

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. Mikrocentrifugační 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 míchačka
21. Kalibrovaný teploměr

Volitelné vybavení, které není součástí dodávky

1. Cytogenetická sušicí komora

Potřebné reagenty, které nejsou součástí dodávky

1. 20x fyziologický roztok citrátů 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 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]
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.

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 mikroskopová 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 sklíček⁹.

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

(Oznámka: Dbejte, aby vždy byla omezena expozice sondy a kontrastních barviv osvětlení v laboratorii).

Příprava sklička

1. Naneste buněčný vzorek na mikroskopové skličko. Nechte ho uschnout. **(Volitelně při použití cytogenetické sušicí komory:** vzorky lze na skličko 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 série (70%, 85% a 100%), vždy po dobu 2 minut při pokojové teplotě.
4. Nechte ho uschnout.

Pre-denaturace

5. Vyjměte sondu z mrazničky a nechte 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 mikrocentrifugační zkumavky. Zbytek sondy vraťte rychle do mrazničky.
8. Sondu a skličko se vzorkem umístěte na varnou desku a předejte ji 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 kaučukového lepidla 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. Neprotřepávejte.
16. Skličko osušte a na každý vzorek naneste 10 µl 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 připravených 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 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. 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

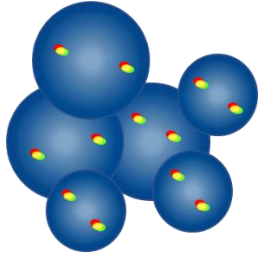
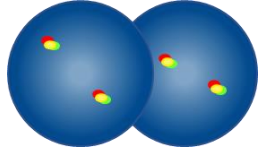
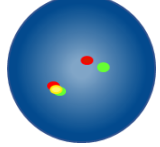
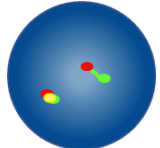
Skličko by se nemělo analyzovat, jestliže:

- jsou signály příliš slabé, a nelze je proto analyzovat jednoduchými filtry – pro pokračování v analýze 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 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

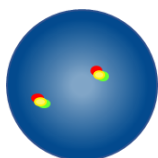
- Každý vzorek musí analyzovat a vyhodnotit dva analytici. Jakékoliv nesrovnalosti se musí vyřešit hodnocením třetího analytika.
- Všichni analytici musí mít odpovídající kvalifikaci v souladu s uznanými i národními standardy.
- Všichni analytici musí provést nezávislé hodnocení 100 jader každého vzorku. První analytik musí začít provádět analýzu z levé strany sklička 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 dvoubarevných zlomových sond není mezera mezi červeným a zeleným signálem větší než dvě signální šířky, počítejte to 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 – všechny oblasti obou jader nejsou viditelné
	Počítejte jako dva fúzní signály - mezera mezi červeným a zeleným signálem je menší než dvě šířky signálu
	Počítejte jako dva fúzní signály - jeden fúzní signál je difúzní

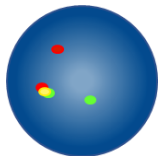
Předpokládané výsledky

Předpokládaný vzorec normálního signálu

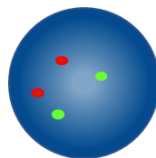


U normální buňky se předpokládají dva červené/zelené fúzní signály (2F). Díky variabilitě oblasti IGHV se červený a zelený signál ve fúzním signálu mohou jevit jako signály v těsné blízkosti, ale ne jako signál spojený.

Předpokládané vzorce abnormálního signálu



V buňce s monoalelickou translokací IGH bude mít předpokládaný vzorec signálu jeden červený, jeden zelený signál a jednu fúzi (1C, 1Z, 1F).



V případě bialelické translokace nebude mít předpokládaný vzorec signálu žádnou fúzi a bude mít jeden červený a dva zelené signály (2C, 2Z).

U aneuploidních/nevyvážených vzorků jsou možné jiné vzory signálu.

Známa zkřížená reaktivita

Zelená sonda IGH může vykazovat zkříženou hybridizaci na 15q11.2 a 16p11.2.

Hlášení nežádoucích účinků

Pokud se domníváte, že prostředek nefungoval správně nebo došlo ke zhoršení jeho funkčních charakteristik, což mohlo přispět ke vzniku nežádoucích událostí (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 Breakpart Probe IGH

Sonda	Cílový lokus	Počet signálů hybridizovaných na správný lokus	Celkový počet hybridizovaných signálů	Specifita (%)
Červená IGHC	14q32.3	200	200	100
Zelená IGHV	14q32.3	200	200	100

Analytická citlivost

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

Tabulka 2. Analytická senzitivita Breakpart Probe IGH

Počet buněk s předpokládanými vzorci signálu	Počet buněk se započítatelnými signály	Citlivost (%)	Interval spolehlivosti 95 %
490	500	98,0	1,4

Charakteristika normálních mezních hodnot

Normální mezní hodnota ve spojení se sondami FISH je maximální procento započítatelných 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 normálních a pozitivních pacientů. Pro každý vzorek byly zaznamenány signálové vzory 100 buněk. Byl vypočten Youdenův index k nalezení prahové hodnoty, u níž je hodnota senzitivita + specifita -1 maximální.

Tabulka 3. Charakteristika normálních mezních hodnot Breakpart Probe IGH

Vzorec abnormálního signálu	Youdenův index	Normální mezní hodnota (%)
1C, 1Z, 1F	0,99	7

Laboratoře si musí ověřit mezní hodnoty pomocí vlastních dat^{10,11}.

Přesnost a reprodukovatelnost

Přesnost je míra přirozeného kolísání testu při několikanásobném opakování za stejných podmínek. Hodnocení bylo provedeno opakovanou analýzou sond stejného čísla šarže, kdy testy probíhaly na stejném vzorku za stejných podmínek tentýž den.

Reprodukovatelnost je míra variability testu a byla stanovena na základě variability mezi jednotlivými vzorky, jednotlivými dny a jednotlivými dávkami. Reprodukovatelnost mezi jednotlivými dny byla vyhodnocena analýzou stejných vzorků ve všech různých dnech. Reprodukovatelnost mezi jednotlivými šaržemi byla vyhodnocena analýzou stejných vzorků tentýž den pomocí tří různých čísel šarží sondy. Reprodukovatelnost mezi jednotlivými vzorky byla hodnocena analýzou tří replikátů vzorku ve stejný den. Pro každý vzorek byly zaznamenány

signálové vzory 100 interfázních buněk a bylo vypočteno procento buněk s předpokládaným signálovým vzorem.

Reprodukovatelnost a přesnost byly vypočteny jako směrodatná odchylka (STDEV) mezi replikáty pro každou proměnnou a jako celková střední hodnota STDEV.

Tabulka 4. Reprodukovatelnost a přesnost Breakapart Probe IGH

Variabilní	Směrodatná odchylka (STDEV)
Přesnost	1,10
Mezi vzorky	0,53
Mezi dny	1,03
Mezi šaržemi	0,19
Celková odchylka	0,87

Klinická funkce

Klinická funkce byla stanovena na základě reprezentativního vzorku populace, pro niž je produkt určen. Pro každý vzorek byly zaznamenány signálové vzory ≥ 100 interfázních buněk. Bylo provedeno normální/abnormální stanovení porovnáním procenta buněk se specifickým abnormálním signálovým vzorem v e srovnání s normálními mezními hodnotou. Výsledky byly poté porovnány se známým stavem vzorku.

Výsledky klinických dat byly analyzovány za účelem stanovení senzitivity, specifity a mezní hodnoty pomocí jednodimenzního přístupu.

Tabulka 5. Klinická funkce Breakapart Probe IGH

Variabilní	Výsledek
Klinická senzitivita (míra skutečné pozitivity, TPR)	99,2%
Klinická specifita (míra skutečné negativity, TNR)	99,9%
Míra falešné pozitivivity (FPR) = 1 – specifita	0,1%

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.cytoCELL.com

Reference

- Gozzetti A, *et al.*, Cancer Res.2002 Oct 1;62(19):5523-7
- Ferry JA. Oncologist 2006 Apr;11(4):375-83
- Li S, *et al.*, Mod Pathol. 2012 Jan;25(1):145-56
- Snuderl M, *et al.*, Am J Surg Pathol. 2010 Mar;34(3):327-40
- Vose JM., Am J Hematol. 2013;88(12):1082-8
- Bergsagel PL, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 1996 Nov 26;93(24):13931-6
- Sawyer JR. Cancer Genet. 2011 Jan;204(1):3-12
- Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
- 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.

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-mail: probes@cytoCELL.com
W: www.ogt.com