



A Sysmex Group Company



## Kasutusjuhend

REF: LPH 019-S / LPH 019

### E2A (TCF3) Breakapart Probe



AINULT ERIALASEKS KASUTAMISEKS



www.cytocell.com

Lisateave ja teave muudes keeltes on saadaval aadressil [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

#### Piirangud

Toode on mõeldud tuvastama murdepunktidega ümberkorraldusi sondikomplekti punase ja roheline klooniga seotud piirkonnas, mis sisaldab E2A (TCF3) piirkonda. 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 isenda analüüsimiseks. See toode on ette nähtud vaid erialaseks laboratoorseks kasutamiseks; kõiki tulemusi peab tõlgendama vastava väljaõppega personal võttes arvesse muid asjakohaseid analüüsitulemusi.

See toode ei sobi kasutamiseks muude proovitüüpide ega haigustüüpide korral, kui ainult nende, mis on kasutusotstarbes täpsustatud.

FISH-i tulemuste tõlgendamine ja teavitamine peab vastama erialastele kutsestandarditele ja arvesse võtma muud kliinilisi ja diagnostilisi teavet. See komplekt on ette nähtud muude laboratoorse analüüside täiendamiseks ja ravi ei tohi alustada, põhinedes ainult FISH-i tulemustel.

Protokoll järgimata jätmine võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.

See komplekti ei sobi kasutamiseks muul kui kasutusotstarbes toodud eesmärgil.

#### Kasutusotstarve

CytoCell E2A (TCF3) Breakapart Probe on kvalitatiivne, mitteaumatne, fluorestsents *in situ* hübriidatsiooni (FISH) analüüs, mida kasutatakse 19. kromosoomi 19p13.3 piirkonna kromosomaalsete ümberkorralduste tuvastamiseks kromosoomi või üksiku unikaalse järjestusega ning toimib G-vöödi tsütogeneetiliste analüüside võimeka täiendusena. Seda meetodit saab nüüd rakendada prenataalse, hematoloogilise ja tahke kasvaja kromosomaalse analüüsi esmatähtsa 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 vastandvärvimisega. Seejärel võimaldab fluorestsentsmikroskoopia hübriidseeritud sondi visualiseerimist sihtmärkmaterjalil.

#### Näidustused

See toode on välja töötatud täiendusena muudele kliinilistele ja histopatoloogilistele analüüsidele tunnustatud diagnostilistes ja kliinilistes raviteedes, kus teadmised E2A (TCF3) ümberkorralduse oleku kohta on kliinilise ravi seisukohalt olulised.

#### Analüüsi põhimõte

Fluorestsents *in situ* hübriidatsiooni (FISH) on meetod DNA järjestuste tuvastamiseks metafaasi kromosoomides või fikseeritud tsütogeneetiliste proovide interfaasi tuumades. Meetod kasutab DNA sonde, mis hübriidseeruvad kogu kromosoomi või üksiku unikaalse järjestusega ning toimib G-vöödi tsütogeneetiliste analüüside võimeka täiendusena. Seda meetodit saab nüüd rakendada prenataalse, hematoloogilise ja tahke kasvaja kromosomaalse analüüsi esmatähtsa 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 vastandvärvimisega. Seejärel võimaldab fluorestsentsmikroskoopia hübriidseeritud sondi visualiseerimist sihtmärkmaterjalil.

#### Sondi teave

TCF3 (*transkriptsioonifaktor 3*) geeni asukoht on 19p13.3. TCF3 hõlmavad translokatsioonid on ühed kõige sagedamatest ümberkorraldustest lapseea B-rakulise ägeda lümfoblastleukeemia (ALL) korral.<sup>1,2</sup>

TCF3 kaks põhipartnerit on PBX1 (*PBX homeojärjestus 1*) asukohas 1q23.3 ja HLF (*HLF transkriptsioonifaktor, PAR bZIP perekonnaliige*) asukohas 17q22. Need ühendatakse TCF3-ga t(1;19)(q23;p13) ja t(17;19)(q22;p13) translokatsioonide tõttu, mis moodustavad vastavalt TCF3-PBX1 ja TCF3-HLF ühendgeeni. On leitud, et harvaesinev krüptiline inversioon inv(19)(p13;q13) ühendab TCF3 ja TFPT (*TCF3 ühendpartner*), moodustades TCF3-TFPT ühendgeeni.<sup>1</sup>

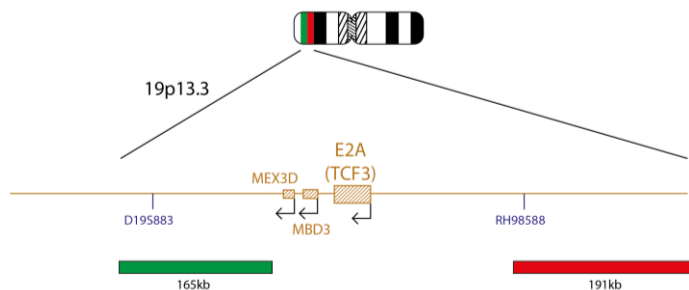
t(1;19)(q23;p13) on kõige sagedasem TCF3 ümberkorraldus, mida esineb 6% lapseea B-ALL-i juhtude korral.<sup>1,2</sup> Vastavalt Maailma Terviseorganisatsiooni (WHO) müeloidsete kasvajate ja ägeda leukeemia klassifikatsioonile moodustab t(1;19)(q23;p13); TCF3-PBX1-ga B-lümfoblastleukeemia eraldi haigusüksuse.<sup>2</sup> Funktsionaalne ühendgeen asub 19. kromosoomis. On teatatud translokatsiooni tasakaalustamata vormist der(1) kaoga.<sup>1,2</sup> E2A-PBX1 fusiooni tuvastamine molekulaarse meetoditega nagu FISH on oluline, kuna B-ALL-ide alamtüüpidel on karüotüüpiliselt identne t(1;19), kuid see ei hõlma geene TCF3 ega PBX1. E2A-PBX1 positiivset leukeemiat seostati ajalooliselt halva prognoosiga, kuid tänapäevased intensiivsed ravivõimalused on selle probleemi lahendanud.<sup>1,2,4</sup>

t(17;19)(q22;p13) on harvaesinev translokatsioon, mis esineb ligikaudu 1%-l prekursor B-ALL-i juhtudest.<sup>1</sup> TCF3-HLF positiivset leukeemiat seostatakse halva prognoosiga.<sup>3,4</sup>

#### Sondi spetsifikatsioonid

E2A, 19p13.3, punane

E2A, 19p13.3, roheline



E2A toode sisaldab 191 kb E2A (TCF3) geeni suhtes tsentromeerselt asuvat punasega märgistatud sondi, mis sisaldab markerit RH98588, ja 165 kb E2A geeni suhtes telomeerset piirkonda hõlmavat rohelist sondi, mis sisaldab markerit D19S883.

#### Tarnitavad materjalid

**Sond:** 50 µl viaali kohta (5 analüüsi) või 100 µl viaali kohta (10 analüüsi)

Sondid tarnitakse hübriidseerimislahusega eelsegatuna (formamiid; dekstraansulfaat; naatriumsitraadi soolalahus (saline-sodium citrate, SSC)) ja on valmis kasutamiseks.

**Vastandvärv:** 150 µl viaali kohta (15 analüüsi)

Vastandvärv on DAPI, tuhmumisvastane (sisaldus: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenüülindool)).

#### Hoiatused ja ettevaatusabinõud

1. Kasutamiseks *in vitro* diagnostikas. Ainult erialaseks kasutamiseks.
2. DNA sonde ja DAPI vastandvärvi 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. Vabanege kõigist ohtlikest jäätmest oma asutuse ohtlike jäätmete käitlemise eeskirjade kohaselt.
6. Kasutajad peavad olema suutelised 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 10 µl kasutamata jätmine protokoll denatureerimiseelses etapis võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.

#### Säilitamine ja käsitsemine

15°C Komplekti Aquarius® tuleb säilitada külmutatuna temperatuurivahemikus -25...-15 °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 tsüklikestel (kus üks tsükkel 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 °C)
2. Kalibreeritud erineva mahuga mikropipetid ja otsikud vahemikus 1–200 µl
3. Vesivann, täpse temperatuuriregulaatoriga 37 °C ja 72 °C juures
4. Mikrotsentrifuugi katsutid (0,5 ml)
5. Fluorestsentsmikroskoop (vt lõiku Fluorestsentsmikroskoobi soovitusel)
6. Faasikontrastmikroskoop
7. Läbipaistvast plastist, keraamilisest või kuumakindlast klaasist Coplini anumad
8. Pintsetid
9. Kalibreeritud pH-meeter (või pH indikaatorribad vahemikus pH 6,5–8,0)
10. Niiskuskamber
11. Fluorestsentsmikroskoobi immersioonõli
12. Lauatsentrifuug
13. Mikroskoobi alusklaasid
14. 24x24 mm katteklasaadid
15. Taimer
16. 37 °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 vesinikkloriid (HCl)
6. Destilleeritud vesi

## Fluorestsentsmikroskoobi soovitusel

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

Fluorofoor	Eksitatsioon <sub>max</sub> [nm]	Emissioon <sub>max</sub> [nm]
Roheline	495	521
Punane	596	615

Veenduge, et asjakohased eksitatsiooni- ja emissioonifiltrid, 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 samaaegseks 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 tööea ja filtrite vanuse kohta.

## Proovi ettevalmistamine

Komplekt on loodud kasutamiseks hematoloogiliselt saadud rakususpensioonidega, mis on fikseeritud Carnoy lahuses (3:1 metanool/atseetahape) ja ette valmistatud vastavalt labori või asutuse eeskirjadele. Valmistage ette õhu käes kuivatatud mikroskoobi alusklaasid vastavalt tsütogeneetika standardprotseduuridele. AGT *Tsütogeneetika laborijuhend* sisaldab soovitusi proovi kogumise, kultuuri istutamise, kogumise ja slaidi tegemise kohta.<sup>5</sup>

## 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.

### 2-kordne SSC lahust

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-kordne SSC lahust

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.

### 2-kordne SSC, 0,05% Tween-20 lahust

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 alusklaasile. Laske kuivada. (**Valikuline, kui kasutatakse tsütogeneetilist kuivatuskambrit:** slaidid tuleks valmistada tsütogeneetilist kuivatuskambrit kasutades. Optimaalseks slaidi valmistamiseks tuleks kambrit kasutada toatemperatuuril ligikaudu 25 °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. Dehüdreerige 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 toatemperatuuril 37 °C (+/-1 °C).
9. Tilgutage 10 µl sondisegu rakuproovile ja asetage ettevaatlikult katteklasaad. Lisage katteklasi liim ja laske liimil täielikult kuivada.

## Denaturatsioon

10. Denatureerige proov ja sond üheaegselt, kuumutades slaidi kuumutusplaadil toatemperatuuril 75 °C (+/-1 °C) 2 minutit.

## Hübriidsatsioon

11. Asetage slaid niiskesse valguskindlasse kambri temperatuuril 37 °C (+/-1 °C), laske seista üleöö.

## Hübriidsatsioonijärgsed pesud

12. Eemaldage DAPI külmikust ja laske soojeneda toatemperatuurile.
13. Eemaldage ettevaatlikult katteklasaadid ja kõik liimijäljed.
14. Kastke slaidid 2 minutiks ilma segamata 0,4-kordsesse SSC lahusesse (pH 7,0) toatemperatuuril 72 °C (+/-1 °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 katteklasaadiga, eemaldage mullid ja laske värvil pimedas kujuneda 10 minutit.
18. Vaadake fluorestsentsmikroskoobiga (vt **Fluorestsentsmikroskoobi soovitusel**).

## Valmis slaidide stabiilsus

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

## Protseduuri soovitusel

1. Slaidide keetmine või aegumine võib fluorestsentssignaali nõrgendada.
2. Cytocell Ltd toodetud või soovitatud reaktiivide asemel muude reaktiivide kasutamine võib ebasoodsalt mõjutada hübriidseerimistingimusi
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 hübriidseerimine võib põhjustada täiendavaid või ootamatuid signaale
7. Kasutajad peaksid enne analüüsi kasutamist diagnostilisel eesmärgil protokollil oma proovidega optimeerima
8. Suboptimaalsed tingimused võivad põhjustada ebaspetsiifilist seondumist, mida võidakse ekslikult sondi signaalina tõlgendada

## Tulemuste tõlgendamine

### Slaidi kvaliteedi hindamine

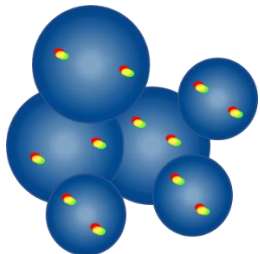
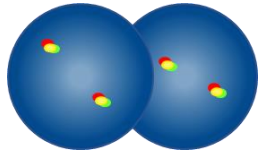
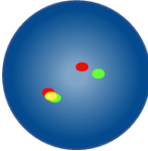
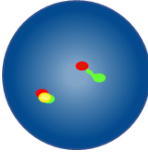
Slaidi ei tohiks analüüsida, kui:

- 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 fluorestsentshägu, mis segab signaali–optimaalsetel slaididel peaks taust tunduma tume või must ja puhas;
- rakutuuma piire ei saa eristada ja need pole terviklikud.

### Analüüsi eeskirjad

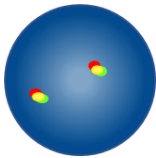
- Igat proovi peaks analüüsima ja tõlgendama kaks analüütikut. Kõik lahknemused tuleks lahendada kolmanda analüütiku hinnanguga.
- Analüütikud peaks olema riiklikult tunnustatud standardite kohase väljaõppega.
- Iga analüütik peaks hindama eraldi 100 tuuma iga proovi kohta. Esimene analüütik peaks alustama slaidi vasakult küljelt ja teine analüütik paremalt küljelt.

- Iga analüütik peaks oma tulemused üles märkima eraldi andmekandjale.
- Analüüsi jaoks võivad terviklikke tuumi, mitte kattuvaid või kokkuleepunud või tsütoplasma jääkidega kaetud ega autofluorestseerivaid tuumi.
- Vältige alasid, kus esineb liigseid tsütoplasma jääke või ebaspetsiifilist hübriidseerimist.
- Signaali tugevus võib vahelduda, isegi ühe tuuma piires. Sellistel juhtudel kasutage üksikfiltrite ja/või kohandage fokaaltasandit.
- Suboptimaalsete tingimuste korral võivad signaalid hajuda. Kui kaks sama värvi signaali puutuvad kokku või nendevaheline kaugus ei ole suurem kui kaks signaalipikkust või signaale ühendab ähmane niit, lugege signaalid üheks.
- Kui kahevärvilise lahutatavate sondide analüüsimisel on punase ja rohelise signaali vahel tühimik väiksem kui kaks signaalipikkust, lugege see ümberkorraldamata / ühendatud signaaliks.
- 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
	Lugeda kahe fusioonisignaali, kui punase ja rohelise signaali vaheline tühimik on kahest signaalipikkusest väiksem
	Lugeda kahe fusioonisignaali, kui üks fusioonisignaali on difuusne

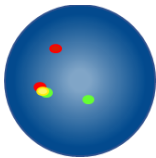
#### Eeldatavad tulemused

##### Eeldatav normaalne signaalimuster



Normaalse raku eeldatav tulemus on kaks punast/rohelist fusioonisignaali (2F).

##### Eeldatav ebanormaalne signaalimuster



Tasakaalustatud E2A (TCF3) ümberkorraldusega rakus on eeldatav signaalimuster üks punane, üks roheline ja üks fusioonisignaali (1P, 1R, 1F).

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 toimivusomadused

##### Analüütiline spetsiifilisus

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

Tabel 1. Sondi E2A Breakapart Probe analüütiline spetsiifilisus

Sond	Sihtmärk-lookus	Õige lookusega hübriidseeritud signaalide arv	Hübriidseeritud signaalide koguarv	Spetsiifilisus (%)
Punane E2A	19p13	200	200	100
Roheline E2A	19p13	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. Sondi E2A Breakapart Probe analüütiline tundlikkus

Eeldatava signaalimustriga rakkude arv	Hinnatava signaaliga rakkude arv	Tundlikkus (%)	95% usaldusvahemik
386	400	96,5	1,7

##### 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 saavutati, kasutades normaalses ja positiivsete patsientide proove. Iga proovi kohta salvestati 100 raku signaalimustrid. Arvatati Youdeni koefitsient, et leida läviväärtus, mille korral Tundlikkus + Spetsiifilisus-1 on maksimaalne.

Tabel 3. Sondi E2A Breakapart Probe tavaliste läviväärtuste kirjeldus

Ebanormaalne signaalimuster	Youdeni koefitsient	Tavaline läviväärtus (%)
1P, 1R, 1F	0,99	6

Laborid peavad oma andmete põhjal läviväärtused kinnitama.<sup>6,7</sup>

##### Kordustäpsus ja korratavus

Kordustäpsus on analüüsi loomulik varieeruvus korduvalt, samades tingimustes läbiviimisel. Seda hinnati, analüüsides sama partinumbri sondi kordusanalüüsi samal proovil, samades tingimustes, samal päeval.

Korratavus on analüüsi varieeruvus ja see saavutatakse, hinnates varieeruvust proov-prooviga, päev-päevaga ja partii-partiiga. Päev-päevaga korratavust hinnati sama proovi analüüsimisel kolmel erineval päeval. Partii-partiiga korratavust hinnati ühe proovi ühe sondi kolme erineva partiiga analüüsimisel samal päeval. Proov-prooviga korratavust hinnati proovi kolme replikaadi analüüsimisel samal päeval. Iga proovi kohta salvestati 100 interfaasi raku signaalimuster ja arvatati eeldatava signaalimustriga rakkude protsent.

Korratavus ja kordustäpsus arvatati replikaatide vahelise standardhälvena (SH) iga muutuja kohta ning üldise keskmise SH suhtarvuna.

Tabel 4. Sondi E2A Breakapart Probe korratavus ja kordustäpsus

Muutuja	Standardhälve (SH)
Kordustäpsus	0,19
Proov-prooviga	0,19
Päev-päevaga	0,38
Partii-partiiga	0,00
Hälve	0,30

##### Kliiniline toimivus

Kliiniline toimivus saavutati toote sihtmärki esindusproovil. Iga proovi kohta salvestati  $\geq 100$  interfaasi raku signaalimustrid. Normaalne/ebanormaalne hinnang anti, võrreldes teatud ebanormaalse signaalimustriga rakkude protsenti normaalse väljaarvamise piirväärtusega. Siis võrreldi tulemusi proovi teadaoleva olekuga.

Kliiniliste andmete tulemused analüüsiti selleks, et saavutada tundlikkus, spetsiifilisus ja väljaarvamise piirväärtused ühemõõtelise meetodiga.

Tabel 5. Sondid E2A Breakapart Probe kliiniline toimivus

Muutuja	Tulemus
Kliiniline tundlikkus (true positive rate, TPR) (tõeselt positiivsete määr)	100%
Kliiniline spetsiifilisus (true negative rate, TNR) (tõeselt negatiivsete määr)	99,8%
Valepositiivsete määr (false positive rate, FPR) = 1-spetsiifilisus	0,2%

**Lisateave**

Lisateabe saamiseks võtke ühendust ettevõtte CytoCell tehnilise toe osakonnaga.

**Tel:** +44 (0)1223 294048










**E-post:** techsupport@cytoCELL.com

**Veebisait:** www.ogt.com

**Viited**

1. Van der Burg *et al.*, Leukemia 2004;18(5):895-908
2. Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC,2017
3. Mullighan, The Journal of Clinical Investigation 2012;122(10):3407-3415
4. Moorman *et al.*, Lancet Oncol Haematol. January 2012
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.

**Sümbolite seletus**

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

**Patendid ja kaubamärgid**

CytoCell on ettevõtte CytoCell Ltd. registreeritud kaubamärk.



**CytoCell Ltd.**

Oxford Gene Technology,  
418 Cambridge Science Park,  
Milton Road,  
Cambridge, CB4 0PZ, Ühendkuningriik  
**Tel:** +44(0)1223 294048  
**Faks:** +44(0)1223 294986  
**E-post:** probes@cytoCELL.com  
**Veebisait:** www.ogt.com