



A Sysmex Group Company



Kasutusjuhend

REF: LPH 022-S/LPH022

Sond CBF β (CBFB)/MYH11 Translocation, Dual Fusion Probe



AINULT ERIALASEKS KASUTAMISEKS



www.cytoCELL.com

Lisateave ja muud keeled on saadaval aadressil www.ogt.com

Piirangud

Seade on loodud tuvastama murdepunktidega ümberkorraldusi sondikomplekti punase ja rohelise klooniga kaetud piirkonnas, mis sisaldab CBF β ja MYH11 piirkondi. Piirkonnast väljajäävaid murdepunkte või alternatiivseid ümberkorralduste variante, mis jäävad selle piirkonna sisse, ei pruugita selle tootega tuvastada.

See analüüs pole ette nähtud kasutamiseks iseseisva diagnostilise vahendina, prenataalseks analüüsimiseks, populatsioonipõhiseks skriininguks, patsiendilähedaseks analüüsimiseks või iseendal analüüsimiseks. See toode on ette nähtud vaid erialaseks laboratoorseks kasutamiseks; kõiki tulemusi tuleks tõlgendada vastava väljaõppega personalil poolt võttes arvesse teisi asjakohaseid analüüsitulemusi.

Seda toodet ei ole valideeritud kasutamiseks muude proovitüüpide ega haigustüüpide korral, kui ainult nende, mis on kasutusotstarbes täpsustatud.

FISH-i tulemuste tõlgendamine ja teavitamine peab vastama erialastele kutsesstandarditele ja peaks arvesse võtma muud kliinilist ja diagnostilist teavet. See komplekt on ette nähtud muude laboratoorsete analüüside täiendamiseks ja analüüside vaheliste kromosomaalsete ümberkorralduste tuvastamiseks Carnoy lahuses (3:1 metanool/atseethape) fikseeritud hematoloogilist tuletatud rakuspensioonides, mis pärinevad kinnitatud või kahtlustatud ägeda müeloidse leukeemiaga (AML) patsientidelt.

Seda komplekti ei ole valideeritud kasutamiseks muul kui kasutusotstarbes esitatud eesmärgil.

Kasutusotstarve

Sond CytoCell CBF β /MYH11 Translocation, Dual Fusion Probe on kvalitatiivne, mitteautomaatne, fluorestsents *in situ* hübriidatsiooni (FISH) uuring, mida kasutatakse 16. kromosoomi 16p13.1 piirkonnas ja 16. kromosoomi 16q22 piirkonnas vaheliste kromosomaalsete ümberkorralduste tuvastamiseks Carnoy lahuses (3:1 metanool/atseethape) fikseeritud hematoloogilist tuletatud rakuspensioonides, mis pärinevad kinnitatud või kahtlustatud ägeda müeloidse leukeemiaga (AML) patsientidelt.

Näidustused

See toode on loodud täiendusena teistele kliinilistele ja histopatoloogilistele uuringutele tunnustatud diagnostilistes ja kliinilistes raviteedes, kus teadmised CBF β -MYH11 translokatsiooni oleku kohta on kliinilise ravi seisukohalt olulised.

Analüüsi põhimõte

Fluorestsents *in situ* hübriidatsioon (FISH) on meetod DNA järjestuste tuvastamiseks metafaasi kromosoomides või fikseeritud tsütogeneetiliste proovide interfaasi tuumades. Meetod kasutab DNA sonde, mis hübriidseeritakse kogu kromosoomi või üksiku unikaalsejärjestusega ning toimib G-vöödi tsütogeneetiliste analüüside võimeka täiendusena. Seda meetodit saab nüüd rakendada prenataalse, hematoloogilise ja tahtke kasvaja kromosomaalse analüüsi esmatahtsa uuringu tööriistana. Fikseeritud ja denatureeritud sihtmärk-DNA on saadaval sarnase denatureeritud, fluorestsentsmarkeriga DNA sondiga paardumiseks, millel on komplementaarne järjestus. Peale hübriidseerimist eemaldatakse seondumata ja ebaspetsiifiliselt seotud DNA sond ning DNA visualiseeritakse vastandvärvisega. Seejärel võimaldab fluorestsentsmikroskoopia hübriidseeritud sondi visualiseerimist sihtmärkmaterjalil.

Sondi teave

CBF β (tuumasiduva faktori beeta-alamühik) geen on asukohas 16q22.1 ja MYH11 (müoosiini raske ahel 11) geen on asukohas 16p13.11. Inversioon inv(16)(p13.1;q22.1) ja translokatsioon t(16;16)(p13.11;q22.1) põhjustavad CBF β -MYH11 fusioonigeeni

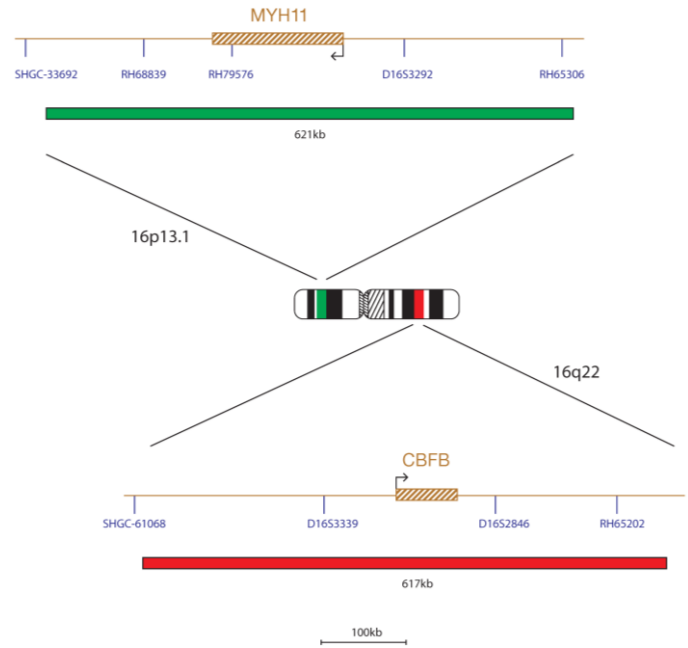
Inversiooniga inv(16)(p13.1;q22.1) or t(16;16)(p13.11;q22.1) ägedad müeloidsed leukeemiad moodustavad tunnustatud haigusüksuse vastavalt Maailma Terviseorganisatsiooni (WHO) müeloidsete kasvujate ja ägeda leukeemia klassifikatsioonile¹. Neid ümberkorraldusi leitakse sageli patsientidel, kellel on suurenenud eosinofiilide arvuga luuüdis müelomonotsütaarne alamliik, AML-i FAB (Prantsuse-Ameerika-Briti klassifikatsioon) tüüp M4Eo, ja neid leidub 5–8%¹ kõifist AML-dest. See ümberkorraldus võib esineda ka raviga seotud AML-ga^{1,2}.

CBFB-MYH11 ümberkorraldused on AML-ga patsientide puhul klassifitseeritud soodsa tsütogeneetilise riskiga rühma^{3,4}.

Murdepunktis esinevad CBFB 5. intronis ja MYH11 5. intronis. CBFB N-terminali multimerisatsiooni domeen sulandub MYH11 C-terminaliga. Tekkinud kimäärne valk vähendab aktiivse CBF-i hulka. Samuti kogunevad CBFB-MYH11/CBFA multimeerid tuuma. CBFB reguleerib teatud ADP-ribosüülimisfaktoreid (ARF-d) ja teiste tuumorsupressorgeenide (TSG-d) ekspressiooni, mistõttu arvatakse, et fusioonivalk pärsib TSG ekspressiooni⁵.

Sondi spetsifikatsioon

CBF β , 16q22.1, punane
MYH11, 16p13.11, roheline



Punasega märgistatud CBF β sond hõlmab 617 kb piirkonda 16q22.1 sees ja sisaldab CBF β geeni. Rohelisega märgistatud MYH11 sond hõlmab 621 kb piirkonda 16p13.11 sees ja sisaldab MYH11 geeni.

Tarnitavad materjalid

Sond 50 µl vialli kohta (5 analüüsi) või 100 µl vialli kohta (10 analüüsi)
Sondid tarnitakse hübriidseerimislahusega eelsegatuna (formamiid, dekstraansulfaat, naatriumtsitraadi soolalahus (saline-sodium citrate, SSC)) ja on valmis kasutamiseks.

Vastandvärv

150 µl vialli kohta (15 analüüsi)
Vastandvärv on DAPI, pleekimisvastane (Sisaldus: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenüülindool)).

Hoiatused ja ettevaatusabinõud

1. *In vitro* diagnostiliseks kasutamiseks. Ainult erialaseks kasutamiseks.
2. DNA sondide ja DAPI vastandvärviga käsitsemisel kandke kindaid.
3. Sondi segud sisaldavad formamiidi, mis on teratogeenne; ärge hingake sisse auru ning vältige kontakti nahaga. Käsitsege ettevaatlikult; kasutage kindaid ja laborikilti.
4. DAPI on potentsiaalne kartsinogeen. Käsitsege ettevaatlikult; kasutage kindaid ja laborikilti.
5. Vabaneged kõigist ohtlikest jäätmest oma asutuse ohtlike jäätmekäitluse eeskirjade kohaselt.
6. Kasutajad peavad olema suutlised eristama punast, sinist ja rohelist värvi.
7. Esitatud protokoll ja reaktiivide järgimata jätmine võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.
8. Sondi ei tohiks lahjendada ega segada teiste sondidega.
9. Sondi 10µl kasutamata jätmine protokoll denatureerimise etapis võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.

Säilitamine ja käsitsemine



Komplekti tuleks säilitada külmutatuna temperatuurivahemikus $-25\text{...}-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ kuni kehtivusaaja lõpuni, mis on esitatud toote etiketil. Sondi ja vastandvärvi viaale tuleb säilitada pimedas.



Sond säilitab stabiilsuse normaalse kasutamise ajal esinevate sulatamise ja külmutamise tsüklite kestel (kus üks tsüklil kestab sondi eemaldamisest külmikust kuni sinna tagasipanekuni) ja on fotostabiilne kuni 48 tundi peale pideva valgusega kokkupuudet. Piirake iga hinna eest kokkupuudet valgusega ja temperatuurimuutustega.

Seadmed ja materjalid mis on vajalikud, kuid mida ei tarnita

Kasutada tuleb kalibreeritud seadmeid.

1. Kuumutusplaat (täisplaadi ja täpse temperatuuriregulaatoriga kuni $80\text{ }^{\circ}\text{C}$)
2. Kalibreeritud erineva mahuga mikropipetid ja otsikud vahemikus $1\text{--}200\text{ }\mu\text{l}$
3. Vesivann, täpse temperatuuriregulaatoriga $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures
4. Mikrotsentrifuugi katsutid ($0,5\text{ ml}$)
5. Fluorestsentsmikroskoop (vt fluorestsentsmikroskoobi soovitude lõiku)
6. Faasikontrastmikroskoop
7. Läbipaistvast plastist, keraamilised või kuumakindlast klaasist Coplini anumad
8. Pintsetid
9. Kalibreeritud pH-meeter (või pH indikaatorribad vahemikus pH $6,5\text{--}8,0$)
10. Niiskuskamber
11. Fluorestsentsmikroskoobi immersioonõli
12. Tsentrifuug
13. Mikroskoobi alusklasisid
14. $24\times 24\text{ mm}$ katteklasisid
15. Taimer
16. $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubaator
17. Katteklasi liim
18. Vortex-segisti
19. Gradueeritud silindrid
20. Magnetsegisti
21. Kalibreeritud termomeeter

Valikulised seadmed, mida ei tarnita

1. Tsütogeneetiline kuivatuskamber

Vajalikud reaktiivid, mida ei tarnita

1. 20-kordne naatriumsitraadi soolalahus (SSC)
2. 100%-line etanool
3. Tween-20
4. 1M naatriumhüdroksiid (NaOH)
5. 1M vesinikloriid (HCl)
6. Destilleeritud vesi

Fluorestsentsmikroskoobi soovitus

Kasutage optimaalseks visualiseerimiseks 100-vatist elavhõbelampi või sellega samaväärset ning immersioonõliga apokromaatselt objektiiv 60/63-kordse või 100-kordse suurendusega. Selles sondi kompleksis kasutatud fluorofoorid aktiveeruvad ja emitteerivad järgnevatel lainepikkustel:

Fluorofoor	Eksitatsioon _{max} [nm]	Emissioon _{max} [nm]
Roheline	495	521
Punane	596	615

Veenduge, et asjakohased eksitatsiooni- ja emissioonfiltrid, mis hõlmavad eespool esitatud lainepikkusi, on mikroskoopi paigaldatud. Kasutage kolme spektri läbilaskevõimega DAPI/roheline spektri/punase spektri filtrit või kahe spektri läbilaskevõimega roheline spektri/punase spektri filtrit roheline ja punase fluorofoori samaaegselt optimaalseks visualiseerimiseks.

Kontrollige enne kasutamist fluorestsentsmikroskoopi, et veenduda selle korrasolekus. Kasutage immersioonõli, mis on fluorestsentsmikroskoopiaks sobiv ja on madala autofluorestsentsiga. Vältige pleekimisvastase DAPI segamist immersioonõliga, kuna see segab signaali. Järgige tootja soovitusi lambi tööaja ja filtrite vanuse kohta.

Proovi ettevalmistamine

Komplekt on loodud kasutamiseks hematoloogilisel tuletatud rakususpensioonidega, mis on fikseeritud Carnoy lahuses (3:1 metanool/atseetahape) ja ette valmistatud vastavalt labori või asutuse eeskirjadele. Valmistage ette õhu käes kuivatatud mikroskoobi alusklasisid vastavalt tsütogeneetika standardprotseduuridele. AGT *Tsütogeneetika laborijuhend* sisaldab soovitusi proovi kogumise, kultuuri istutamise, kogumise ja slaidi tegemise kohta.

Lahuse ettevalmistamine

Etanooli lahused

Lahjendage 100% etanool destilleeritud veega, jälgides suhtarvu ja põhjalikult segades.

- 70%-line etanool – 7 osa 100%-list etanooli suhtes 3 osa destilleeritud vett
 - 85%-line etanool – 8,5 osa 100%-list etanooli suhtes 1,5 osa destilleeritud vett
- Säilitage lahuseid kuni 6 kuud toatemperatuuril õhukindlas nõus.

2x SSC lahuse

Lahjendage 1 osa 20-kordset SSC lahust 9 osa destilleeritud veega ja segage põhjalikult. Kontrollige pH-d ja kohandage, kuni pH on 7,0, kasutades NaOH või HCl vastavalt vajadusele. Säilitage lahust kuni 4 nädalat toatemperatuuril õhukindlas nõus.

0,4 x SSC lahuse

Lahjendage 1 osa 20-kordset SSC lahust 49 osa destilleeritud veega ja segage põhjalikult. Kontrollige pH-d ja kohandage, kuni pH on 7,0, kasutades NaOH või HCl vastavalt vajadusele. Säilitage lahust kuni 4 nädalat toatemperatuuril õhukindlas nõus.

2x SSC, 0,05% Tween-20 lahuse

Lahjendage 1 osa 20-kordset SSC lahust 9 osa destilleeritud veega. Lisage 5 μl Tween-20 10 ml kohta ja segage põhjalikult. Kontrollige pH-d ja kohandage, kuni pH on 7,0, kasutades NaOH või HCl vastavalt vajadusele. Säilitage lahust kuni 4 nädalat toatemperatuuril õhukindlas nõus.

FISH-i protokoll

(Märkus. Veenduge, et sondi ja vastandvärvi kokkupuude labori valgustusega oleks kogu aeg piiratud).

Slaidi ettevalmistamine

1. Tilgutage rakuproov mikroskoobi klaasist alusklasisse. Laske kuivada. (**Valikuline, kui kasutatakse tsütogeneetilist kuivatuskambrit:** slaidid tuleks valmistada tsütogeneetilist kuivatuskambrit kasutades. Optimaalseks slaidi valmistamiseks tuleks kambrit kasutada temperatuuril ligikaudu $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja õhuniiskusel 50%. (Kui tsütogeneetiline kuivatuskamber ei ole kättesaadav, kasutage alternatiivina tõmbekappi).
2. Kastke slaidid toatemperatuuril 2 minutiks 2-kordsesse SSC lahusesse ilma segamata.
3. Dehüdrateerige etanoolilahuste seerias (70%, 85% ja 100%), igas 2 minutit toatemperatuuril.
4. Laske kuivada.

Enne denaturatsiooni

5. Eemaldage sond külmikust ja laske sel soojeneda toatemperatuurile. Tsentrifugeerige katsuteid lühidalt enne kasutamist.
6. Veenduge, et sondi lahust on ühtlaselt segunenud, kasutades pipetti.
7. Eemaldage 10 μl sondi analüüsi kohta ja viige see mikrotsentrifuugi katsutisse üle. Tagastage ülejäänud sond kiiresti külmikusse.
8. Asetage sond ja proovislaid 5 minutiks kuumutusplaadile eelsoojenema temperatuurile $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).
9. Tilgutage 10 μl sondisegu rakuproovile ja asetage ettevaatlikult katteklasi. Lisage katteklasi liim ja laske liimil täielikult kuivada.

Denaturatsioon

10. Denatureerige proov ja sond üheaegselt, kuumutades slaidi kuumutusplaadil temperatuuril $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) 2 minutit.

Hübriidsatsioon

11. Asetage slaid niiskesse valguskindlasse kambris temperatuurile $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), laske seista üleöö.

Hübriidsatsioonijärgsed pesud

12. Eemaldage DAPI külmikust ja laske soojeneda toatemperatuurile.
13. Eemaldage ettevaatlikult katteklasisid ja kõik liimijälgid.
14. Kastke slaidid 2 minutiks ilma segamata 0,4-kordsesse SSC lahusesse (pH 7,0) temperatuuril $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).
15. Kuivatage slaid ja kastke see 30 sekundiks ilma segamata 2-kordsesse SSC lahusesse, 0,05% Tween-20 lahusesse, toatemperatuuril (pH 7,0).
16. Kuivatage slaid ja lisage igale proovile 10 μl pleekimisvastast DAPI-d.
17. Katke katteklasisiga, eemaldage mullid ja laske värvil pimedas kujuneda 10 minutit.
18. Vaadake fluorestsentsmikroskoobiga (vt **Fluorestsentsmikroskoobi soovitus**).

Valmis slaidide stabiilsus

Valmis slaidid on analüüsivad kuni 1 kuu, kui neid hoitakse pimedas toatemperatuuril või alla selle.

Protseduuri soovitus

1. Slaidide keetmine või aegumine võib fluorestsentssignaali nõrgendada.
2. Cytocell Ltd poolt toodetud või soovitatud reaktiivide asemel muude reaktiivide kasutamine võib ebasoodsalt mõjutada hübriidiseerimistingimusi
3. Kasutage lahuste, vesivannide ja inkubaatorite temperatuuri mõõtmisel kalibreeritud termomeetrit, sest need temperatuurid on toote optimaalseks toimimiseks kriitilise tähtsusega.
4. Pesukontsentratsioonid, pH ja temperatuurid on olulised, kuna vähene rangus võib põhjustada sondi ebaspetsiifilist sidumist ja liiga suur rangus võib põhjustada signaali puudumist
5. Mittetäielik denatureerimine võib põhjustada signaali puudumist ja üleliigne denatureerimine võib samuti põhjustada ebaspetsiifilist seondumist
6. Üleliigne hübriidiseerimine võib põhjustada täiendavaid või ootamatuid signaale
7. Kasutajad peaksid enne analüüsi kasutamist diagnostilisel eesmärgil protokoli oma proovidega optimeerima
8. Suboptimaalsed tingimused võivad põhjustada ebaspetsiifilist seondumist, mida võidakse ekslikult sondi signaalina tõlgendada

Tulemuste tõlgendamine

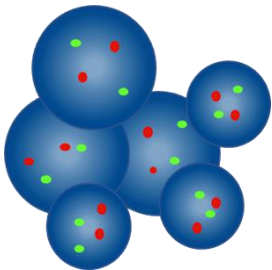
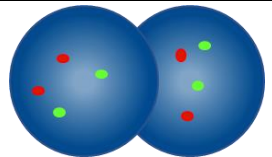
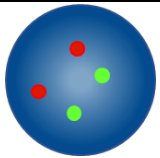
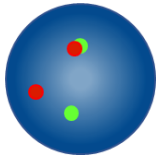
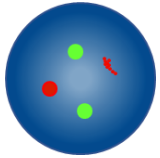
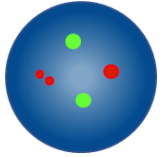
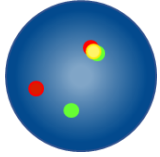
Slaidi kvaliteedi hindamine

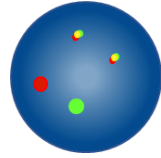
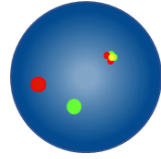
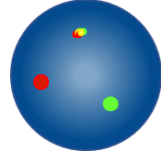
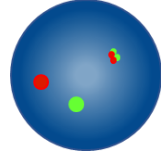
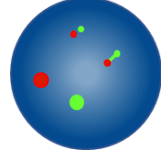
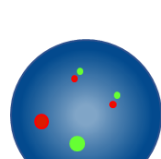
Slaidi ei tohiks analüüsida, kui

- signaalid on ühe filtriga analüüsimiseks liiga nõrgad – analüüsi jätkamiseks peaksid signaalid olema eredad, selged ja lihtsalt hinnatavad;
- liiga palju kokkukleepunud/kattuvaid rakke segavad analüüsimist;
- üle 50% rakkudest pole hübriidseeritud;
- rakkude vahel on üleliigsed fluorestsentsosakesed ja/või fluorestsentshägud, mis segab signaali – optimaalsetel slaididel peaks taust tunduma tume või must ja puhas;
- rakutuuma piire ei saa eristada ja need pole terviklikud.

Analüüsi eeskirjad

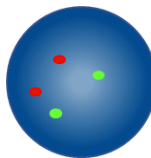
- Igat proovi peaks analüüsima ja tõlgendama kaks analüütikut. Kõik lahknemused tuleks lahendada kolmanda analüütiku hinnanguga
- Analüütikud peaks olema riiklikult tunnustatud standardite kohase väljaõppega.
- Iga analüütik peaks hindama eraldi 100 tuuma iga proovi kohta. Esimene analüütik peaks alustama slaidi vasakult küljelt ja teine analüütik paremat küljelt.
- Iga analüütik peaks oma tulemused üles märkima eraldi andmekandjale.
- Analüüsige vaid terviklikke tuumi, mitte kattuvaid või kokkukleepunud või tsütoplasma jääkidega kaetud ega autofluorestsereivaid tuumi.
- Vältige alasid, kus esineb liigseid tsütoplasma jääke või ebaspetsiifilist hübriidseerimist.
- Signaali tugevus võib vahelduda, isegi ühe tuuma piires. Sellistel juhtudel kasutage üksikfiltrid ja/või kohandage fokaaltasandit.
- Suboptimaalsete tingimuste korral võivad signaalid hajuda. Kui kaks sama värvi signaali puutuvad kokku või nendevaheline kaugus on väiksem kui kaks signaalipikkust või signaale ühendab ähmane niit, lugege signaalid üheks.
- Kui kahtlete, kas proov on analüüsimiseks sobiv, siis ärge analüüsige seda.

Analüüsi eeskirjad	
	Mitte lugeda, kui tuumad on piiride määramiseks üksteisele liiga lähedal
	Mitte lugeda kattuvaid tuumasid, sest mõlema tuumi kõik alasid ei ole näha
	Eeldatav normaalne signaalimuster (2P, 2R)
	Normaalne signaalimuster (2P, 2R) – kolokaliseeritud üks punane ja üks roheline signaal
	Normaalne signaalimuster (2P, 2R) – üks kahest punasest signaalist on difuusne
	Normaalne signaalimuster (2P, 2R) – ühe punase signaali tühimik on kahest signaalipikkusest väiksem
	Normaalne signaalimuster (2P, 2R) – kolokaliseeritud üks punane ja üks roheline signaal

	Eeldatav ebanormaalne signaalimuster (1P, 1R, 2F) - punase ja rohelised fusioonisignaali on proportsionaalselt väiksemad
	Eeldatav ebanormaalne signaalimuster (1P, 1R, 2F) - kolokaliseeritud fusioonisignaali
	Eeldatav ebanormaalne signaalimuster (1P, 1R, 2F) - kolokaliseeritud fusioonisignaali
	Eeldatav ebanormaalne signaalimuster (1P, 1R, 2F) - kaks fusioonisignaali üksteise kõrval
	Lugeda ühe punase, ühe rohelise ja kahe fusioonisignaali, kui üks fusioonisignaali on difuusne
	Lugeda ühe punase, ühe rohelise ja kahe fusioonisignaali, kui punase ja rohelise signaali vaheline tühimik fusioonides on kahest signaalipikkusest väiksem ja fusiooni punane ja roheline signaal on proportsionaalselt väiksem

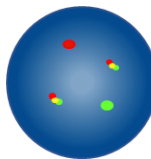
Eeldatavad tulemused

Eeldatav normaalne signaalimuster



Normaalse raku eeldatav tulemus on kaks punast ja kaks rohelist signaali (2P, 2R).

Eeldatav ebanormaalne signaalimuster



Inv(16) või t(16;16)(p13;q22) translokatsiooniga rakus on eeldatav signaalimuster üks punane, üks roheline ja kaks fusiooni (1P, 1R, 2F).

Aneuploidsete/tasakaalustamata proovides võivad esineda teised signaalimustrid.

Teadaolev ristreaktiivsus

Teadaolev ristreaktiivsus puudub.

Kõrvalnähtudest teatamine

Kui usute, et see toode ei toimi või selle toimivus on halvenenud ning selle toimel võis esineda kõrvalnäht (nt hilinenud või valediagnoos, hilinenud või ebasobiv ravi), tuleb sellest tootjat kohe teavitada (**email**: vigilance@ogt.com).

Kui see on kohandatav, tuleks sündmusest teavitada riiklikule pädevale asutusele. Pädevate ametiasutuste loend on esitatud lehel <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Spetsiifilised toimumiskarakteristikud

Analüütiline spetsiifilisus

Analüütiline spetsiifilisus on vaid õige lookusega hübridiseeritud signaalide protsent. Analüütiline spetsiifilisus saavutati kokku 200 sihtmärk-lookuse analüüsimisel. Analüütiline spetsiifilisus arvatati, jagades õige lookusega hübridiseeritud FISH-i signaalide arvu kogu hübridiseeritud FISH-i signaali arvuga.

Tabel 1. Sond CBFβ/MYH11 Translocation, Dual Fusion Probe analüütiline spetsiifilisus

Sond	Sihtmärk-lookus	Õige lookusega hübridiseeritud signaalide arv	Hübridiseeritud signaalide koguarv	Spetsiifilisus (%)
Punane CBFβ	16q22	200	200	100
Roheline MYH11	16p13	200	200	100

Analüütiline tundlikkus

Analüütiline tundlikkus on hinnatavate interfaasi rakkude protsent eeldatava normaalse signaalimustri suhtes. Analüütiline tundlikkus saavutati interfaasi rakkude analüüsimisel erinevates normaalses proovides. Tundlikkus arvatati hinnatavate rakkude ja eeldatava signaalimustri protsentsuhtena (95%-lise usaldusvahemikuga).

Tabel 2. Sond CBFβ/MYH11 Translocation, Dual Fusion Probe analüütiline tundlikkus

Eeldatava signaalimustriga rakkude arv	Hinnatava signaaliga rakkude arv	Tundlikkus (%)	95% usaldusvahemik
4947	5000	98,94	98,62—99,19

Normaalse väljaarvamise piirväärtuste kirjeldus

FISH-i sondidega seotud normaalse väljaarvamise piirväärtus on hinnatavate, teatud ebanormaalse signaalimustriga interfaasi rakkude suurim protsent, mille juures proov hinnatakse normaalseks.

Normaalne väljaarvamise piirväärtus määrati proovidega, mis olid negatiivsed ümberkorralduse suhtes, mida sond peaks tuvastama, ja beeta-pöördefunktsiooniga. Iga proovi kohta salvestati 100 interfaasi raku signaalimustrid kahe sõltumatu analüüti poolt, kokku 200 proovi kohta.

Tabel 3. Sond CBFβ/MYH11 Translocation, Dual Fusion Probe normaalse väljaarvamise piirväärtuste kirjeldus

Ebanormaalne signaalimuster	Väljaarvamise piirväärtuse loomiseks analüüsitud proovide arv	Proovi kohta hinnatud tuumade arv	Max valepositiivsete signaalimustrite arv	Normaalne väljaarvamise piirväärtus (%)
1P, 1R, 2F	1300	200	1	2,3

Laborid peavad oma andmete põhjal väljaarvamise piiri kinnitama^{6,7}.

Täpsus ja reprodutseeritavus

Reprodutseeritavus tehti kindlaks kolme eraldi labori poolt, kes testisid kuu pimedat proovi (kaks ümberpaigutamise suhtes negatiivset, kaks nõrgalt positiivset proovi, mis ületasid piirväärtust 1–3 korda, ja kaks tugevalt positiivset proovi, mis sisaldasid üle 45% ümberpaigutamise suhtes positiivseid rakke). Analüüs viidi läbi iga proovist kahe replikaadiga veel järjestikusel päeval.

Kõik kolm asutust viisid läbi päevasise, päevadevahelise ja asutusevahelise testimise, kasutades ühte ja sama sondi partiid, samas kui üks asutus teostas ka partiidevahelise reprodutseeritavuse testimise, kasutades kolme erinevat sondi partiid.

Reprodutseeritavus arvatati, kasutades katse ajal uuritud muutujate vahelist ühilduvust.

Tabel 4. Sond CBFβ/MYH11 Translocation, Dual Fusion Probe reprodutseeritavus ja täpsus

Reprodutseeritavuse uuring	Proov	Ühilduvus (%)
Päevasisene/päevadevaheline/asutustevaheline	Negatiivne	100
	Tugevalt positiivne	100
Partiidevaheline	Negatiivne	100
	Tugevalt positiivne	100

Kliiniline toimumis

Kliiniline toimumis määrati, kasutades AML-i või MDS-i tõttu kahte erinevasse asutusse suunatud esindusliku valimata patsientide komplekti (100 proovi koguti esimesest asutusest ja 266 proovi koguti teisest asutusest). Sondiga tuvastatud ümberkorralduste esinemismäärasid võrreldi kirjandusallikate ülevaatest kogutud andmetega.

Selle võrdluse võimaldamiseks arvatati kirjanduses esitatud usaldusvahemik 100 proovi populatsiooni suuruse kohta, arvatades 1–proovi proportsioonide testi koos jätkuva korrigeerimisega.

Tabel 5. Sond CBFβ/MYH11 Translocation, Dual Fusion Probe kliiniline toimumis

Ümberkorraldus	Levimus				
	Kirjanduse ülevaade (%)	95% LCI (%)	Asutus 1 (%)	Asutus 2 (%)	95% UCI (%)
AML inv(16)/CBFB-MYH11 ümberkorraldusega	5,3	2,0	2	2,63	12,2

Lisateave

Lisateavet saate kontakteerudes ettevõtte CytoCell tehnilise toe osakonnaga.

Tel: +44 (0)1223 294048







E-mail: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

Viited

- Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
- Hernández *et al.*, Haematologica 2000;85(5):481-5.
- Moreno-Miralles *et al.*, J Biol Chem 2005;280(48):40097-103
- Grimwade *et al.*, Blood 2010;116(3):354-365
- Arsham, MS., Barch, M.J. 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.

Sümbolite seletus

REF	et: Kataloogi number
IVD	et: <i>In vitro</i> diagnostiline meditsiiniseade
LOT	et: Partii number
	et: Vt kasutusjuhised
	et: Tootja
	et: Kõlblik kuni
	et: Temperatuuripiirang
	et: Hoidke päikesevalguse eest kaitstult
	et: Sisaldus piisav <n> analüüsi jaoks
CONT	et: Sisu

Patendid ja kaubamärgid

CytoCell on CytoCell Ltd registreeritud kaubamärk.



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

W: www.ogt.com