



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika

REF: LPH 040-S / LPH 040

IGH/CCND3 Translocation, Dual Fusion Probe



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO



www.cytocell.com

Dalsze informacje oraz dokumenty w innych językach są dostępne pod adresem www.ogt.com

Ograniczenia

Ten wyrób jest przeznaczony do wykrywania rearanżacji z miejscami złamań w regionie, do którego wiążą się czerwone i zielone klony zawarte w tym zestawie sond, a który obejmuje regiony genów *IGH* i *CCND3*. Produkt ten może nie umożliwić wykrycia miejsc złamań, do których doszło poza tym regionem, lub wariantowych rearanżacji całkowicie zawierających się w tym regionie.

Ten test nie jest przeznaczony do użytku jako samodzielny test diagnostyczny, do badań prenatalnych, populacyjnych badań przesiewowych, badań przyłóżkowych ani do samotestowania. Ten produkt jest przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego w laboratorium; wszystkie wyniki powinny być interpretowane przez personel posiadający odpowiednie kwalifikacje, z uwzględnieniem innych istotnych wyników testów.

Ten produkt nie został zatwierdzony do stosowania dla typów próbek lub chorób innych niż określone w części dotyczącej przeznaczenia.

Raportowanie i interpretacja wyników metody FISH powinny być zgodne z profesjonalnymi standardami praktyki i dokonywane z uwzględnieniem innych informacji klinicznych i diagnostycznych. Zestaw ten należy traktować jako uzupełnienie innych diagnostycznych testów laboratoryjnych. Z tego względu nie należy inicjować żadnych działań terapeutycznych wyłącznie na podstawie wyniku uzyskanego metodą FISH.

Nieprzestrzeganie protokołu może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.

Ten zestaw nie został zatwierdzony do stosowania w celach innych niż określone w części dotyczącej przeznaczenia.

Przeznaczenie

Produkt CytoCell IGH/CCND3 Translocation, Dual Fusion Probe to jakościowy, nieautomatyzowany test wykonywany metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) przeznaczony do detekcji chromosomowych rearanżacji zachodzących między regionem 6p21 zlokalizowanym na chromosomie 6. a regionem 14q32.3 zlokalizowanym na chromosomie 14. w utrwalonych w roztworze Carnoya (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1) zawiesinach komórek pochodzenia hematologicznego pobranych od pacjentów z rozpoznaniem lub podejrzeniem szpiczaka mnogiego (Multiple Myeloma, MM).

Wskazania

Ten produkt zaprojektowano jako produkt uzupełniający inne testy kliniczne i histopatologiczne wykonywane w ramach przyjętych ścieżek diagnostycznych i opieki klinicznej, w przypadku których znajomość statusu translokacji *IGH-CCND3* w istotny sposób wpływałaby na postępowanie kliniczne.

Zasady działania testu

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują do całych chromosomów lub pojedynczych unikalnych sekwencji, i stanowi istotne uzupełnienie cytogenetycznej analizy prążków G. Technika ta może być obecnie wykorzystywana jako kluczowe narzędzie diagnostyczne w chromosomalnych analizach prenatalnych, hematologicznych i guzów litych.

Docelowa sekwencja DNA, po utrwaleniu i denaturacji, staje się dostępna do przyłączenia do zdenaturowanej w podobny sposób, fluorescencyjnie wyznakowanej sondy DNA o sekwencji komplementarnej. Po hybrydyzacji niezwiązane i nieswoicie związane sondy DNA są usuwane, a DNA jest barwiony kontrastowo w celu jego uwidocznienia. Sondy zhybrydowane do materiału docelowego można obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Informacje o sondzie

Gen *CCND3* (*cyclin D3*) jest zlokalizowany w regionie 6p21.1, a gen *IGH* (*immunoglobulin heavy locus*) jest zlokalizowany w regionie 14q32.33.

Okolo 50–60% przypadków szpiczaka mnogiego (MM) wiąże się z translokacjami z udziałem genu *IGH* i jednego z kilku partnerów genomowych: *CCND1*, *NSD2* (*MMSET*) i *FGFR3*, *CCND3*, *MAF* lub *MAFB*¹.

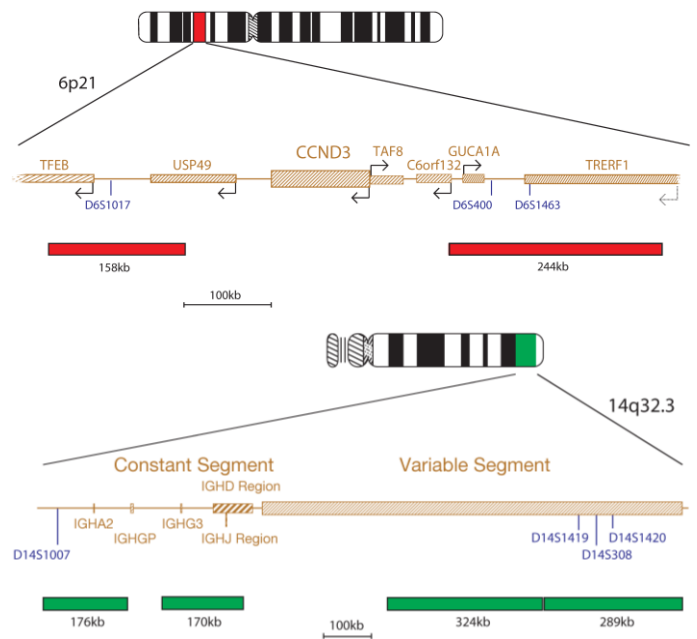
Translokacja t(6;14)(p21;q32) to powtarzająca się translokacja obserwowana w 4% przypadków MM².

Gen *CCND3* zidentyfikowano jako potencjalny onkogen, którego ekspresja zostaje zaburzona w wyniku translokacji t(6;14)(p21;q32)². Najprawdopodobniej w translokacji tej pośredniczy błąd w rekombinacji przełącznika *IgH*, ponieważ wykazano, że w liniach komórkowych KMM-1 translokacja ta powoduje przerwanie sekwencji przełącznika w tym regionie i prowadzi do umieszczenia genu *CCND3* w pobliżu promotora genu *IGH*, powodując wzrost poziomu ekspresji genu *CCND3*². Uważa się, że mechanizm ten jest podobny we wszystkich przypadkach translokacji genu *IGH*. Większość miejsc złamań wydaje się być skupiona w regionie o długości poniżej 200 kb, położonym centromerycznie względem genu *CCND3*².

Translokacje *CCND3-IGH* wykryto również w wielu innych nowotworach złośliwych z komórek B, w tym w białaczce plazmatycznokomórkowej, chłoniaku rozlanym z dużych komórek B (Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL) i chłoniakach śledzionowych strefy brzeżnej (Splenic Lymphomas with Villous Lymphocytes, SLVL)³.

Specyfikacja sondy

CCND3, 6p21, kolor czerwony
IGH, 14q32.33, kolor zielony



Produkt IGH/CCND3 zawiera wyznakowane zielonym fluoroforem sondy obejmujące segmenty stałe (C), J, D i zmienne (V) genu *IGH*, a także sondy *CCND3* wyznakowane czerwonym fluoroforem. Mieszanina sond *CCND3* zawiera sondę o długości 158 kb, położoną telomerycznie względem genu *CCND3*, obejmującą marker D6S1017, oraz drugą sondę, obejmującą region o długości 244 kb położony centromerycznie względem genu *TAF8*, w tym markery D6S400 i D6S1463.

Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)

Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydizacyjnym (formamid; siarczan dekstranu; roztwór soli fizjologicznej i cytrynianu sodu (SSC)) i są gotowe do użycia.

Barwnik kontrastowy: 150 µl na fiolkę (15 testów)

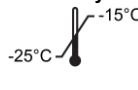
Barwnikiem kontrastowym jest odczynnik DAPI antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol)).

Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego.
- Podczas pracy z sondami DNA i barwnikiem kontrastowym DAPI należy nosić rękawiczki.

- Mieszaniny sond zawierają formamid, który wykazuje działanie teratogenne; nie wdychać oparów i nie dopuszczać do kontaktu ze skórą. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny.
- DAPI jest potencjalnym czynnikiem rakotwórczym. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny.
- Wszystkie materiały stwarzające zagrożenie należy wyrzucać zgodnie z wytycznymi placówki dotyczącymi usuwania odpadów stwarzających zagrożenie.
- Operatorzy muszą być w stanie rozróżnić czerwony, niebieski i zielony kolor.
- Nieprzestrzeganie wskazanego protokołu oraz nieużywanie właściwych odczynników może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.
- Nie należy rozcieńczać sondy ani mieszać jej z innymi sondami.
- Niezastosowanie 10 µl sondy podczas fazy denaturacji wstępnej wykonywanej w ramach protokołu może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.

Przechowywanie i postępowanie z produktem

 Zestaw należy przechowywać w zamrażarce w temperaturze od -25°C do -15°C do daty ważności wskazanej na etykiecie zestawu. Fiolki z sondami i barwnikiem kontrastowym należy przechowywać w ciemności.



Sonda zachowuje stabilność przez wszystkie cykle zamrażania i rozmrażania wykonywane podczas standardowego użytkowania produktu (jeden cykl jest definiowany jako wyjęcie sondy z zamrażarki i ponowne umieszczenie jej w zamrażarce) i zachowuje fotostabilność przez maksymalnie 48 godzin ciągłej ekspozycji na światło. Należy dołożyć wszelkich starań, aby ograniczyć ekspozycję produktów na światło i zmiany temperatury.

Sprzęt i materiały wymagane, ale niedostarczane

Należy używać następującego skalibrowanego sprzętu:

- Płyta grzewcza (ze stabilną płytą i możliwością dokładnej kontroli temperatury do 80°C)
- Skalibrowane mikropipety i końcówki umożliwiające przenoszenie różnych objętości cieczy w zakresie 1–200 µl
- Łażnia wodna z możliwością dokładnej kontroli temperatury na poziomie 37°C i 72°C
- Probówki mikrowirówkowe (0,5 ml)
- Mikroskop fluorescencyjny (patrz część „Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego”)
- Mikroskop z kontrastem fazowym
- Czyste barwiące Coplina z tworzywa sztucznego, ceramiki lub szkła żaroodpornego
- Szczypczyki
- Skalibrowany pH-metr (lub papierki wskaźnikowe pH umożliwiające pomiar pH w zakresie 6,5–8,0)
- Pojemnik zapewniający dużą wilgotność powietrza
- Olejek imersyjny odpowiedni do obiektywów mikroskopowych klasy fluorescencyjnej
- Wirówka laboratoryjna
- Szkiełka mikroskopowe
- Szkiełka nakrywkowe o wymiarach 24x24 mm
- Stoper
- Inkubator nastawiony na temperaturę 37°C
- Klej kauczukowy
- Wytrząsarka
- Cylindry miarowe
- Mieszadło magnetyczne
- Skalibrowany termometr

Opcjonalny sprzęt niedostarczany

- Komora do suszenia próbek do badań cytogenetycznych

Odczynniki wymagane, ale niedostarczane

- Roztwór soli fizjologicznej i cytrynianu sodu (SSC), 20x
- Etanol, 100%
- Tween-20
- Wodorotlenek sodu (NaOH), 1 M
- Kwas solny (HCl), 1 M
- Woda oczyszczona

Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego

W celu optymalnej wizualizacji sondy zalecane jest używanie 100-watowej lampy rtęciowej lub równoważnej lampy i obiektywów planapochromatycznych umożliwiających stosowanie olejku imersyjnego przy powiększeniu 60/63x lub 100x. Fluorofory użyte w tym zestawie sond charakteryzują się następującymi długościami fal wzbudzenia i emisji:

| Fluorofor | Wzbudzenie _{maks.} [nm] | Emisja _{maks.} [nm] |
|-----------|----------------------------------|------------------------------|
| Zielony | 495 | 521 |
| Czerwony | 596 | 615 |

Należy upewnić się, że w mikroskopie zamontowane są odpowiednie filtry wzbudzenia i emisji, które obejmują wymienione powyżej długości fal. Do jednoczesnej obserwacji zielonych i czerwonych fluoroforów optymalnie nadaje się potrójny filtr pasmowo-przepustowy dla barwnika DAPI/widma zielonego/widma czerwonego lub podwójny filtr pasmowo-przepustowy dla widma zielonego/widma czerwonego.

Przed użyciem mikroskopu fluorescencyjnego należy sprawdzić, czy działa on prawidłowo. Należy stosować olejek imersyjny odpowiedni do mikroskopii fluorescencyjnej o składzie odpowiednim do niskiej autofluorescencji. Należy unikać mieszania barwnika DAPI antyfade z mikroskopowym olejkim imersyjnym, ponieważ spowoduje to zaciemnienie sygnałów. Należy przestrzegać zaleceń wytwórcy dotyczących okresu żywotności lampy i wieku filtrów.

Przygotowanie próbek

Zestaw zaprojektowano do użytku na utwalonych w roztworze Carnoya (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1) zawiesinach komórek pochodzenia hematologicznego. Komórki należy przygotować zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w laboratorium lub placówce. Należy przygotować próbki suszone na powietrzu na szkiełkach mikroskopowych zgodnie ze standardowymi procedurami cytogenetycznymi. Podręcznik AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* zawiera zalecenia dotyczące pobierania próbek, prowadzenia hodowli komórek, zbierania komórek z hodowli oraz przygotowywania preparatów⁴.

Przygotowanie roztworów

Roztwory etanolu

Rozcieńczyć 100-procentowy etanol wodą oczyszczoną w określonych poniżej proporcjach i dokładnie wymieszać:

- 70-procentowy etanol — dodać 7 części 100-procentowego etanolu do 3 części wody oczyszczonej
- 85-procentowy etanol — dodać 8,5 części 100-procentowego etanolu do 1,5 części wody oczyszczonej

Przechowywać roztwory przez maksymalnie 6 miesięcy w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

2x stężony roztwór SSC

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 9 częściami wody oczyszczonej; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

0,4x stężony roztwór SSC

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 49 częściami wody oczyszczonej; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

2x stężony roztwór SSC ze środkiem Tween-20 w stężeniu 0,05%

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 9 częściami wody oczyszczonej. Dodać 5 µl środka Tween-20 na 10 ml roztworu; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

Protokół FISH

(Uwaga: Należy możliwie ograniczać ekspozycję sondy i barwnika kontrastowego na światło w laboratorium).

Przygotowanie szkiełek

- Wkropić próbkę komórek na szkiełko mikroskopowe. Pozostawić do wyschnięcia. (Opcjonalnie, w przypadku korzystania z komory do suszenia próbek do badań cytogenetycznych: próbki należy nanieść przy użyciu komory do suszenia próbek do badań cytogenetycznych. Komora powinna mieć temperaturę około 25°C i zapewniać wilgotność 50%, aby umożliwić optymalne naniesienie próbki komórek. Jeśli komora do suszenia próbek do badań cytogenetycznych nie jest dostępna, należy pozostawić próbki pod wyciągiem).
- Zanurzyć szkiełko w 2x stężonym roztworze SSC w temperaturze pokojowej na 2 minuty; nie wstrząsać.
- Odwodnić próbkę, korzystając z szeregu alkoholowego (etanol w stężeniu 70%, 85% i 100%); zanurzać szkiełko w każdym roztworze alkoholu na 2 minuty w temperaturze pokojowej.
- Pozostawić do wyschnięcia.

Denaturacja wstępna

- Wyjąć roztwór sond z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej. Przed użyciem roztworu należy krótko odwirować probówki.
- Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
- Pobrać 10 µl roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość do probówki mikrowirówkowej. Bezwzględnie włożyć pozostały roztwór sond z powrotem do zamrażarki.
- Umieścić roztwór sond i szkiełko z próbką na płycie grzewczej o temperaturze 37°C (+/-1°C) na 5 minut w celu ich wstępnego ogrzania.
- Wkropić 10 µl mieszaniny sond na próbkę komórek i ostrożnie nanieść szkiełko nakrywkowe. Zakleić szkiełko klejem kauczukowym i poczekać na jego całkowite wyschnięcie.

Denaturacja

- Denaturować jednocześnie próbkę i mieszaninę sond, ogrzewając szkiełko na płycie grzewczej o temperaturze 75°C (+/-1°C) przez 2 minuty.

Hybrydyzacja

- Umieścić szkiełko w wilgotnym, światłoszczelnym pojemniku w temperaturze 37°C (+/-1°C) na noc.

Płukania po hybrydyzacji

- Wyjąć barwnik DAPI z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej.
- Ostrożnie zdjąć szkiełko nakrywkowe i usunąć wszelkie pozostałości kleju.

- Zanurzyć szkiełko w 0,4x stężonym roztworze SSC (pH 7,0) w temperaturze 72°C (+/-1°C) na 2 minuty; nie wstrząsać.
- Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie zanurzyć je w 2x stężonym roztworze SSC ze środkiem Tween-20 w stężeniu 0,05% (pH 7,0) w temperaturze pokojowej na 30 sekund; nie wstrząsać.
- Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie nanieść 10 µl barwnika DAPI antyfady na każdą próbkę.
- Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić rozpoznanie barw.
- Obejrzyć pod mikroskopem fluorescencyjnym. (Patrz **Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego**).

Stabilność wykonanych preparatów

Preparaty poddane procedurze nadają się do analizy przez maksymalnie 1 miesiąc, o ile są przechowywane w ciemności w temperaturze pokojowej lub niższej.

Zalecenia dotyczące procedury

- Wypiekanie lub postarzenie preparatów może zmniejszyć fluorescencję sygnału.
- Stosowanie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę Cytocell Ltd może mieć negatywny wpływ na warunki hybrydyzacji.
- Do pomiaru temperatury roztworów, łaźni wodnych i inkubatorów należy używać skalibrowanego termometru, ponieważ temperatury te są kluczowe dla optymalnego działania produktu.
- Stężenia, wartości pH i temperatury roztworów wykorzystywanych do płukania są istotne, gdyż mało surowe warunki mogą doprowadzić do nieswoistego wiązania sondy, a zbyt surowe warunki mogą spowodować brak sygnału.
- Niecałkowita denaturacja może spowodować brak sygnału, a nadmierna denaturacja może również doprowadzić do nieswoistego wiązania.
- Nadmierna hybrydyzacja może spowodować otrzymanie dodatkowych lub nieoczekiwanych sygnałów.
- Przed użyciem testu do celów diagnostycznych użytkownicy powinni zoptymalizować protokół dla własnych próbek.
- Suboptymalne warunki mogą prowadzić do nieswoistego wiązania sond, które może zostać błędnie zinterpretowane jako sygnał sondy.

Interpretacja wyników

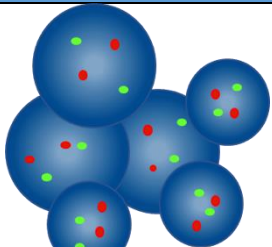
Ocena jakości preparatów

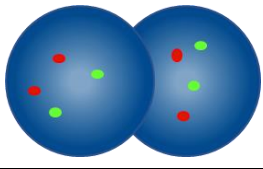
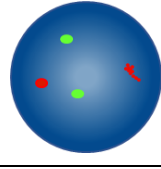
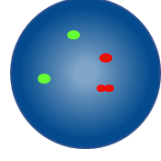
Preparatu nie należy oceniać w następujących przypadkach:

- Sygnały są zbyt słabe, aby można było analizować je w pojedynczych filtrach — do analizy można przystąpić jedynie, jeśli sygnały są jasne, wyraźne i łatwe do oceny.
- Widoczna jest duża liczba zlepionych/nakładających się na siebie komórek, co utrudnia analizę.
- W >50% komórek nie doszło do hybrydyzacji.
- Pomiędzy komórkami znajdują się liczne cząstki fluorescencyjne i/lub widoczne jest „zamglenie” fluorescencyjne, które zakłóca sygnały — w przypadku preparatów optymalnych do oceny tło powinno być ciemne lub czarne i klarowne.
- Nie można rozróżnić granic jądra komórkowego lub są one nieciągłe.

Wytyczne dotyczące analizy

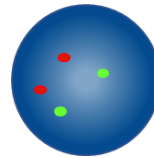
- Każda próbka powinna być analizowana i interpretowana przez dwóch analityków. Wszelkie rozbieżności powinny zostać rozwiązane w wyniku oceny dokonanej przez trzeciego analityka.
- Każdy analityk powinien posiadać odpowiednie kwalifikacje zgodne z normami krajowymi.
- Każdy analityk powinien dokonać niezależnej oceny 100 jąder dla każdej próbki. Pierwszy analityk powinien rozpocząć analizę od lewej strony preparatu, a drugi od prawej strony preparatu.
- Każdy analityk powinien zapisać własne wyniki w odrębnym arkuszu.
- Należy analizować wyłącznie nienaruszone jądra, nie wolno analizować jąder nakładających się na siebie, zlepionych, pokrytych resztkami cytoplazmy ani jąder wykazujących wysoki stopień autofluorescencji.
- Należy unikać obszarów, w których występuje nadmierna ilość resztek cytoplazmy lub nieswoista hybrydyzacja.
- Intensywność sygnału może się różnić nawet w obrębie jednego jądra. W takich przypadkach należy użyć filtrów pojedynczych i/lub wyregulować płaszczyznę ogniskowania.
- W warunkach suboptymalnych sygnały mogą wyglądać na rozlane. Jeśli dwa sygnały o tym samym kolorze stykają się ze sobą, odległość między nimi jest nie większa niż dwie szerokości sygnału lub istnieje cienkie pasmo łączące oba sygnały, należy zliczać je jako jeden sygnał.
- W przypadku wątpliwości, czy komórka nadaje się do analizy, nie należy jej analizować.

| Wytyczne dotyczące analizy | |
|---|--|
|  | Nie zliczać — jądra są za blisko siebie, aby można było określić ich granice |

| | |
|--|---|
|  | Nie zliczać jąder nakładających się na siebie — nie są widoczne całe obszary obu jąder |
|  | Zliczyć jako dwa sygnały czerwone i dwa sygnały zielone — jeden z dwóch sygnałów czerwonych jest rozlany |
|  | Zliczyć jako dwa sygnały czerwone i dwa sygnały zielone — przerwa widoczna w jednym czerwonym sygnale jest mniejsza niż dwie szerokości sygnału |

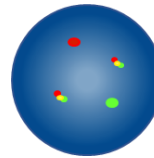
Wyniki oczekiwane

Oczekiwany wzorec sygnału wskazujący na stan prawidłowy



W komórce prawidłowej oczekiwane są dwa sygnały czerwone i dwa sygnały zielone (2C, 2Z).

Oczekiwany wzorec sygnału wskazujący na stan nieprawidłowy



Oczekiwany wzorec sygnału w komórce z translokacją t(6;14)(p21;q32.3) to jeden sygnał czerwony, jeden sygnał zielony i dwa sygnały fuzyjne (1C, 1Z, 2F).

W przypadku próbek aneuploidalnych/z reorganizacją nie zrównoważoną mogą wystąpić inne wzorce sygnału. Należy pamiętać, że w obecności reorganizacji genu IGH innych niż translokacja IGH-CCND3 zielony sygnał dla genu IGH może wyglądać na rozszczepiony.

Znana reaktywność krzyżowa

Zielona sonda IGH może wykazywać hybrydyzację krzyżową względem regionu 15q11.2 i 16p11.2.

Zgłaszanie zdarzeń niepożądanych

W przypadku podejrzenia nieprawidłowego działania tego wyrobu lub pogorszenia jego właściwości użytkowych, które mogło przyczynić się do wystąpienia zdarzenia niepożądanego (np. opóźnienia diagnozy lub postawienia błędnej diagnozy, opóźnienia leczenia lub podjęcia niewłaściwego leczenia), należy bezzwłocznie zgłosić ten fakt wytwórcy (e-mail: vigilance@ogt.com).

Jeśli ma to zastosowanie, zdarzenie należy zgłosić także właściwemu organowi krajowemu. Wykaz punktów kontaktowych ds. nadzoru nad produktami (ang. vigilance) jest dostępny na stronie: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Specyficzne parametry skuteczności

Swoistość analityczna

Swoistość analityczna to odsetek sygnałów, które hybrydują do właściwego locus i nie hybrydują do żadnej innej lokalizacji. Swoistość analityczną ustalono poprzez analizę łącznie 200 loci docelowych. Swoistość analityczną obliczono jako liczbę sygnałów FISH zhybrydowanych do prawidłowego locus podzieloną przez całkowitą liczbę zhybrydowanych sygnałów FISH.

Tabela 1. Swoistość analityczna dla produktu IGH/CCND3 Translocation, Dual Fusion Probe

| Sonda | Locus docelowy | L. sygnałów zhybrydowanych do prawidłowego locus | Łączna liczba zhybrydowanych sygnałów | Swoistość (%) |
|----------------|----------------|--|---------------------------------------|---------------|
| Czerwony CCND3 | 6p21 | 200 | 200 | 100 |
| Zielony IGH | 14q32.3 | 200 | 200 | 100 |

Czułość analityczna

Czułość analityczna to odsetek komórek interfazowych nadających się do oceny z oczekiwanym wzorcem sygnału wskazującym na stan prawidłowy. Czułość analityczną ustalono poprzez analizę komórek interfazowych w różnych próbkach prawidłowych. Czułość obliczono jako odsetek komórek nadających się do oceny, w których zaobserwowano oczekiwany wzorzec sygnału (z 95-procentowym przedziałem ufności).

Tabela 2. Czułość analityczna dla produktu IGH/CCND3 Translocation, Dual Fusion Probe

| L. komórek z oczekiwanym wzorcem sygnału | L. komórek z sygnałami nadającymi się do oceny | Czułość (%) | 95-procentowy przedział ufności |
|--|--|-------------|---------------------------------|
| 472 | 500 | 94,4 | 2,6 |

Laboratoria muszą zweryfikować wartości odcięcia w oparciu o własne dane^{5, 6}.

Charakterystyka wartości odcięcia dla stanu prawidłowego

Wartość odcięcia dla stanu prawidłowego, określana w odniesieniu do sond FISH, to maksymalny odsetek komórek interfazowych nadających się do oceny, dla których obserwowany jest określony wzorzec sygnału charakterystyczny dla stanu nieprawidłowego, przy którym próbka jest uznawana za prawidłową pod względem tego wzorca sygnału.

Wartość odcięcia dla stanu prawidłowego ustalono przy użyciu próbek pobranych od pacjentów ze stanem prawidłowym i pacjentów dodatnich względem badanej rearanżacji. Dla każdej próbki zarejestrowano wzorzec sygnału dla 100 komórek. W celu określenia wartości progowej, dla której uzyskiwana jest maksymalna wartość czułość + swoistość-1, obliczono indeks Youdena.

Tabela 3. Charakterystyka wartości odcięcia dla stanu prawidłowego dla produktu IGH/CCND3 Translocation, Dual Fusion Probe

| Wzorzec sygnału wskazujący na stan nieprawidłowy | Indeks Youdena | Wartość odcięcia dla stanu prawidłowego (%) |
|--|----------------|---|
| 1C, 1Z, 2Ż | 1 | 4 |

Precyzja i odtwarzalność

Precyzja to miara naturalnej zmienności wyników testu przy wielokrotnym powtarzaniu testu w tych samych warunkach. Miarę tę oceniono poprzez analizę powtórzeń wykonanych przy użyciu produktu zawierającego sondy o tym samym numerze serii, który wykorzystywano do badań jednej próbki, w niezmiennych warunkach, w ramach jednego dnia.

Odtwarzalność to miara zmienności testu, którą ustalono w kategoriach zmienności między próbkami, między dniami i między seriami. Odtwarzalność między dniami oceniano poprzez analizę tych samych próbek w trzech różnych dniach. Odtwarzalność między seriami oceniano poprzez analizę tych samych próbek w ramach jednego dnia przy użyciu produktu zawierającego sondy o trzech różnych numerach serii. Odtwarzalność między próbkami oceniono poprzez analizę trzech powtórzeń każdej próbki w ramach jednego dnia. Dla każdej próbki rejestrowano wzorce sygnału obserwowane w 100 komórkach interfazowych i obliczono odsetek komórek, w których zaobserwowano oczekiwany wzorzec sygnału.

Odtwarzalność i precyzję obliczono jako odchylenie standardowe (STDEV) między powtórzeniami dla każdej zmiennej i ogólne średnie STDEV.

Tabela 4. Odtwarzalność i precyzja dla produktu IGH/CCND3 Translocation, Dual Fusion Probe

| Zmienna | Odchylenie standardowe (STDEV) |
|-------------------|--------------------------------|
| Precyzja | 0,00 |
| Między próbkami | 0,00 |
| Między dniami | 0,00 |
| Między seriami | 0,00 |
| Odchylenie ogółem | 0,00 |

Skuteczność kliniczna

Skuteczność kliniczną ustalono na reprezentatywnej próbce docelowej populacji pacjentów. Dla każdej próbki zarejestrowano wzorzec sygnału dla ≥ 100 komórek interfazowych. Status prawidłowy/nieprawidłowy określano poprzez porównanie odsetka komórek z określonym wzorcem sygnału wskazującym na stan nieprawidłowy do wartości odcięcia dla stanu prawidłowego. Wyniki porównano następnie ze znanym statusem próbki.

Wyniki danych klinicznych poddano analizie w celu uzyskania wartości czułości, swoistości i wartości odcięcia, stosując podejście jednowymiarowe.

Tabela 5. Skuteczność kliniczna dla produktu IGH/CCND3 Translocation, Dual Fusion Probe

| Zmienna | Wynik |
|---|-------|
| Czułość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie dodatnich (True Positive Rate, TPR)) | 100% |
| Swoistość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie ujemnych (True Negative Rate, TNR)) | 100% |
| Odsetek wyników fałszywie dodatnich (False Positive Rate, FPR) = 1 – swoistość | 0% |

Dodatkowe informacje

W celu uzyskania dodatkowych informacji na temat produktu należy skontaktować się z działem wsparcia technicznego firmy CytoCell.

Tel.: +44 (0)1223 294048

E-mail: techsupport@cytoCELL.com

Strona WWW: www.ogt.com

Piśmiennictwo

1. Fonseca *et al.*, Cancer Res 2004;64:1546-58
2. Shaughnessy *et al.*, Blood 2001;98(1):217-23
3. Soniki *et al.*, Blood 2001;98(9):2837-44
4. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
5. 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.
6. 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.

Objaśnienie symboli

| | |
|------|---|
| REF | pl: Numer katalogowy |
| IVD | pl: Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i> |
| LOT | pl: Kod partii |
| | pl: Zajrzyj do instrukcji używania |
| | pl: Wytwórca |
| | pl: Użyj do daty |
| | pl: Dopuszczalna temperatura |
| | pl: Trzymać z dala od światła słonecznego |
| | pl: Zawartość wystarczająca do <n> testów |
| CONT | pl: Zawartość |

Patenty i znaki towarowe

CytoCell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy CytoCell Ltd.

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
Strona WWW: www.ogt.com

