



A Sysmex Group Company



Kasutusjuhend

REF: LPH 023-S / LPH023

## Sond PML/RAR $\alpha$ (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe



AINULT ERIALASEKS KASUTAMISEKS



www.cytocell.com

Lisateave ja muud keeled on saadaval aadressil [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

### Piirangud

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

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

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

FISH-i tulemuste tõlgendamine ja teavitamine peab vastama erialastele kutsestandarditele ja peaks arvesse võtma muud kliinilist ja diagnostilist teavet. See komplekt on ette nähtud muude laboratoorsete analüüside täiendamiseks ja ravi ei tohiks alustada, põhinedes vaid FISH-i tulemustel.

Protokoll järgimata jätmise võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/negatiivseid tulemusi.

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

### Kasutusotstarve

Sond CytoCell PML/RAR $\alpha$  (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe on kvalitatiivne, mitteautomaatne, fluorestsents *in situ* hübriidatsiooni (FISH) uuring, mida kasutatakse 15. kromosoomi 15q24 piirkonna ja 17. kromosoomi 17q21.1–q21.2 piirkonna vaheliste kromosomaalsete ümberkorralduste tuvastamiseks Carnoy lahuses (3:1 metanool/atsseethape) fikseeritud hematoloogiliselt tuletatud rakususpensioonides, mis pärinevad kinnitatud või kahtlustatud ägeda müeloidse leukeemiaga (AML) patsientidelt.

### Näidustused

See toode on loodud täiendusena teistele kliinilistele ja histopatoloogilistele uuringutele tunnustatud diagnostilistes ja kliinilistes raviteedes, kus teadmised *PML/RARA* translokatsiooni 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 hübriidiseeritakse 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 hübriidiseerimist eemaldatakse seondumata ja ebaspetsiifiliselt seotud DNA sond ning DNA visualiseeritakse vastandvärvisega. Seejärel võimaldab fluorestsentsmikroskoopia hübriidiseeritud sondi visualiseerimist sihtmärkmaterjalil.

### Sondi teave

PML (*promüelotsüütne leukeemia*) geen on asukohas 15q24.1 ja RARA (*retinoolhappe retseptor alfa*) geen on asukohas 17q21.2. Translokatsioon t(15;17)(q24;q21) põhjustab PML-RARA fusioonigeeni ja see on ägeda promüelotsüütse leukeemia (APL) diagnostiline tunnus.

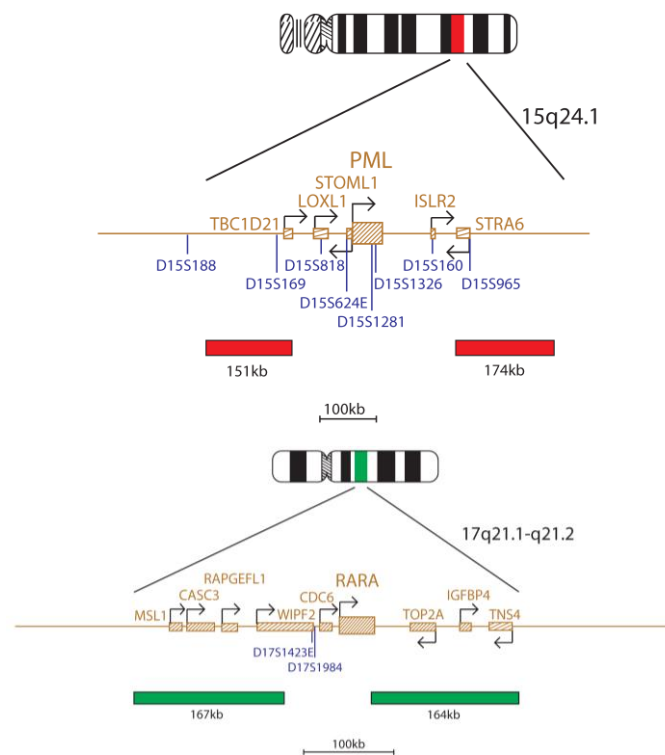
PML-RARA fusioonigeen tekib t(15;17)(q24;q21) translokatsiooniga, mida esineb üle 90% APL-i juhtudest, mis on leukeemia liik, mis hõlmab 5–8% ägeda müeloidse leukeemia juhtudest (AML)<sup>1,2</sup>. Juhtumite alamrühmas on leitud ka variantseid RARA translokatsioone. Tuntud fusioonipartnerid on NPM1 asukohas 5q35, NUMA1 asukohas 11q13, ZBTB16 (PLZF) asukohas 11q23, STAT5B asukohas 17q21, PRKAR1A asukohas 17q24, FIP1L1 asukohas 4q12 ja BCOR asukohas Xp11<sup>3,4,5</sup>.

PML ja RARA mõlemad on seotud normaalse hematopoeesiga. PML-i on kasvusupressor ja proapoptootiline aktiivsus, kusjuures RARA on transkriptsioonifaktor, mis vahendab retinoolhappe toimet kindate vastuelementide juures<sup>6</sup>. PML-RARA fusioonivalk käitub muutunud retinoolhappe retseptorina, mis on võimeline edastama onkogeenseid signaale<sup>7</sup>.

APL-ga patsientide puhul on kohene ravi kriitilise tähtsusega seoses diagnoosi fataalsete koagulatsioonihäirete ja eluhtlike verejooksudega. Haigusel ol enne all-trans-retinoolhappe (ATRA) ja arseenitrioksiidi (ATO) lisamist APL-i raviprotsollidesse halb prognoos, kuid pärast uute ravimite lisamist on üldine eluloomus oluliselt paranenud, nii et 90%<sup>5</sup> patsientidest tervistuvad. Variantsete RARA translokatsioonidega patsientide ravitundlikkus on varieeruv ja mõne patsiendi puhul esineb raviprotsollide suhtes resistentsus<sup>3,5</sup>. Seetõttu on oluline eristada PML-RARA fusiooniga APL-ga patsiente ja variantsete RARA translokatsioonidega patsiente.

### Sondi spetsifikatsioon

PML, 15q24.1, punane  
RAR $\alpha$ , 17q21.1-q21.2, roheline



Punasega märgistatud PML sondisegu hõlmab PML geeni suhtes tsentromeerset 151 kb sondi ja PML geeni suhtes telomeerset 174 kb sondi. Rohelisega märgistatud RAR $\alpha$  sondisegu hõlmab RAR $\alpha$  (RARA) geeni suhtes tsentromeerset 167 kb sondi, sh CASC3 geen, ja 164 kb sondi, mis hõlmab RAR $\alpha$  geeni telomeerset otsa ja ka TOP2A ja IGFBP4 gene.

### Tarnitavad materjalid

**Sond** 50  $\mu$ l vialiki kohta (5 analüüsi) või 100  $\mu$ l vialiki kohta (10 analüüsi)  
**Sondid** tarnitakse hübriidiseerimislahusega eelsegatuna (formamid; dekstraansulfaat; naatriumtsitraadi soolalahus (saline-sodium citrate, SSC)) ja on valmis kasutamiseks.

### Vastandvärv

150  $\mu$ l vialiki kohta (15 analüüsi)  
Vastandvärv on DAPI, pleekimisvastane (Sisaldus: 0,125  $\mu$ g/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenüülindool)).

### Hoiatused ja ettevaatusabinõud

1. *In vitro* diagnostiliseks kasutamiseks. Ainult erialaseks kasutamiseks.
2. DNA sondide ja DAPI vastandvärvi käsitlemisel kandke kindaid.
3. Sondisegu sisaldavad formamiidi, mis on teratogeenne; ärge hingake sisse auru ning vältige kontakti nahaga. Käsitsege ettevaatlikult; kasutage kindaid ja laborikittit.
4. DAPI on potentsiaalne kartsinogeen. Käsitsege ettevaatlikult; kasutage kindaid ja laborikittit.

- Vabanegede kõigist ohtlikest jäätmetest oma asutuse ohtlike jäätmekäitluse eeskirjade kohaselt.
- Kasutajad peavad olema suutelised eristama punast, sinist ja rohelist värvi.
- Esitatud protokoll ja reaktiivide järgimata jätmise võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.
- Sondi ei tohiks lahjendada ega segada teiste sondidega.
- Sondi 10µl kasutamata jätmise protokoll denatureerimise etapis võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.

#### Säilitamine ja käsitsemine



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



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

#### Seadmed ja materjalid mis on vajalikud, kuid mida ei tarnita

Kasutada tuleb kalibreeritud seadmeid.

- Kuumutusplaat (täisplaadi ja täpse temperatuuriregulaatoriga kuni  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ )
- Kalibreeritud erineva mahuga mikropipetid ja otsikud vahemikus 1–200 µl
- Vesivann, täpse temperatuuriregulaatoriga  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ja  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures
- Mikrotsentrifuugi katsutid (0,5 ml)
- Fluorestsentsmikroskoop (vt fluorestsentsmikroskoobi soovitude lõiku)
- Faasikontrastmikroskoop
- Läbipaistvast plastist, keraamilised või kuumakindlast klaasist Coplini anumad
- Pintsetid
- Kalibreeritud pH-meeter (või pH indikaatorribad vahemikus pH 6,5–8,0)
- Niiskuskamber
- Fluorestsentsmikroskoobi immersioonõli
- Tsentrifuug
- Mikroskoobi alusklaasid
- 24x24 mm katteklasisid
- Taimer
- $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubaator
- Katteklaasi liim
- Vortex-segisti
- Gradueeritud silindrid
- Magnetsegisti
- Kalibreeritud termomeeter

#### Valikulised seadmed, mida ei tarnita

- Tsütogeneetiline kuivatuskamber

#### Vajalikud reaktiivid, mida ei tarnita

- 20-kordne naatriumsitraadi soolalahus (SSC)
- 100%-line etanool
- Tween-20
- 1M naatriumhüdroksiid (NaOH)
- 1M vesinikkloriid (HCl)
- Destilleeritud vesi

#### Fluorestsentsmikroskoobi soovitus

Kasutage optimaalseks visualiseerimiseks 100-vatist elavhõbelampi või sellega samaväärset ning immersioonõliga apokromaatselt objektiiviga 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 samaaegselt optimaalseks visualiseerimiseks.

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

#### Proovi ettevalmistamine

Komplekt on loodud kasutamiseks hematoloogilisel tuletatud rakususpensioonidega, mis on fikseeritud Carnoy lahuses (3:1 metanool/atsetehape) 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.

#### Lahuse ettevalmistamine

##### Etanooli lahused

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

- 70%-line etanool – 7 osa 100%-list etanooli suhtes 3 osa destilleeritud vett
- 85%-line etanool – 8,5 osa 100%-list etanooli suhtes 1,5 osa destilleeritud vett

Säilitage lahuseid kuni 6 kuud toatemperatuuril õhukindlas nõus.

#### 2x SSC lahused

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

#### 0,4 x SSC lahused

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

#### 2x SSC, 0,05% Tween-20 lahused

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

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

#### Enne denaturatsiooni

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

#### Denaturatsioon

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

#### Hübriidsatsioon

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

#### Hübriidsatsioonijärgsed pesud

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

#### Valmis slaidide stabiilsus

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

#### Protseduuri soovitus

- Slaidide keetmine või aegumine võib fluorestsentssignaali nõrgendada.
- Cytocell Ltd poolt toodetud või soovitatud reaktiivide asemel muude reaktiivide kasutamine võib ebasoodsalt mõjutada hübriidiseerimistingimusi
- Kasutage lahust, vesivannide ja inkubaatorite temperatuuri mõõtmisel kalibreeritud termomeetrit, sest need temperatuurid on toote optimaalseks toimimiseks kriitilise tähtsusega.
- Pesukontsentratsioonid, pH ja temperatuurid on olulised, kuna vähenerangus võib põhjustada sondi ebaspetsiifilist sidumist ja liiga suur rangus võib põhjustada signaali puudumist
- Mittetäielik denatureerimine võib põhjustada signaali puudumist ja üleliigne denatureerimine võib samuti põhjustada ebaspetsiifilist seondumist
- Üleliigne hübriidiseerimine võib põhjustada täiendavaid või ootamatuid signaale

- Kasutajad peaksid enne analüüsi kasutamist diagnostilisel eesmärgil protokoll oma proovidega optimeerima
- Suboptimaalsed tingimused võivad põhjustada ebaspetsiifilist seondumist, mida võidakse ekslikult sondi signaalina tõlgendada

### Tulemuste tõlgendamine

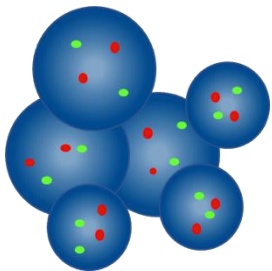
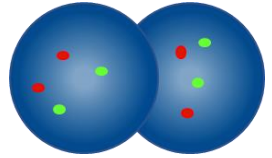
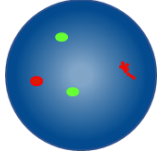
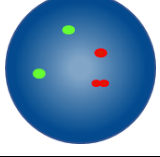
#### Slaidi kvaliteedi hindamine

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 hübriidiseeritud;
- rakkude vahel on üleliigsed fluorestsentsosakesed ja/või fluorestsentshägud, mis segab signaali – optimaalsetel slaididel peaks taust tunduma tume või must ja puhas;
- rakutuuma piire ei saa eristada ja need pole terviklikud.

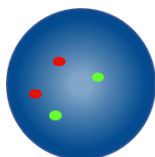
#### Analüüsi eeskirjad

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

Analüüsi eeskirjad	
	Mitte lugeda, kui tuumad on piiride määramiseks üksteisele liiga lähedal
	Mitte lugeda kattuvaid tuumasid, sest mõlema tuumi kõik alasid ei ole näha
	Lugeda kahe punase signaalina ja kahe rohelise signaalina, kui üks kahest punasest signalist on difuusne
	Lugeda kahe punase signaalina ja kahe rohelise signaalina, kui ühe punase signaali tühimik on kahest signaalipikkusest väiksem

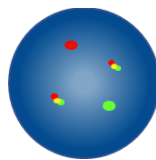
#### Eeldatavad tulemused

##### Eeldatav normaalne signaalimuster



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

##### Eeldatav ebanormaalne signaalimuster



t(15;17)(q24.1;q21) translokatsiooniga rakus on eeldatav signaalimuster üks punane, üks roheline ja kaks fusiooni (1P, 1R, 2F).

Aneuploidsete/tasakaalustamata proovides võivad esineda teised signaalimustrid

#### Teadaolev ristreaktiivsus

Teadaolev ristreaktiivsus puudub.

#### Kõrvalnähtudest teatamine

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

##### Analüütiline spetsiifilisus

Analüütiline spetsiifilisus on vaid õige lookusega hübriidiseeritud signaalide protsentarv. Analüütiline spetsiifilisus saavutati kokku 200 sihtmärk-lockuse analüüsimisel. Analüütiline spetsiifilisus arvatati, jagades õige lookusega hübriidiseeritud FISH-i signaalide arvu kogu hübriidiseeritud FISH-i signaali arvuga.

Tabel 1. Sondi PML/RAR $\alpha$  Translocation, Dual Fusion Probe analüütiline spetsiifilisus

Sond	Sihtmärk-lockus	Õige lookusega hübriidiseeritud signaalide arv	Hübriidiseeritud signaalide koguarv	Spetsiifilisus (%)
Punane PML	15q24.1	200	200	100
Roheline RAR $\alpha$	17p21	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 PML/RAR $\alpha$  Translocation, Dual Fusion Probe analüütiline tundlikkus

Eeldatava signaalimustri rakkude arv	Hinnatava signaaliga rakkude arv	Tundlikkus (%)	95% usaldusvahemik
480	500	96,0	2,1

##### Normaalse väljaarvamise piirväärtuste kirjeldus

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

Normaalne väljaarvamise piirväärtus saavutati, kasutades normaalsete 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 PML/RAR $\alpha$  Translocation, Dual Fusion Probe normaalse väljaarvamise piirväärtuste kirjeldus

Ebanormaalne signaalimuster	Youdeni koefitsient	Normaalne väljaarvamise piir (%)
1P, 1R, 2F	1,00	4

Laborid peavad oma andmete põhjal väljaarvamise piirid kinnitama<sup>9, 10</sup>.

##### Täpsus ja reprodutseeritavus

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

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

Reproduitseeritavus ja täpsus arvatuti replikaatide vahelise standardhälvena (SH) iga muutuja kohta ning üldise keskmise SH suhtarvuna.

**Tabel 4. Sondid PML/RAR $\alpha$  Translocation, Dual Fusion Probe reprodutseeritavus ja täpsus**

Muutuja	Standardhälve (SH)
Täpsus	0,00
Proov-prooviga	0,00
Päev-päevaga	0,00
Partii-partiiga	0,00
Hälve	0,00

#### Kliiniline toimivus

Kliiniline toimivus saavutati toote sihtgrupi esindusproovil. Iga proovi kohta salvestati  $\geq 100$  interfaasi raku signaali ustrid. Normaalne/ebanormaalne hinnang anti, võrreldes teatud ebanormaalse signaalmustriga rakkude protsenti normaalse väljaarvamise piirväärtusega. Siis võrreldi tulemusi proovi teadadeva olekuga.

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

**Tabel 5. Sondid PML/RAR $\alpha$  Translocation, Dual Fusion Probe kliiniline toimivus**

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

#### Lisateave

Lisateavet saate kontakteerudes ettevõtte CytoCell tehnilise toe osakonnaga.

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




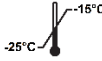


**E-mail:** techsupport@cytoCELL.com

**W:** www.ogt.com

#### Viited

1. Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
2. Campbell *et al.*, Biomed Research International 2013;2013:1-5
3. Creutzig *et al.*, Blood 2012;120(16):3187-3205
4. Zhang *et al.*, Blood Reviews 2015;29(2):101-125
5. Tomita *et al.*, International Journal of Haematology 2013;97(6):717-725
6. Grimwade *et al.*, Blood 2000;96(4):1297-1308
7. Lo-Coco, Hasa, Best practice & research. Clinical haematology 2014;27(1):3-9
8. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
9. 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.
10. Wiktor AE, Dyke DLV, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16-23.

#### Sümbolite seletus

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

#### Patendid ja kaubamärgid

CytoCell on CytoCELL Ltd registreeritud kaubamärk.



#### CytoCELL Ltd.

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