



A Sysmex Group Company



Návod k použití

REF: LPH 036-S / LPH 036

Breakpart Probe EVI1 (MECOM)



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 přeskupení s body zlomu v oblasti vymezené červenými, zelenými a modrými kopiemi v této sadě sond, což zahrnuje oblast *EVI1* (*MECOM*). Body zlomu mimo tuto oblast nebo variantní přeskupení, plně obsažená v této oblasti, nemusí být tímto prostředkem detekovány.

Tento test není určen k použití v rámci samostatné diagnostiky, prenatalnímu testování, skrínungu 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 Breakpart Probe *EVI1* (*MECOM*) 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 (3:1 metanol/kyseleina octová) 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 *EVI1* (*MECOM*) byla důležitá pro klinickou léčbu.

Principy testu

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika, která umožňuje detekovat sekvence DNA 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 prenatalním 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

Onkogen *MECOM* (komplexní lokus *MDS1* a *EVI1*) 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 MDS¹. Tato deregulovaná exprese je často způsobena chromozomálním přeskupením zahrnujícím oblast 3q26.2, přičemž dvěma nejčastějšími aberacemi jsou t(3;3)(q21;q26.2) a inv(3)(q21q26.2)¹. Body zlomu pro translokaci a inverzi 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 telomerických 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 průběhem².

AML s inv(3)(q21q26.2) nebo t(3;3)(q21;q26.2) je podle klasifikace myeloidních novotvarů a akutní leukémie Světové zdravotnické organizace (WHO) uznávaným onemocněním. Jedná se o transformovanou nebo de novo AML s velmi agresivním klinickým průběhem a aberacemi, zahrnující *MECOM* na 3q26.2 a RPN1 (riboforin I) na 3q21³.

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}.

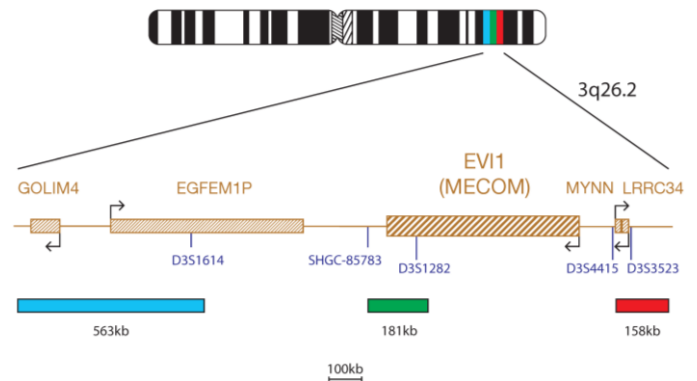
Přeskupení *MECOM* jsou velmi heterogenní a pomocí konvenční cytogenetiky může být obtížné je odhalit, čímž se metoda FISH stává užitečným nástrojem jejich detekce.

Parametry sondy

EVI1, 3q26.2, červená

EVI1, 3q26.2, zelená

EVI1, 3q26.2, modrá



Červená složka směsi sond *EVI1* 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 *EVI1* (*MECOM*) až za marker D3S1282. Modrá složka pokrývá oblast o délce 563 kb centromericky ke genu *EVI1*, 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.

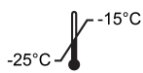
Kontrastní barvivo: 150 µl v jedné lahvičce (15 testů)

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

Varování a bezpečnostní pokyny

- Pro diagnostické použití *in vitro*. Výhradně k profesionálnímu použití.
- Při manipulaci s DNA sondami a barvivem DAPI antifade používejte rukavice.
- Směsi v sondách obsahují formamid, což je teratogen; nevedečte 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 µl sondy, může to ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům.

Uchovávání 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:

1. Varná deska (s pevnou plotnou a přesným ovládním teploty do 80 °C)
2. Kalibrované mikropipety s různým objemem a špičkami v rozsahu od 1 µl do 200 µl
3. Vodní lázeň s přesným ovládním teploty od 37 °C do 72 °C
4. Mikrocetrifugační zkumavky (0,5 ml)
5. Fluorescenční mikroskop (viz oddíl Doporučený fluorescenční mikroskop)
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. Mikroskopová 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 mičačka
21. Kalibrovaný teploměr

Volitelné vybavení, které není součástí dodávky

1. Cytogenetická sušicí komora

Potřebné reagenty, které nejsou součástí dodávky

1. 20x fyziologický roztok citrátu sodného (SSC)
2. 100% etanol
3. Tween-20
4. 1 M hydroxidu sodného (NaOH)
5. 1 M kyseliny chlorovodíkové (HCl)
6. 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 hematologicky získaných buněčných suspenzí fixovaných v Carnoyově fixačním roztoku (3:1 metanol/kyselina octová), které jsou připraveny v souladu s pokyny laboratoře nebo zdravotnického zařízení. Na mikroskopovou 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 sklíček⁵.

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

1. Naneste buněčný vzorek na mikroskopové sklíčko. Nechte ho uschnout. **(Volitelně při použití cytogenetické sušicí komory:** vzorky lze na sklíčko 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. Sklíčko ponořte na 2 minuty do roztoku 2xSSC při pokojové teplotě. Neprotřepávejte.
3. Dehydratujte pomocí etanolové série (70%, 85% a 100%), vždy po dobu 2 minut při pokojové teplotě.
4. Nechte ho uschnout.

Predenaturace

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

Denaturace

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

Hybridizace

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

Post-hybridizační vymývání

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

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 teplota 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. Uživatel by si měl před použitím testu pro diagnostické účely optimalizovat protokol pro své vlastní vzorky.
8. Neoptimální podmínky mohou vést k nespecifickému navázání, které může být nesprávně interpretováno jako signál sondy.

Interpretace výsledků

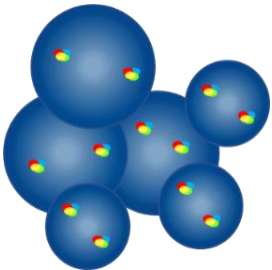
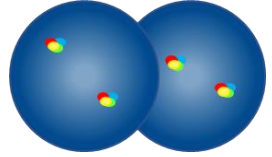
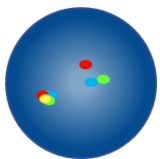
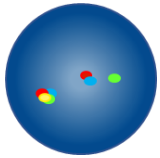
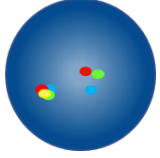
Vyhodnocení kvality sklíčka

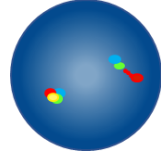
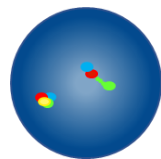
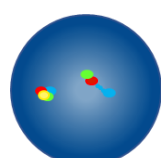
Sklíčko by se nemělo analyzovat, jestliže:

- 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 sklíčků 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 i národními standardy.
- Všichni analytici musí provést nezávislé hodnocení 100 jader každého vzorku. První analytik musí začít provádět analýzu z levé strany s klíčkem 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.
- Vyhněte 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 při analýze tříbarevných sond typu „break apart“ není mezerka mezi červeným, zeleným a modrým signálem větší než šířka dvou signálů, započítejte je jako přeskupený/spojený signál.
- Pokud si nejste jisti, zda lze buňku analyzovat či nikoli, analýzu neprovádějte.

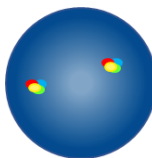
| Pokyny pro analýzu | |
|---|---|
|  | Nepočítejte – jádra jsou příliš těsně u sebe, takže není možno určit hranice |
|  | Nepočítejte překrývající se jádra – všechny oblasti obou jader nejsou viditelné |
|  | Počítejte jako 2 fúzní signály - mezerka mezi červeným a zeleným/modrým signálem je menší než dvě šířky signálu |
|  | Počítejte jako 2 fúzní signály - mezerka mezi zeleným a červeným/modrým signálem je menší než dvě šířky signálu |
|  | Počítejte jako 2 fúzní signály - mezerka 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

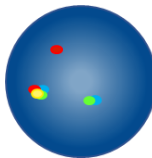
Tříbarevná strategie ukazuje přítomnost translokace nebo inverze a umožňují rozlišení všech jednotlivých typů přeskupení.

Předpokládaný vzorec normálního signálu

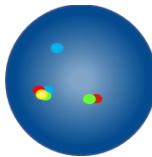


U normální buňky se předpokládají dva červené/zelené/modré společně lokalizované signály (2ČZM).

Předpokládané vzorce abnormálního signálu



V buňce s translokací $t(3;nn)(q21;nn)$ 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 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 Breakapart Probe EVI1

| Sonda | Cílový lokus | Počet signálů hybridizovaných na správný lokus | Celkový počet hybridizovaných signálů | Specifita (%) |
|--------------|--------------|--|---------------------------------------|---------------|
| Cervená EVI1 | 3q26 | 200 | 200 | 100 |
| Zelená EVI1 | 3q26 | 200 | 200 | 100 |
| Modrá EVI1 | 3q26 | 200 | 200 | 100 |

Analytická citlivost

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

Tabulka 2. Analytická citlivost Breakapart Probe EVI1

| Počet buněk s předpokládanými vzorci signálu | Počet buněk se započitatelnými signály | Citlivost (%) | Interval spolehlivosti 95 % |
|--|--|---------------|-----------------------------|
| 4957 | 5000 | 99,14 | 98,84 – 99,36 |

Charakteristika normálních mezních hodnot

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

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

Tabulka 3. Charakteristika normálních mezních hodnot Breakapart Probe EVI1

| Vzorec abnormálních o signálu | Počet vzorků analyzovaných pro stanovení mezních hodnot | Počet jader vyhodnocených u jednotlivých vzorků | Maximální počet falešně pozitivních vzorců signálů | Normální mezní hodnota (%) |
|-------------------------------|---|---|--|----------------------------|
| 1C, 1ZM, 1CZM | 25 | 200 | 3 | 4 |
| 1CZ, 1M, 1CZM | 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 - 3násobku mezní hodnoty, a dva vysoce pozitivní vzorky, které obsahovaly více než 45 % buněk pozitivních na přeskupení). Analýza byla provedena pomocí dvou opakování jednotlivých vzorků v průběhu pěti dnů, které nenasledovaly 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 různými proměnnými zkoumanými při jednotlivých testech.

Tabulka 4. Reprodukovatelnost a přesnost Breakapart Probe EVI1

| Signál | Studie reprodukovatelnosti | Vzorek | Shoda (%) |
|-----------------------------|--|------------------|-----------|
| Inverze (1CZ, 1M, 1CZM) | V rámci jednoho dne / v různých dnech / v různých laboratořích | Negativní | 100 |
| | | Vysoce pozitivní | 100 |
| | V různých šaržích | Negativní | 92 |
| | | Vysoce pozitivní | 100 |
| Translokace (1C, 1ZM, 1CZM) | 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 Breakapart Probe EVI1

| Přeskupení | Prevalence | | | |
|---------------------------------------|------------------------|-------------|---------------------|-------------|
| | Přehled literatury (%) | 95% LCI (%) | Klinická studie (%) | 95% UCL (%) |
| AML s přeskupením inv(3)/t(3;3)/MECOM | 1,3 | 0,1 | 4 | 6,7 |
| MDS s přeskupením 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-mail: techsupport@cytoCELL.com

Web: 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 | 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.
 3-4 Technopark
 Newmarket Road
 Cambridge, CB5 8PB, UK.
 T: +44(0)1223 294048
 F: +44(0)1223 294986
 E: probes@cytoCELL.com
 W: www.ogt.com