



A Sysmex Group Company



Návod k použití

REF: LPH 036-S / LPH 036

EVI1 (MECOM) Breakapart Probe



POUZE K PROFESIONÁLNÍMU POUŽITÍ



www.cytoCELL.com

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

Omezení

Tento prostředek je navržen tak, aby detekoval přeskupení s body zlomu v oblasti vymezené červenými, zelenými a modrými kopiemi v této sadě sond, což zahrnuje oblast *EV11 (MECOM)*. Body zlomu mimo tuto oblast nebo variantní přeskupení, plně obsažená v této oblasti, nemusí být tímto prostředkem detekována.

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

Tento produkt nebyl validován k použití na jiných typech vzorků nebo chorob, než jsou ty, které jsou specifikovány v odstavci Předpokládané použití.

Hlášení a interpretace výsledků FISH musí 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 k jiným účelům než těm, které jsou uvedeny v odstavci Předpokládané použití.

Předpokládané použití

Sada CytoCell *EV11 (MECOM) Breakapart Probe* je kvalitativní, neautomatizovaný, fluorescenční *in situ* hybridizační test (FISH) používaný k detekci chromozomálních přeskupení v oblasti 3q26.2 na chromozomu 3 v hematologicky získaných buněčných suspenzích fixovaných v Carnoyově roztoku (metanol a kyselina octová v poměru 3 : 1) od pacientů s potvrzenou nebo předpokládanou akutní myeloidní leukémií (AML) nebo myelodysplastickým syndromem (MDS).

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 translokace *EV11 (MECOM)* byla důležitá pro klinickou léčbu.

Principy testu

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika umožňující detekovat sekvence DNA na metafázových chromozomech nebo v interfázových jádrech z fixovaných cytogenetických vzorků. Tato technika využívá sondy DNA, které hybridizují na celé chromozomy nebo na jednotlivé jedinečné sekvence a které slouží jako důležitý doplněk cytogenetické analýzy pomocí G-pruhování. Tuto techniku lze nyní aplikovat jako základní vyšetřovací nástroj při prenatálním a hematologickém vyšetření a při chromozomální analýze solidních tumorů. 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 označí kontrastním barvivem za účelem vizualizace. Fluorescenční mikroskopie potom umožňuje vizualizaci hybridizované sondy na cílovém materiálu.

Informace o sondě

Onkogen *MECOM (komplexní lokus MDS1 a EV11)* na 3q26.2 je u hematologických malignit myeloidního původu často přeskupen.

MECOM kóduje protein zinkového prstu, který je nevhodně exprimován v leukemických buňkách 2–5 % pacientů s AML a MDS.¹ Tato deregulovaná exprese je často způsobena chromozomálním přeskupením zahrnujícím oblast 3q26.2, přičemž dvěma nejčastějšími aberacemi jsou (3;3)(q21;q26.2) a inv(3)(q21q26.2).¹ Body zlomu pro translokace a inverze se významně liší.

Inverzní body zlomu se nacházejí centromericky ke genu *MECOM*, zahrnují jej a pokrývají asi 600 kb. Většina bodů zlomu v translokacích 3q26.2 je telomerická ke genu *MECOM* a pokrývá oblast zahrnující telomerický konec genu *MDS1* a gen *MYNN*.²

Chromozomální přeskupení zahrnující oblast 3q26.2 jsou spojována s myeloidními malignitami, aberantní expresí genu *MECOM*, špatnou prognózou a agresivním klinickým průběhem.²

AML s inv(3)(q21q26.2) nebo t(3;3)(q21;q26.2) je podle klasifikace myeloidních novotvarů a akutní leukémie Světové zdravotnické organizace (World Health Organization, WHO) uznávaným onemocněním. Jedná se o transformovanou nebo de novo AML s velmi agresivním klinickým průběhem a aberacemi zahrnujícími *MECOM* na 3q26.2 a *RPN1* (riboforin I) na 3q21.³

Bylo také prokázáno, že *MECOM* je přeskupen u onemocnění souvisejícího s terapií prostřednictvím translokace t(3;21)(q26.2;q22), což vede k fúzi *MECOM-RUNX1*.^{3,4}

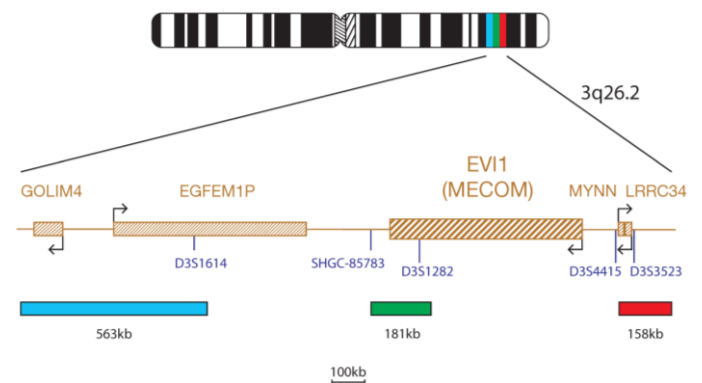
Přeskupení *MECOM* jsou velmi heterogenní a pomocí konvenční cytogenetiky může být obtížné je odhalit, čímž se metoda FISH stává užitečným nástrojem jejich detekce.

Parametry sondy

EV11, 3q26.2, červená

EV11, 3q26.2, zelená

EV11, 3q26.2, modrá



Červená složka směsi sond *EV11* se skládá ze sondy o délce 158 kb, telomerické k markeru *D3S4415*, a zahrnuje gen *LRRC34*. Zelená složka pokrývá oblast o délce 181 kb, která zahrnuje centromerickou část genu *EV11 (MECOM)* až za marker *D3S1282*. Modrá složka pokrývá oblast o délce 563 kb centromericky ke genu *EV11*, což zahrnuje marker *D3S1614*.

Dodaný materiál

Sonda: 50 µl v jedné lahvičce (5 testů) nebo 100 µl 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 µl v jedné lahvičce (15 testů)

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

Varování a bezpečnostní pokyny

- Pro diagnostické použití *in vitro*. Pouze k profesionálnímu použití.
- Při manipulaci s DNA sondami a kontrastním barvivem DAPI používejte rukavice.
- Směsi v sondách obsahují formamid, což je teratogen; nevedchujte 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 směrnicemi pro likvidaci nebezpečného odpadu vašeho zdravotnického zařízení.
- Pracovníci musí být schopni rozlišit červenou, modrou a zelenou barvu.
- Nedodržení předepsaného protokolu a reagentů může ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům.
- Sonda se nesmí fedit ani míchat s jinými sondami.
- Není-li během kroku predenaturace v rámci protokolu použito 10 µl 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.

DS106/CE-cs v010.00/2023-04-19 (H021 v8)

Strana 1 z 4



Sonda zůstává během cyklů zmrazování a rozmrazování, k nimž dochází při běžném používání, stabilní (jeden cyklus znamená vyjmutí sondy z mrazničky a její 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 materiály, které nejsou součástí dodávky

Je nutné používat kalibrovaná zařízení:

1. Varná deska (s pevnou plotnou a přesným ovládním teploty do 80 °C)
2. Kalibrované mikropipety s variabilním objemem a špičkami v rozsahu od 1 µl do 200 µl
3. Vodní lázeň s přesnou regulací teploty na 37 °C a 72 °C
4. Mikrocentrifugační zkumavky (0,5 ml)
5. Fluorescenční mikroskop (viz oddíl Doporučení ohledně fluorescenčního mikroskopu)
6. Mikroskop s fázovým kontrastem
7. Čisté plastové, keramické nebo skleněné (z ohnivzdorného skla) lahvičky typu „Coplin“
8. Chirurgické kleště
9. Kalibrovaný pH metr (nebo pH indikační proužky schopné měřit pH v rozmezí 6,5–8,0)
10. Vlhčená nádoba
11. Imerzní olej na objektiv fluorescenčního mikroskopu
12. Stolní odstředivka
13. Mikroskopická sklička
14. Krycí sklička 24 x 24 mm
15. Stopky
16. Inkubátor, 37 °C
17. Lepidlo na bázi kaučukového roztoku
18. Vířivý mixér
19. Odměrné válce
20. Magnetická míchačka
21. Kalibrovaný teploměr

Volitelné vybavení, které není součástí dodávky

1. Cytogenetická sušicí komora

Potřebné reagentie, které nejsou součástí dodávky

1. 20x solný roztok citrátu sodného (SSC)
2. 100 % etanol
3. Tween-20
4. 1M hydroxid sodný (NaOH)
5. 1M kyselina chlorovodíková (HCl)
6. Demineralizovaná voda

Doporučení ohledně fluorescenčního mikroskopu

Pro optimální vizualizaci použijte 100W nebo podobnou rtuťovou lampu s 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, případně 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, 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 hematologicky získaných buněčných suspenzí fixovaných v Carnoyově roztoku (metanol a kyselina octová v poměru 3 : 1), které jsou připraveny v souladu s pokyny laboratoře nebo zdravotnického zařízení. Na mikroskopická sklička 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 sklíček.⁵

Příprava roztoků

Etanolové roztoky

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

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

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

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 na to, aby vždy byla omezena expozice sondy a kontrastních barviv vůči osvětlení v laboratoři.)

Příprava sklička

1. Naneste buněčný vzorek na mikroskopické podložní skličko. Nechte ho uschnout. (**Volitelně při použití cytogenetické sušicí komory:** Vzorky lze na sklička 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.)
2. Skličko ponořte na 2 minuty do roztoku 2xSSC při pokojové teplotě. Neprotřepávejte.
3. Dehydratujte pomocí etanolové řady (70 %, 85 % a 100 %), vždy po dobu 2 minut při pokojové teplotě.
4. Nechte ho uschnout.

Predenaturace

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

Denaturace

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

Hybridizace

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

Post-hybridizační vymývání

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

Stabilita hotových sklíček

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

Doporučení pro zpracování

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

Interpretace výsledků

Vyhodnocení kvality sklička

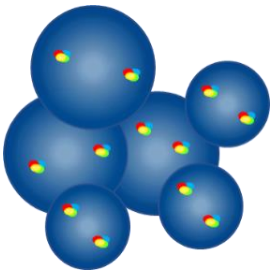
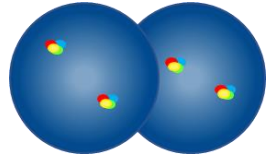
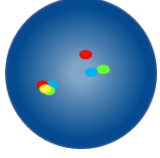
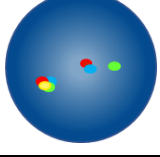
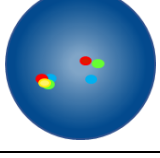
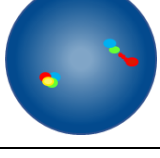
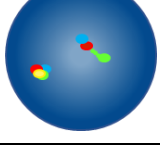
Skličko by se nemělo analyzovat, jestliže:

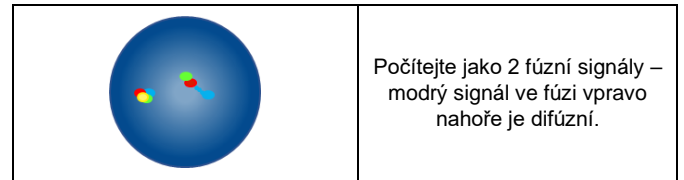
- jsou signály příliš slabé a nelze je proto analyzovat jednoduchými filtry – pro pokračování v analýze musí být signály jasné, výrazné a snadno hodnotitelné;
- analýze brání velký počet shluků buněk nebo překrývajících se buněk;
- nebylo hybridizováno > 50 % buněk;
- mezi buňkami se nachází příliš mnoho 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, případně pokud dva signály spojuje slabý pruh, počítejte je jako jeden signál.
- Pokud při analýze tříbarevných sond typu „breakapart“ není mezera mezi červeným, zeleným a aqua signálem větší než šířka dvou signálů, započítejte jej jako nepřeskupený/fúzní 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 – nejsou viditelné všechny oblasti obou jader.
	Počítejte jako 2 fúzní signály – mezera mezi červeným a zeleným/modrým signálem je menší než dvě šířky signálu.
	Počítejte jako 2 fúzní signály – mezera mezi zeleným a červeným/modrým signálem je menší než dvě šířky signálu.
	Počítejte jako 2 fúzní signály – mezera mezi modrým a červeným/zeleným signálem je menší než dvě šířky signálu.
	Počítejte jako 2 fúzní signály – červený signál ve fúzi vpravo nahoře je difúzní.
	Počítejte jako 2 fúzní signály – zelený signál ve fúzi vpravo nahoře je difúzní.

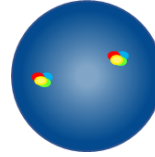


Počítejte jako 2 fúzní signály – modrý signál ve fúzi vpravo nahoře je difúzní.

Předpokládané výsledky

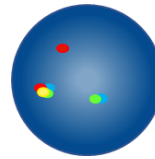
Tříbarevná strategie ukazuje přítomnost translokace nebo inverze a umožňuje rozlišení všech jednotlivých typů přeskupení.

Předpokládaný vzorec normálního signálu

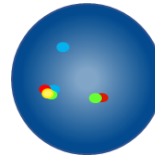


U normální buňky se předpokládají dva červené/zelené/modré společně lokalizované signály (2ČZM).

Předpokládané vzorce abnormálního signálu



V buňce s translokací $t(3;nn)(q26.2;nn)$ bude mít předpokládaný vzorec signálu jeden červený, jeden zelený/modrý fúzní a jeden červený/zelený/modrý fúzní signál (1Č, 1ZM, 1ČZM).



V buňce s inverzí $inv(3)(q21q26.2)$ bude mít předpokládaný vzorec signálu jeden červený/zelený fúzní signál, jeden samostatný modrý signál a jeden červený/zelený/modrý fúzní signál (1ČZ, 1M, 1ČZM).

U aneuploidních/nevyvážených vzorků jsou možné jiné vzory signálů.

Známa zkřížená reaktivita

Zkřížená reaktivita není známa.

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

Specifické funkční charakteristiky

Analytická specifická

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

Tabulka 1. Analytická specifická pro sondu EVI1 Breakapart Probe

Sonda	Cílový lokus	Počet signálů hybridizovaných na správný lokus	Celkový počet hybridizovaných signálů	Specifická (%)
Červená EVI1	3q26	200	200	100
Zelená EVI1	3q26	200	200	100
Modrá EVI1	3q26	200	200	100

Analytická citlivost

Analýtická citlivost je procento započítatelných interfázních buněk s předpokládaným vzorcem normálního signálu. Analytická citlivost byla stanovena analýzou interfázních buněk napříč různými normálními vzorky. Senzitivita byla vypočtena jako procento započítatelných buněk s očekávaným vzorcem signálu (s 95 % intervalem spolehlivosti).

Tabulka 2. Analytická citlivost sondy EVI1 Breakpart Probe

Počet buněk s předpokládanými vzorci signálů	Počet buněk se započítatelnými signály	Citlivost (%)	Interval spolehlivosti 95 %
4 957	5 000	99,14	98,84–99,36

Charakteristika normálních mezních hodnot

Normální mezní hodnota ve spojení se sondami FISH je maximální procento započítatelných interfázních buněk se specifickým vzorcem abnormálního signálu, při kterém se vzorek považuje pro tento signálový vzor za normální.

Normální mezní hodnota byla stanovena pomocí vzorků negativních na přeskupení, které má sonda detekovat, a beta inverzní funkce. U každého vzorku byly dvěma nezávislými analytiky zaznamenány vzorce signálů 100 interfázních jader, celkem 200 jader v každém vzorku.

Tabulka 3. Charakteristika normálních mezních hodnot sondy EVI1 Breakpart Probe

Vzorec abnormálního signálu	Počet vzorků analyzovaných pro stanovení mezních hodnot	Počet jader vyhodnocených u jednotlivých vzorků	Maximální počet falešně pozitivních vzorců signálu	Normální mezní hodnota (%)
1Č, 1ZM, 1ČZM	25	200	3	4
1ČZ, 1M, 1ČZM	25	200	3	4

Laboratoře si musí ověřit mezní hodnoty pomocí vlastních dat^{6,7}.

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost byla stanovena třemi nezávislými laboratořemi, které testovaly šest zaslepených vzorků (dva negativní na přeskupení, dva vzorky s nízkou pozitivitou, které odpovídaly 1 až 3násobku mezní hodnoty, a dva vysoce pozitivní vzorky, které obsahovaly více než 45 % buněk pozitivních na přeskupení). Analýza byla provedena pomocí dvou opakovaní jednotlivých vzorků v průběhu pěti dnů, které nenásledovaly po sobě.

Všechny tři laboratoře prováděly testování v rámci stejného dne, v rámci různých dnů a v rámci různých laboratoří s použitím stejné šarže sondy, přičemž jedna z laboratoří také provedla testování reprodukovatelnosti v rámci různých šarží, kdy použila tři různé šarže sondy.

Reprodukovatelnost byla stanovena na základě shody mezi proměnnými zkoumanými při jednotlivých testech.

Tabulka 4. Reprodukovatelnost a preciznost sondy EVI1 Breakpart Probe

Signál	Studie reprodukovatelnosti	Vzorek	Shoda (%)
Inverze (1ČZ, 1M, 1ČZM)	V rámci jednoho dne / v různých dnech / v různých laboratořích	Negativní	100
		Vysoce pozitivní	100
	V různých šaržích	Negativní	92
		Vysoce pozitivní	100
Translokace (1Č, 1ZM, 1ČZM)	V rámci jednoho dne / v různých dnech / v různých laboratořích	Negativní	100
		Vysoce pozitivní	100
	V různých šaržích	Negativní	100
		Vysoce pozitivní	100

Klinická funkce

Klinická funkce byla stanovena pomocí reprezentativní sady náhodných pacientů s AML nebo MDS a na pracovišti bylo odebráno 100 vzorků. Četnost případů přeskupení zjištěná sondou byla porovnána s četností získanou ze zdrojů z literatury.

Aby bylo možno toto porovnání provést, byl interval spolehlivosti uváděný v literatuře na populaci velikosti 100 vzorků stanoven pomocí výpočtu jednovýběrového proporčního testu s korekcí kontinuity.

Tabulka 5. Klinická funkce sondy EVI1 Breakpart Probe

Přeskupení	Prevalence			
	Rešerše literatury (%)	95 % LCI (%)	Klinická studie (%)	95 % UCL (%)
AML s přeskupeními inv(3)/t(3;3)/MECOM	1,3	0,1	4	6,7
MDS s přeskupeními MECOM	0,4	0		5,3

Další informace

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

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

Reference

- Soderholm *et al.*, Leukemia 1997;11:352-358
- Bobadilla *et al.*, Br J Haematol 2007;136:806-813
- Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
- Pedersen-Bjergaard *et al.*, Leukemia 2008;22:240-248
- 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	cs: Katalogové číslo
IVD	cs: Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>
LOT	cs: Kód šarže
	cs: Viz návod k použití
	cs: Výrobce
	cs: Datum spotřeby
	cs: Omezení teploty
	cs: Chraňte před slunečním světlem
	cs: Obsah dostačuje k provedení <n> testů
CONT	cs: 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: probes@cytoCELL.com
W: www.ogt.com

