickým a histopatologickým testům v rámci uznávaných diagnostických postupů a postupů klinické péče v případech, kdy by znalost stavu delecce P53 (TP53), ATM nebo stavu delecce D13S319 a/nebo zisku centromery chromozomu 12 byla důležitá pro klinickou léčbu.

Principy testu

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika umožňující detekovat sekvence na metafázových chromozomech nebo v interfázních jádrech z fixovaných cytogenetických vzorků. Tato technika využívá sondy DNA, které hybridizují na celé chromozomy nebo na jednotlivé jedinečné sekvence, a slouží jako důležitý doplněk cytogenetické analýzy pomocí G-pruhování. Tuto techniku je nyní možno aplikovat jako základní vyšetřovací nástroj při prenatálním a hematologickém vyšetření a při chromozomální analýze solidního tumoru. Po fixování a denaturaci je cílová DNA k dispozici pro reasociaci na podobně denaturovanou, fluorescenčně označenou sondu DNA, která má komplementární sekvenci. Po hybridizaci se nevázaná a nespecificky vázaná DNA sonda odstraní a DNA se barevně označí pro účely vizualizace. Fluorescenční mikroskopie potom umožňuje vizualizaci hybridizované sondy na cílovém materiálu.

Informace o sondě

Sada CytoCell CLL PROFILER je určena k detekci delecí TP53, ATM a D13S319 a zisků centromerických sekvencí chromozomu 12 ve vzorcích periferní krve nebo kostní dřeně pacientů s chronickou lymfocytickou leukémií (CLL).

Kombinace sond P53(TP53)/ATM

Gen TP53 (*tumor protein p53*) v oblasti 17p13.1 je jedním z nejdůležitějších tumor supresorových genů; chová se jako silný transkripční faktor s důležitou rolí při udržování genetické stability. Ztráta TP53 je hlášena u 10 % pacientů s CLL a je u tohoto onemocnění považována za nejhorší prognostický marker^{1,2}.

Gen ATM (*ATM serin/threonin kináza*) na 11q22.3 je důležitým kontrolním genem odpovědným za řízení poškození buněk a jeho funkcí je vyhodnotit stupeň poškození DNA buňky a pokusit se o nápravu pomocí fosforylace klíčových substrátů zapojených do procesu odpovědi na poškození³. Ztráta ATM je hlášena u 18 % pacientů s CLL a je u tohoto onemocnění považována za špatný prognostický marker⁴.

Analýza interakce ATM/TP53 u pacientů s CLL prokázala, že TP53 a ATM hrají významnou roli při proliferaci lymfoidních nádorů⁵. Bylo prokázáno, že ATM zlepšuje fosforylaci TP53, pokud je poškození tak velké, že buňka vyžaduje destrukci pomocí apoptózy (což je zprostředkováno pomocí TP53). Delece ATM odstraňuje aktivitu tohoto kontrolního bodu a tím i aktivaci TP53. Tudiž není, navzdory přítomnosti TP53, proveden pokus o opravu nebo apoptózu poškozených buněk. Při absenci ATM mohou poškozené buňky dále proliferovat⁶.

Deleční/enumerální sonda D13S319/13qter/12cen

Delece ovlivňující 13q14 jsou také nejčastějšími strukturálními genetickými aberacemi u chronické lymfocytické leukémie (CLL)^{6,7,8}. Bylo zjištěno, že tato oblast je heterozygotně deletována u 30-60 % a homozygotně deletována u 10-20 % pacientů s CLL⁹. Bylo prokázáno, že míra přežití je u obou skupin podobná¹⁰. Pacienti s delecemi 13q14 jsou klasifikováni jako pacienti s velmi malým rizikem, pokud nejsou přítomny žádné jiné genetické léze¹.

Dva nekódující geny RNA, DLEU1 (*deletované u lymfocytické leukémie 1*) a DLEU2 (*deletované u lymfocytické leukémie 2*), plus genetický marker D13S319 pokrývají patogenní kritickou oblast 13q1411. DLEU1 je považován za nejpravděpodobnější tumor supresorový gen u CLL v rámci oblasti 13q14¹². Trizomie 12 je u CLL opakovaně se objevující abnormalita pozorovaná u 20 % případů¹³ a často vzniká jako unikátní cytogenetická aberace (40-60 % případů s trizomií 12)⁷. Pacienti s trizomií 12 jsou při absenci dalších genetických lézí klasifikováni jako málo rizikovi¹.

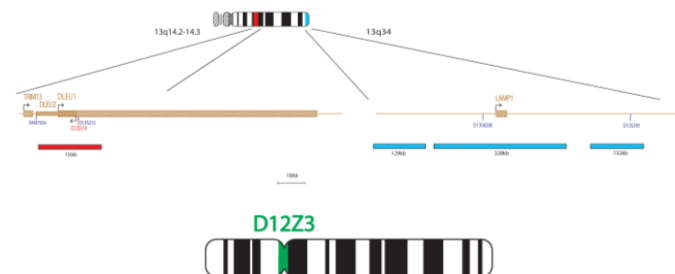
Parametry sondy

Deleční/enumerální sonda D13S319/13qter/12cen

D13S319, 13q14.2, červená

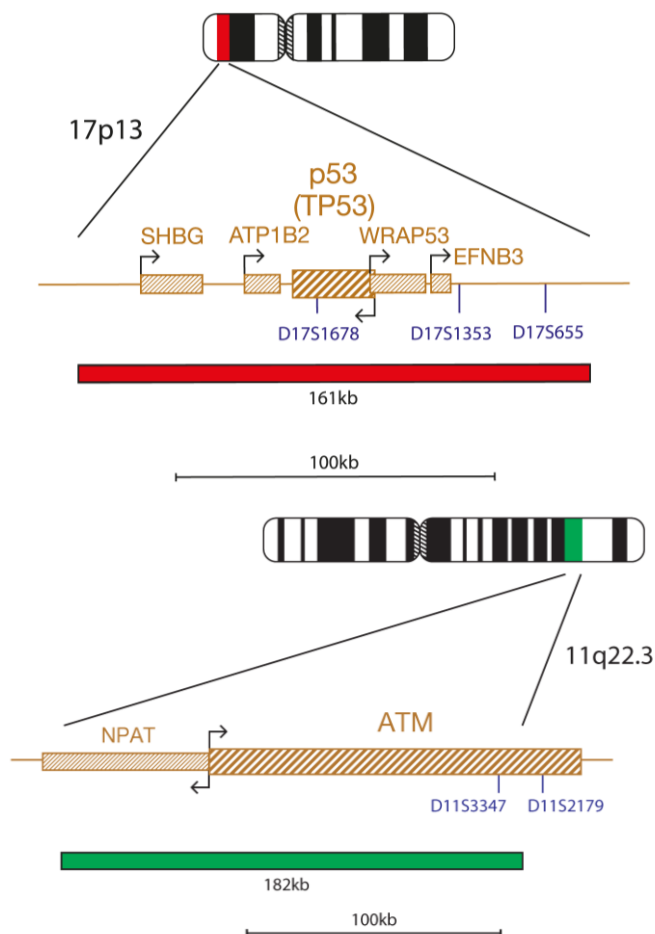
13qter, 13q34, modrá

D12Z3, 12p11.1-q11.1, zelená



Alfa-satelitní sonda Chromosome 12 je sonda pro detekci repetitivních sekvencí, je označena zeleně a rozpoznává centromerické repetitivní sekvence D12Z3. Sonda D13S319, označena červeně, pokrývá oblast o délce 156 kb, včetně celého genu DLEU1 a většiny genu DLEU2 a markery D13S319, D13S272 a RH47934. Subtelomericky specifická sonda 13qter, označena modře, umožňuje identifikaci chromozomu 13 a slouží jako kontrolní sonda.

P53 (TP53)/ATM
P53, 17p13.1, červená
ATM, 11q22.3, zelená



Složka P53 se skládá ze sondy o délce 161 kb, označené červeně, která pokrývá celý gen P53 (TP53) a přiléhající oblasti. Složka ATM se skládá ze sondy o délce 182 kb, označené zeleně, která pokrývá telomerický konec genu NPAT a centromerický konec genu ATM až za marker D11S3347.

Dodaný materiál

Deleční/enumerací sonda D13S319/13qter/12cen:

50 μ l v jedné lahvičce (5 testů) nebo 100 μ l v jedné lahvičce (10 testů)

Sonda P53 (TP53) /ATM:

50 μ l v jedné lahvičce (5 testů) nebo 100 μ l v jedné lahvičce (10 testů)

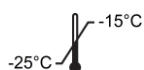
Sondy jsou dodávány předem smíchané v hybridizačním roztoku (formamid; dextran sulfát; solný roztok citrátu sodného (SSC)) a jsou připraveny k použití.

Kontrastní barvivo: 150 μ l v jedné lahvičce (15 testů)

Kontrastním barvivem je DAPI antifade (ES: 0,125 μ g/ml DAPI (4,6-diamidin-2-fenylnolol)).

Varování a bezpečnostní pokyny

- Pro diagnostické použití *in vitro*. Výhradně k profesionálnímu použití.
- Při manipulaci s DNA sondami a barvivem DAPI antifade použijte rukavice.
- Směsi v sondách obsahují formamid, což je teratogen; nevdechujte výpary a zamezte kontaktu s pokožkou. Zacházejte s ním opatrně; noste rukavice a laboratorní plášť.
- DAPI je potenciální karcinogen. Zacházejte s ním opatrně; noste rukavice a laboratorní plášť.
- Veškeré nebezpečné materiály likvidujte v souladu se směrnici pro likvidaci nebezpečného odpadu vašeho zdravotnického zařízení.
- Pracovníci musí být schopni rozlišit červenou, modrou a zelenou barvu.
- Nedodržení předepsaného protokolu a reagií může ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům.
- Sonda se nesmí ředit ani míchat s jinými sondami.
- Není-li během kroku predenaturace v rámci protokolu použito 10 μ l sondy, může to ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům.



Uchování a manipulace

Sadu je třeba uchovávat v mrazničce při teplotách -25°C až -15°C až do data expirace uvedeného na štítku sady. Sonda a lahvičky s kontrastními barvivy musí být uloženy v temnu.



Sonda zůstává během cyklů zmrazování a rozmrazování, k nimž dochází při běžném používání, stabilní (jeden cyklus znamená vyjmutí sondy z mrazničky a vrácení do mrazničky) a je fotostabilní až 48 hodin po souvislém vystavení světlu. Je třeba vynaložit veškeré úsilí na omezení expozice světlu a teplotním změnám.

Potřebné vybavení a materiál, které nejsou součástí dodávky

Je nutné používat kalibrovaná zařízení:

- Varná deska (s pevnou plotnou a přesným ovládním teploty do 80°C)
- Kalibrované mikropipety s různým objemem a špičkami v rozsahu od 1 μ l do 200 μ l
- Vodní lázeň s přesným ovládním teploty od 37°C do 72°C
- Mikrocentrifugační zkumavky (0,5 ml)
- Fluorescenční mikroskop (viz oddíl Doporučený fluorescenční mikroskop)
- Mikroskop s fázovým kontrastem
- Čisté plastové, keramické nebo skleněné (z ohnivzdorného skla) lahvičky typu „coplin“
- Chirurgické kleště
- Kalibrovaný pH metr (nebo pH indikační proužky, schopné měřit pH v rozmezí 6,5–8,0)
- Vlhčená nádoba
- Imerzní olej na objektiv fluorescenčního mikroskopu
- Stolní odstředivka
- Mikroskopová skříčka
- Krycí skříčka 24 x 24 mm
- Stopky
- Incubátor 37°C
- Lepidlo na bázi kaučukového roztoku
- Vířivý mixér
- Odměrné válce
- Magnetická míchačka
- Kalibrovaný teploměr

Volitelné vybavení, které není součástí dodávky

- Cytogenetická sušící komora

Potřebné reagenty, které nejsou součástí dodávky

- 20x fyziologický roztok citrátu sodného (SSC)
- 100% etanol
- Tween-20
- 1 M hydroxid sodný (NaOH)
- 1 M kyseliny chlorovodíkové (HCl)
- Demineralizovaná voda

Doporučení ohledně fluorescenčního mikroskopu

Pro optimální vizualizaci použijte 100 wattovou rtuťovou lampu nebo podobnou a apochromatické objektivy 60/63x nebo 100x s imerzním olejem. Fluorofory použité v této sadě sondy budou excitovat a emitovat při následujících vlnových délkách:

Fluorofor	Excitace _{max} [nm]	Emise _{max} [nm]
Aqua	418	467
Zelená	495	521
Červená	596	615

Zajistěte, aby byl mikroskop vybaven příslušnými excitačními a emisními filtry, které pokrývají výše uvedené vlnové délky. Pro optimální simultánní vizualizaci zelených a červených fluoroforů použijte třípásmový DAPI/zelený/červený filtr nebo dvoupásmový zelený/červený filtr. Pro optimální vizualizaci aqua spektra použijte jednopásmový aqua filtr, nebo pro simultánní vizualizaci zelených, červených a aqua fluoroforů použijte třípásmový červený/zelený/aqua filtr.

Před použitím zkontrolujte správnou funkci fluorescenčního mikroskopu. Použijte imerzní olej vhodný pro fluorescenční mikroskopy a se speciálním složením pro nízkou autofluorescenci. Dbejte na to, aby nedošlo ke smíchání barviva DAPI antifade s imerzním olejem do mikroskopu, protože by tak došlo k zastření signálů. Dodržujte doporučení výrobce týkající se životnosti lampy a stáří filtrů.

Příprava vzorků

Sada je určena k použití u buněk periferní krve nebo buněk kostní dřeně fixovaných v Carnoyově fixačním roztoku (3:1 metanol/kyselina octová), které jsou připraveny v souladu s pokyny laboratoře nebo zdravotnického zařízení. Na mikroskopová skříčka naneste vzorky usušené na vzduchu v souladu se standardními cytogenetickými postupy. *Cytogenetics Laboratory Manual* AGT (Příručka pro cytogenetické laboratoře) obsahuje doporučení pro odběr, kultivaci a získávání vzorků a pro přípravu sklíček¹⁴.

Příprava roztoků

Etanolové roztoky

Rozředte 100% etanol demineralizovanou vodou v následujících poměrech a řádně promíchejte:

- 70% etanol - 7 dílů 100% etanolu na 3 díly purifikované vody
- 85% etanol - 8,5 dílů 100% etanolu na 1,5 díly purifikované vody

Roztoky skladujte až 6 měsíců při pokojové teplotě ve vzduchotěsné nádobě.

Roztok 2xSSC

Zředte 1 díl roztoku 20xSSC 9 díly demineralizované vody a řádně promíchejte. Zkontrolujte pH a pomocí NaOH nebo HCl podle potřeby upravte na pH 7.0. Roztok skladujte ve vzduchotěsné nádobě při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů.

Roztok 0.4xSSC

Zředte 1 díl roztoku 20xSSC 49 díly demineralizované vody a řádně promíchejte. Zkontrolujte pH a pomocí NaOH nebo HCl podle potřeby upravte na pH 7.0. Roztok skladujte ve vzduchotěsné nádobě při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů.

Roztok 2xSSC, 0,05% roztok Tween-20

Zředte 1 díl roztoku 20xSSC 9 díly demineralizované vody. Na 10 ml přidejte 5 µl roztoku Tween-20 a řádně promíchejte. Zkontrolujte pH a pomocí NaOH nebo HCl podle potřeby upravte na pH 7.0. Roztok skladujte ve vzduchotěsné nádobě při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů.

Protokol FISH

(Poznámka: Dbejte, aby vždy byla omezena expozice sondy a kontrastních barviv osvětlení v laboratoři).

Příprava sklíčka

- Naneste buněčný vzorek na mikroskopové sklíčko. Nechte ho uschnout. **(Volitelně při použití cytogenetické sušicí komory:** vzorky lze na sklíčka nanést pomocí cytogenetické sušicí komory. K optimálnímu nanesení buněčných vzorků by měla komora pracovat při teplotě přibližně 25 °C a vlhkosti 50%. Pokud cytogenetickou sušicí komoru nemáte, použijte jako alternativu digestoř.)
- Sklíčko ponořte na 2 minuty do roztoku 2xSSC při pokojové teplotě. Neprotřepávejte.
- Dehydratujte pomocí etanolové série (70%, 85% a 100%), vždy po dobu 2 minut při pokojové teplotě.
- Nechte ho uschnout.

Predenaturace

- Vyjměte sondu z mrazničky a nechte ji zahřát na pokojovou teplotu. Laboratorní lahvičky před použitím krátce odstředte.
- Dbejte, aby byl roztok sondy rovnoměrně promíchán pipetou.
- Na každý test naberte 10 µl sondy a přeneste ji do mikrocentrifugační zkumavky. Zbytek sondy vraťte rychle do mrazničky.
- Sondu a sklíčko se vzorkem umístěte na varnou desku a předehřívajte po dobu 5 minut při teplotě 37 °C (+/- 1 °C).
- Kápněte 10 µl směsi sondy na buněčný vzorek a opatrně jej překryjte krycím sklíčkem. Neprodyšně uzavřete pomocí kaučukového lepidla a nechte lepidlo úplně uschnout.

Denaturace

- Zahříváním sklíčka na varné desce po dobu 2 minut při teplotě 75 °C (+/- 1 °C) vzorek a sondu souběžně denaturujte.

Hybridizace

- Sklíčko uložte na noc do vlhké neprůsvitné nádoby při teplotě 37 °C (+/- 1 °C).

Post-hybridizační vymývání

- Vyjměte DAPI z mrazničky a nechte ho zahřát na pokojovou teplotu.
- Opatrně sejměte krycí sklíčko a odstraňte všechny zbytky lepidla.
- Sklíčko ponořte na 2 minuty do roztoku 0,4xSSC (pH 7,0) při teplotě 72 °C (+/- 1 °C). Neprotřepávejte.
- Sklíčko osušte a na 30 sekund ponořte do roztoku 2xSSC, 0,05% Tween-20 při pokojové teplotě. Neprotřepávejte.
- Sklíčko osušte a na každý vzorek naneste 10 µl DAPI antifade.
- Přikryjte krycím sklíčkem, odstraňte veškeré bubliny, uložte do temna a po dobu 10 minut nechte vyvíjet barvu.
- Zkontrolujte pomocí fluorescenčního mikroskopu (viz **Doporučení ohledně fluorescenčního mikroskopu**).

Stabilita připravených sklíček

Pokud jsou hotová sklíčka uložena v temnu a při pokojové teplotě nebo nižší, lze je analyzovat až po dobu 1 měsíce.

Doporučení pro zpracování

- Vypalování nebo stárnutí sklíček může redukovat fluorescenční signál.
- Podmínky hybridizace mohou být nepříznivě ovlivněny použitím reagentů, které nejsou dodány nebo doporučeny společností Cytocell Ltd.
- K měření teplot roztoků, vodních lázní a inkubátorů používejte kalibrovaný teploměr, protože tyto teploty jsou velmi důležité k zajištění optimální funkce produktu.
- Koncentrace promývacího roztoku, pH a teplota jsou důležité, protože nedostatečná důslednost může vést k nespecifickému navázání sondy a přílišná důslednost naopak k absenci signálu.
- Neúplná denaturace může vést k absenci signálu a příliš dlouhá denaturace může rovněž způsobit nespecifické navázání.
- Nadměrná hybridizace může způsobit dodatečné nebo neočekávané signály.
- Uživatelé by si měli před použitím testu pro diagnostické účely optimalizovat protokol pro své vlastní vzorky.
- Neoptimální podmínky mohou vést k nespecifickému vázání, které může být nesprávně interpretováno jako signál sondy.

Interpretace výsledků

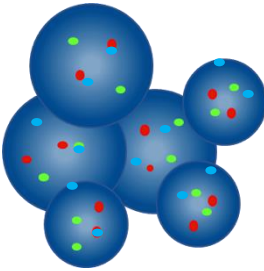
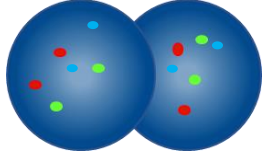
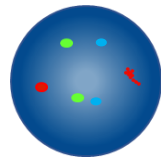
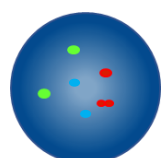
Vyhodnocení kvality sklíčka

Sklíčko by se nemělo analyzovat, jestliže:

- jsou signály příliš slabé, a nelze je proto analyzovat jednoduchými filtry – pro pokračování v analýze musejí být signály jasné, výrazné a snadno hodnotitelné;
- analýze brání velký počet shluků buněk nebo překrývajících se buněk;
- nebylo hybridizováno >50% buněk;
- mezi buňkami se nachází příliš mnoho fluorescenčních částic a/nebo fluorescenčního zákalu, který ruší signály – u optimálních sklíček by mělo být pozadí tmavé nebo černé a čiré;
- není možné rozlišit hranice buněčných jader a hranice nejsou nepoškozené.

Pokyny pro analýzu

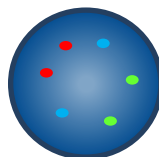
- Každý vzorek musí analyzovat a vyhodnotit dva analytici. Jakékoliv nesrovnalosti se musí vyřešit hodnocením třetího analytika.
- Všichni analytici musí mít odpovídající kvalifikaci v souladu s uznávanými národními standardy.
- Všichni analytici musí provést nezávislé hodnocení 100 jader každého vzorku. První analytik musí začít provádět analýzu z levé strany sklíčka a druhý analytik z pravé strany.
- Každý analytik musí zdokumentovat své výsledky na samostatných listech.
- Analyzujte pouze nepoškozená jádra, nikoli překrývající se nebo nahromaděná jádra ani jádra překrytá cytoplazmatickým odpadem či jádra s vysokým stupněm autofluorescence.
- Vyhnete se místům, kde je příliš mnoho cytoplazmatického odpadu nebo kde se vyskytuje nespecifická hybridizace.
- Intenzita signálu se může lišit, dokonce i v rámci jediného jádra. V takových případech použijte jednoduché filtry a/nebo upravte ohniskovou rovinu.
- Za neoptimálních podmínek se mohou signály jevit jako rozptýlené. Jestliže se dva signály stejné barvy vzájemně dotýkají, nebo je mezi nimi vzdálenost menší než dvě šířky signálu, nebo pokud dva signály spojuje slabý pruh, počítejte je jako jeden signál.
- Pokud si nejste jisti, zda lze buňku analyzovat či nikoli, analýzu neprovádějte.

Pokyny pro analýzu	
	Nepočítejte – jádra jsou příliš těsně u sebe, takže není možno určit hranice
	Nepočítejte překrývající se jádra – všechny oblasti obou jader nejsou viditelné
	Počítejte jako dva červené signály, dva modré signály a dva zelené signály – jeden ze dvou červených signálů je difúzní
	Počítejte jako dva červené signály, dva modré signály a dva zelené signály – mezera v jednom červeném signálu je menší než dvě šířky signálu

Předpokládané výsledky

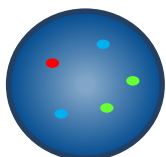
Deleční/enumerací sonda D13S319/13qter/12cen

Předpokládaný vzorec normálního signálu

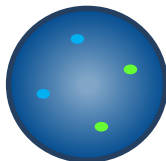


U normální buňky se předpokládají dva červené, dva modré a dva zelené signály (2R, 2M, 2Z).

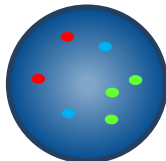
Předpokládané vzorce abnormálního signálu



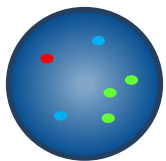
V buňce s hemizygotní delecí lokusu D13S319 bude mít předpokládaný vzorec signálu jeden červený signál, dva modré a dva zelené signály (1Č, 2M, 2Z).



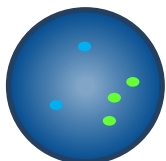
V buňce s homozygotní delecí lokusu D13S319 nebude mít předpokládaný vzorec signálu žádný červený signál a bude mít dva modré a dva zelené signály (0Č, 2M, 2Z).



V buňce s trizomií 12 a normálním stavem D13S319 bude mít předpokládaný vzorec signálu dvai červené, dva modré a tři zelené signály (2Č, 2M, 3Z).



V buňce s trizomií 12 a hemizygotní delecí D13S319 bude mít předpokládaný vzorec signálu jeden červený, dva modré a tři zelené signály (1Č, 2M, 3Z).

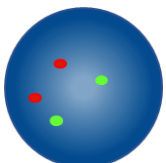


V buňce s trizomií 12 a homoygotní delecí D13S319 bude mít předpokládaný vzorec signálu žádný červený, dva modré a tři zelené signály (0Č, 2M, 3Z).

U aneuploidních/nevyvážených vzorků jsou možné jiné vzory signálu.

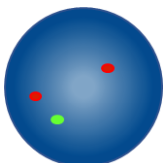
Sonda P53/ATM

Předpokládaný vzorec normálního signálu

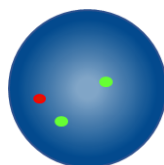


U normální buňky se předpokládají dva červené a dva zelené signály (2R, 2G).

Předpokládané vzorce abnormálního signálu



V buňce s delecí ATM bude mít předpokládaný vzorec signálu dva červené signály a jeden zelený signál (2Č, 1Z).



V buňce s delecí P53 bude mít předpokládaný vzorec signálu jeden červený a dva zelené signály (1Č, 2Z).

U aneuploidních/nevyvážených vzorků jsou možné jiné vzory signálu.

Známa zkřížená reaktivita

Zelená sonda D12Z3 může vykazovat zkříženou hybridizaci na 3c, 6c, 7c a 10c.

Hlášení nežádoucích účinků

Pokud se domníváte, že prostředek nefungoval správně nebo došlo ke zhoršení jeho funkčních charakteristik, což mohlo přispět ke vzniku nežádoucí události (např. zpožděná nebo chybná diagnóza, zpožděná nebo nevhodná léčba), je nutné tuto skutečnost neprodleně oznámit výrobci (**e-mail**: vigilance@ogt.com).

V odpovídajících případech je rovněž nutné událost oznámit příslušnému národnímu orgánu. Seznam kontaktních míst pro vigilanci naleznete na adrese: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Specifické funkční charakteristiky

Analytická specifita

Analytická specifita je procento signálů, které hybridizují do správného lokusu a na žádné jiné místo. Analytická specifita byla stanovena analýzou celkem 200 cílových lokusů. Analytická specifita byla vypočtena jako počet signálů FISH, které hybridizovaly na správný lokus děleno celkovým počtem hybridizovaných signálů FISH.

Tabulka 1. Analytická specifita CLL PROFILER Kit

Sada	Sonda	Cílový lokus	Počet signálů hybridizovaných na správný lokus	Celkový počet hybridizovaných signálů	Specifita (%)
D13S319/ Deleční/enumerací sonda 13qter/12cen	Červená D13S319	13q14.2	200	200	100
	Modrá 13qter	13q34	200	200	100
	Zelená D12Z3	12p11.1-q11.1	200	200	100
Sonda P53/ATM	Červená P53	17p13	200	200	100
	Zelená ATM	11q22.3	200	200	100

Analytická citlivost

Analytická senzitivita je procento započítatelných interfázních buněk s předpokládaným normálním signálovým vzorem. Analytická senzitivita byla stanovena analýzou interfázních buněk napříč různými normálními vzorky. Senzitivita byla vypočtena jako procento započítatelných buněk s očekávaným signálovým vzorem (s 95% intervalem spolehlivosti).

Tabulka 2. Analytická citlivost CLL PROFILER Kit

Sada	Počet buněk s předpokládanými vzorci signálu	Počet buněk se započítatelnými signály	Citlivost (%)	Interval spolehlivosti 95 %
D13S319/ Deleční/enumerací sonda 13qter/12cen	467	500	93,4	2,6
Sonda P53/ATM	479	500	95,8	1,7

Charakteristika normálních mezních hodnot

Normální mezní hodnota ve spojení se sondami FISH je maximální procento započítatelných interfázních buněk se specifickým abnormálním signálovým vzorem, při kterém se vzorec považuje pro tento signálový vzor za normální.

Normální mezní hodnota byla stanovena pomocí vzorků normálních a pozitivních pacientů. Pro každý vzorek byly zaznamenány signálové vzory 100 buněk. Byl vypočten Youdenův index k nalezení prahové hodnoty, u níž je hodnota senzitivita + specifita - 1 maximální.

Tabulka 3. Charakteristika normálních mezních hodnot CLL PROFILER Kit

Sada	Přeskupení	Vzorec abnormálního signálu	Youdenův index	Normální mezní hodnota (%)
D13S319/ Deleční/enumerací sonda 13qter/12cen	Hemizygotní delece D13S319	0Č, 2M, 2Z	0,96	6
	Trizomie 12	2Č, 2M, 3Z	0,99	4
Sonda P53/ATM	Delece P53	1Č, 2Z	0,99	8
	Delece ATM	2Č, 1Z	0,99	8

Laboratoře si musí ověřit mezní hodnoty pomocí vlastních dat^{15,16}.

Přesnost a reprodukovatelnost

Přesnost je míra přirozeného kolísání testu při několikanásobném opakování za stejných podmínek. Hodnocení bylo provedeno opakovanou analýzou sond stejného čísla šarže, kdy testy probíhaly na stejném vzorku za stejných podmínek tentýž den.

Reprodukovatelnost je míra variability testu a byla stanovena na základě variability mezi jednotlivými vzorky, jednotlivými dny a jednotlivými dávkami. Reprodukovatelnost mezi jednotlivými dny byla vyhodnocena analýzou stejných vzorků ve třech různých dnech. Reprodukovatelnost mezi jednotlivými šaržemi byla vyhodnocena analýzou stejných vzorků tentýž den pomocí tří různých čísel šarží sondy. Reprodukovatelnost mezi jednotlivými vzorky byla hodnocena analýzou tří replikátů vzorku ve stejný den. Pro každý vzorek byly zaznamenány signálové vzory 100 interfázních buněk a bylo vypočteno procento buněk s předpokládaným signálovým vzorem.

Reprodukovatelnost a přesnost byly vypočteny jako směrodatná odchylka (STDEV) mezi replikáty pro každou proměnnou a jako celková střední hodnota STDEV.

Tabulka 4. Reprodukovatelnost a přesnost CLL PROFILER Kit

Variabilní	Směrodatná odchylka (STDEV)	
	Deleční/enumerací sonda D13S319/13qter/12cen	Sonda P53/ATM
Přesnost	1,28	1,37
Mezi vzorky	1,30	1,60
Mezi dny	4,12	2,27
Mezi šaržemi	2,04	1,77
Celková odchylka	3,30	1,98

Klinická funkce

Klinická funkce byla stanovena na základě reprezentativního vzorku populace, pro niž je produkt určen. Pro každý vzorek byly zaznamenány signálové vzory ≥ 100 interfázních buněk. Bylo provedeno normální/abnormální stanovení porovnáním procenta buněk se specifickým abnormálním signálovým vzorem ve srovnání s normální mezní hodnotou. Výsledky byly poté porovnány se známým stavem vzorku.

Výsledky klinických dat byly analyzovány za účelem stanovení senzitivity, specifity a mezní hodnoty pomocí jednodimenzního přístupu.

Tabulka 5. Klinická funkce CLL PROFILER Kit

Přeskupení	Klinická senzitivita (míra skutečné positivity, TPR)	Klinická specifita (míra skutečné negativity, TNR)	Míra falešné positivity (FPR) = 1 – specifita
<i>Deleční/enumerací sonda D13S319/13qter/12cen</i>			
Delece D13S319	96,6%	99,5%	0,5%
Trizomie 12	100%	100,0%	0%
<i>Sonda P53/ATM</i>			
Delece P53	100%	100%	0%
Delece ATM	100%	100%	0%

Další informace

Další informace o produktu vám sdělí oddělení technické podpory společnosti CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048

E-mail: techsupport@cytoCELL.com

Web: www.ogt.com

Reference

- Rossi D, *et al.*, Blood. 2013 Feb 21;121(8):1403-12
- Baliakas P, *et al.*, Leukemia. 2014;(April):1-8
- Stankovic *et al.*, Blood 2004;103(1):291-300
- Dohner *et al.*, N Eng J Med 2000;343:1910-1916
- Khanna *et al.*, Nature Genetics 1998;20(4):398-400
- Juliusson G *et al.*, N Eng J Med 1990;323:720-4
- Puiggros *et al.*, Biomed Res Int 2014;1:1-13
- Kasar *et al.*, Nature Communications 2015;6:1-12
- Hammarsund M *et al.*, FEBS Letters 2004;556:75-80
- Van Dyke DL *et al.*, Br J Haematology 2009;148:544-50
- Liu Y *et al.*, Oncogene 1997;15:2463-73
- Wolf S *et al.*, Hum Mol Genet 2001;10:1275-85
- Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
- 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.

Průvodce symboly

REF	cz: Katalogové číslo
IVD	cz: Zdravotnický diagnostický prostředek <i>in vitro</i>
LOT	cz: Kód šarže
	cz: Viz návod k použití
	cz: Výrobce
	cz: Datum spotřeby
	cz: Omezení teploty
	cz: Chraňte před slunečním světlem
	cz: Množství dostačuje k provedení <n> testů
CONT	cz: Obsah

Patenty a ochranné známky

CytoCell je registrovaná ochranná známka společnosti CytoCell Ltd.

CytoCell Ltd.

Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, Spojené království
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E-mail: probes@cytoCELL.com
W: www.ogt.com

