

CEP 8 SpectrumOrange DNA Probe Kit

pl

CEP 8 SpectrumOrange
DNA Probe Kit

REF 07J20-008
07J22-008

G80917R07
B7JX0P

UWAGA: Zmiany wyróżniono kolorem szarym.

Objaśnienia użytych symboli



Wytwórca



Numer katalogowy



Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*



Zawartość wystarczająca do <n> badań



Ograniczenie dopuszczalnej temperatury



Niebezpieczeństwo



Niebezpieczeństwo



Niebezpieczeństwo



Zagrożenia biologiczne



Zajrzyj do instrukcji używania.



Użyć do



Autoryzowany przedstawiciel
w krajach Wspólnoty Europejskiej

CEP 8 SPECTRUMORANGE DIRECT LABELED CHROMOSOME ENUMERATION DNA PROBE KIT FOR FLOURESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION

(nr produktu: 30-160008, nr kat. 07J20-008;

nr produktu: 32-160008, nr kat. 07J22-008)

NAZWA ZASTRZEŻONA

CEP 8 SpectrumOrange Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit

NAZWA ZWYCZAJOWA LUB POWSZECHNIE STOSOWANA

Odczynniki do fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH)

PRZEZNACZENIE

Zestaw sond CEP 8 SpectrumOrange DNA Probe Kit przeznaczony jest do detekcji alfa-satelitarnych sekwencji bogatych w pary AT w regionie centromerowym chromosomu 8 w połączeniu z rutynowymi diagnostycznymi badaniami cytogenetycznymi. Może on być wykorzystywany jako uzupełnienie klasycznych badań cytogenetycznych służących do identyfikowania i liczenia kopii chromosomu 8 metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) w jądrach interfazowych oraz płytkach metafazowych komórek pochodzących ze szpiku kostnego pacjentów chorych na schorzenia mieloidalne [przewlekła białaczka szpikowa (ang. *Chronic Myelogenous Leukemia*, CML), ostra białaczka szpikowa (ang. *Acute Myeloid Leukemia*, AML), zespół mieloproliferacyjny (ang. *Myeloproliferative Disorder*, MPD), zespół

mielodysplastyczny (ang. *Myelodysplastic Syndrome*, MDS) oraz choroby układu krwiotwórczego niesklasyfikowane gdzie indziej (ang. *Hematological disorders not otherwise specified*, HDNOS)]. Zestaw ten nie jest przeznaczony do użytku jako samodzielny test służący do raportowania wyników badań. Nie jest on również przeznaczony do badania materiału pochodzącego z długotrwałych hodowli, takiego jak amniocyty, fibroblasty czy komórki nowotworowe.

WPROWADZENIE

Aberracje chromosomowe występujące w schorzeniach mieloidalnych zostały obszernie przebadane. W schorzeniach tych ma miejsce wiele różnych nieprawidłowości chromosomów. W około 18% wszystkich schorzeń mieloidalnych obecna jest trisomia chromosomu 8.¹ Przewlekła białaczka szpikowa (CML) stanowi około 15% przypadków białaczki wykrywanej u osób dorosłych. Mediana wieku w momencie wystąpienia choroby to 67 lat, jednakże z CML mamy do czynienia we wszystkich grupach wiekowych (analiza populacyjna SEER). W 2012 r. przewidywano rozpoznanie 4870 przypadków tej choroby w USA oraz zgon 440 pacjentów chorujących na to schorzenie.¹⁶ CML jest chorobą klonalną szpiku kostnego, charakteryzującą się nowotworowym rozrostem granulocytów. Przebieg tej choroby dzieli się na 2 główne fazy: początkową fazę przewlekłą i końcową fazę przełomu blastycznego. Przejściu z fazy przewlekłej do fazy przełomu blastycznego często towarzyszy co najmniej jedna z 3 swoistych dla tej choroby aberracji chromosomowych: trisomia chromosomu 8, występowanie dodatkowego chromosomu Philadelphia lub izochromosomu 17 (17q). Zaburzenia te często wyprzedzają pojawienie się objawów klinicznych przełomu blastycznego o 2 do 6 miesięcy. Trisomia chromosomu 8 występuje w około 20 do 50% przypadków nieprawidłowości.²⁻⁴

Zespoły mieloproliferacyjne (MPD) to grupa przewlekłych nowotworów klonalnych, charakteryzujących się nadmierną proliferacją jednej lub kilku mieloidalnych linii komórkowych. Zazwyczaj w mniejszym stopniu wpływają one na proces dojrzewania komórek, nie dochodzi bowiem do zatrzymania tego procesu. Do głównych podtypów MPD należą: czerwienica prawdziwa (ang. *polycythemia vera*, PV), idiopatyczna mielofibroza (ang. *idiopathic myelofibrosis*, IMF), nadpłytkowość samoistna (ang. *essential thrombocythemia*, ET) oraz przewlekła białaczka szpikowa (CML), która na ogół uznawana jest za oddzielną jednostkę chorobową i opisana została powyżej. Wymienione podtypy MPD różnią się pod względem rodzaju komórek hematopoetycznych (krwiotwórczych), które w największym stopniu ulegają namnożeniu. We wszystkich przypadkach chorób należących do zespołów mieloproliferacyjnych obserwuje się tendencję progresji do ostrej białaczki nieлимfoblastycznej (ang. *acute nonlymphocytic leukemia*, ANLL). Mimo iż w przypadku MPD nie występują swoiste nieprawidłowości kariotypowe, w niektórych chromosomach preferencyjnie dochodzi do nieprawidłowości liczbowych i strukturalnych. Najczęściej występującymi zmianami są rearanżacje długiego ramienia chromosomu 1, monosomia 7, trisomia 8, trisomia 9, delecja na ramieniu 13q oraz delecja na ramieniu 20q. Trisomia 8 stanowi około 20% wszystkich nieprawidłowości chromosomów występujących w przypadkach czerwienicy prawdziwej (PV) i zwykle współwystępuje z trisomią 9.^{5,6} Spośród wszystkich przypadków IMF, w których dochodzi do nieprawidłowości chromosomów, trisomia 8 stanowi 10%.⁴ Zespoły mielodysplastyczne (MDS) to grupa słabo zdefiniowanych schorzeń, występujących głównie wśród osób starszych, gdzie dochodzi do zaburzeń w szpiku kostnym na skutek jakościowego i ilościowego upośledzenia komórek hematopoetycznych. MDS to szpikowe hemocytopatie klonalne o stosunkowo heterogennym spektrum obrazu klinicznego.

Głównymi problemami klinicznymi w tych zaburzeniach są współwystępujące zespoły chorobowe spowodowane cytopeniami we

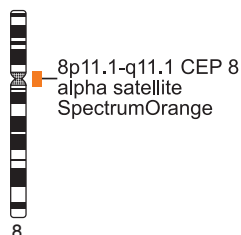
krwi obwodowej oraz ryzyko transformacji MDS w ostrą białaczkę szpikową (AML). W populacji ogólnej MDS występują z częstością 5 na 100 000 osób. Jednak wśród osób w wieku 70 lat lub więcej częstość występowania zwiększa się i wynosi 22-45 na 100 000 i dalej wzrasta z wiekiem.¹⁷ Najważniejszą morfologiczną cechą szpiku kostnego w zespole MDS jest zaburzenie zakłócające różnicowanie i proliferację wszystkich linii komórkowych. Pacjenci ze szpikiem normo- lub bogatokomórkowym wykazują jednocześnie cytopenię w krwi obwodowej. Swoiste aberracje chromosomowe zaobserwowano u prawie 79% pacjentów z uprzednio stwierdzonym karyotypem związanym z MDS. Do najczęściej występujących aberracji należy delecja na ramieniu 5q, monosomia 7 oraz trisomia 8.⁴ Trisomia 8 występuje w około 10 do 20% przypadków nieprawidłowości chromosomowych.^{4,7,8}

Ostra białaczka nielimfoblastyczna (ANLL) jest najczęstszą formą białaczki, występującą wśród osób dorosłych, na którą rocznie zapada około 2,5 osoby na 100 000. Istotną cechą patologiczną ANLL jest nadmierne gromadzenie się niedojrzałych komórek prekursorowych szpiku z linii mielocytarnej w samym szpiku, w krwi obwodowej oraz czasem w innych tkankach. Przypuszczalnie czynnik blokujący dojrzewanie komórek prekursorowych uniemożliwia dalsze przejście komórek mieloidalnych przez jeden lub kilka z 4 głównych szlaków różnicowania. Białaczce ANLL towarzyszy ponad 25 nieprawidłowości cytogenetycznych, a u 80% pacjentów z ANLL stwierdzono co najmniej jedną z nich. Sugeruje to, iż choroba ta wywołana jest nieograniczoną ekspansją pojedynczego klonu pochodzącego z jednej komórki, która uległa rearanżacji genetycznej. Trisomia 8 jest zdecydowanie najczęściej występującą aberracją liczbową w ANLL, stanowiąc jedyną zmianę w 7% wszystkich przypadków nieprawidłowości chromosomowych oraz 15% przypadków nieprawidłowości ogółem.^{2,4,9}

ZASADA METODY

Hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ* jest techniką umożliwiającą wizualizację swoistych sekwencji kwasów nukleinowych na preparacie komórkowym. Dokładniej rzecz ujmując, badanie DNA metodą FISH polega na precyzyjnym przyłączeniu (ang. *annealing*) jednoniciowej, znakowanej fluorescencyjnie sondy DNA do komplementarnych sekwencji docelowych. Efekt hybrydyzacji sondy do fragmentu komórkowego DNA może być obserwowany dzięki mikroskopii fluorescencyjnej.

Tkanka składająca się z jąder interfazowych lub płytek metafazowych jest nanoszona na szkiełka zgodnie ze standardowymi procedurami postępowania w badaniach cytogenetycznych. Uzyskane w ten sposób DNA ulega denaturacji do formy jednoniciowej, co w konsekwencji pozwala mu na hybrydyzację z sondą DNA CEP 8. Po hybrydyzacji nadmiar niezwiązanej sondy jest usuwany w serii płukań, a chromosomy i jądra są barwione przy użyciu barwnika kontrastowego DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol), specyficznego barwnika wiążącego się z DNA, fluoryzującego na niebiesko. Efekt hybrydyzacji sondy DNA CEP 8 jest widoczny w mikroskopie fluorescencyjnym wyposażonym w odpowiednie filtry wzbudzające i emisyjne, umożliwiające wizualizację zarówno intensywnego pomarańczowego sygnału fluorescencyjnego skupionego w centromerze chromosomu 8, jak i wybarwionego na niebiesko chromosomu i jąder. Liczenie kopii chromosomu 8 odbywa się w badaniu mikroskopowym jąder interfazowych i/lub płytek metafazowych. Wybarwione fluorescencyjnie centromery chromosomu 8 są dobrze widoczne na tle niebieskiej fluorescencji barwnika DAPI barwiącego jądrowe DNA. W porównaniu z klasycznymi metodami cytogenetycznymi, procedura CEP pozwala na uzyskanie wyższego odsetka jąder możliwych do zinterpretowania w każdym preparacie i umożliwia wzrokowe liczenie kopii chromosomu 8 w obrębie jąder. Wyniki badań podawane są jako odsetek jąder, dla których uzyskano 0, 1, 2, 3, 4 oraz > 4 sygnały fluorescencyjne. Każdy sygnał fluorescencyjny odpowiada centromerowi chromosomu 8. Jądro, dla którego uzyskano 2 sygnały fluorescencyjne, nazywane jest jądrem „dwusygnałowym”. Jądro, dla którego uzyskano 3 sygnały fluorescencyjne, nazywane jest jądrem „trójsygnałowym”.



Sonda DNA CEP 8 jest bezpośrednio wyznakowaną na pomarańczowo (SpectrumOrange) fluorescencyjną sondą DNA swoistą dla alfa-satelitarnych sekwencji DNA bogatych w pary AT w regionie centromerowym chromosomu 8 (8p11.1-q11.1). Test przeznaczony jest do wykrywania i liczenia kopii chromosomu 8 zarówno w jądrach interfazowych, jak i płytkach metafazowych metodą FISH.

ODCZYNNIKI I APARATY

Materiały dostarczone

Zestaw ten zawiera 4 odczynniki wystarczające do wykonania około 20 oznaczeń. Jedno oznaczenie definiuje się jako pojedynczy obszar docelowy o wymiarach 22 mm x 22 mm.

Tabela 1. CEP 8 SpectrumOrange DNA Probe Kit
(nr produktu: 30-160008, nr kat. 07J20-008)

Składnik	Skład	Nr produktu	Zawartość	Przechowywanie
Sonda DNA CEP 8: plazmid <i>E. coli</i> (sonda poddana wstępnej denaturacji)	5 ng/μL sondy DNA wyznakowanej pomarańczowym fluoroformem (SpectrumOrange), zawierającej sekwencje alfa-satelitarne, wstępnie wymieszanej z buforem hybrydyzacyjnym (siarczan dekstranu, formamid SSC)	30-170008	220 μL/ fiolkę	-20 °C bez dostępu światła
Barwnik kontrastowy DAPI II	125 ng/mL DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol) w dichlorowodoroku fenylenodiaminy, glicerolu i buforze	30-804841	300 μL/ fiolkę	-20 °C bez dostępu światła
NP-40	detergent niejonowy	30-804818	1 mL/ fiolkę	-25 do 30 °C
20X SSC	chlorek sodowy i cytrynian sodowy	30-805850	66 g/ pojemnik	-20 do 25 °C

Tabela 2. CEP 8 SpectrumOrange DNA Probe Kit with ProbeChek Control Slides
(nr produktu: 32-160008, nr kat. 07J22-008)

Oprócz składników podanych w Tabeli 1. zestaw zawiera szkiełka ProbeChek.

Składnik	Skład	Nr produktu	Zawartość	Przechowywanie
Szkiełka zawierające kontrolę ujemną ProbeChek Negative Control Slides (0% trisomii 8/12)	Utrwalony materiał biologiczny pochodzący z kultur prawidłowych (~0% trisomii 8/12) ludzkich komórek limfoblastycznych, naniesiony na szkiełka mikroskopowe	30-805000	5 szkiełek (10 obszarów docelowych)	-20 °C z desykantem
Szkiełka zawierające kontrolę dodatnią ProbeChek Positive Control Slides (10% trisomii 8/12)	Utrwalony materiał biologiczny pochodzący z mieszanym (~10% trisomii 8/12 oraz ~90% disomii 8/12) kultur ludzkich komórek limfoblastycznych, naniesiony na szkiełka mikroskopowe	30-805002	5 szkiełek (10 obszarów docelowych)	-20 °C z desykantem

PRZECZOWYWANIE I OBCHODZENIE SIĘ Z PRODUKTEM

Zestaw sond CEP 8 DNA Probe Kit należy przechowywać w całości w temp. – 20 °C, w ciemnym i suchym miejscu. Szkiełka kontrolne ProbeCheck Control Slides przechowywać w temp. – 20 °C w szczelnie zamkniętym pojemniku z desykantem, chroniącym szkiełka przed wilgocią. Po przygotowaniu roztworów z soli 20X SSC oraz składników NP-40 należy je przechowywać w temperaturze pokojowej przez maksymalnie 6 miesięcy. Daty ważności każdego składnika testu podane są na poszczególnych etykietach.

Materiały wymagane, lecz niedostarczone

Odczynniki laboratoryjne

UWAGA: Jeśli warunki przechowywania nie zostały określone w instrukcji używania lub na etykiecie produktu, odczynniki przechowywać zgodnie z zaleceniami producenta/dostawcy.

- Formamid ultraczysty.
- Etanol (100%). Przechowywać w temperaturze pokojowej.
- Stężony (12N) HCl
- 1N NaOH
- Oczyszczona woda (destylowana lub dejonizowana lub Milli-Q). Przechowywać w temperaturze pokojowej.
- Utrwalacz (metanol:kwas octowy w stosunku 3:1). Do codziennego przygotowywania.
- Desykant Drierite lub azot (w postaci gazu)
- Klej kauczukowy

Sprzęt laboratoryjny

- Mikroskop fluorescencyjny wyposażony w zalecane filtry
- Mikroskop świetlny z kontrastem fazowym
- Odtłuszczone szkiełka mikroskopowe
- Płyta grzejna do preparatów (45 do 50 °C)
- Szklane szkiełka nakrywkowe o wymiarach 22 mm x 22 mm
- Pipeta mikrolitrowa (o zakresie od 1 do 10 µL) oraz łańcuch końcówki
- Polipropylenowe próbki do mikrowirówek z polipropylenu (0,5 mL lub 1,5 mL)
- Timer
- Mieszadło magnetyczne
- Worteks
- Mikrowirówka
- Cylinder miarowy
- Łaźnie wodne (67 ± 2 °C oraz 73 ± 1 °C)
- Inkubator powietrzny (42 °C)
- Rysik z diamentową końcówką
- Komora wilgotnościowa
- Pęseta
- Strzykawka jednorazowego użytku (5 mL)
- Kominki do barwienia (naczynka Coplina) (6), sugerowany typ: Wheaton. Nr 900620; kominek pionowy
- Pehametr oraz papier lakmusowy
- Skalibrowany termometr
- Druciane statywy na próbki
- Filtr o wielkości porów 0,45 µm

Sprzęt mikroskopowy oraz filtry

Mikroskop: Do oględzin rezultatu hybrydyzacji wymagany jest mikroskop fluorescencyjny z systemem epiiluminacji. W celu uzyskania optymalnego przebiegu oględzin preparatu FISH należy sprawdzić, czy mikroskop działa prawidłowo. Mikroskop przystosowany do oględzin rezultatów typowego barwienia DNA barwnikiem DAPI, jednak propidyn lub kwinkaryna może nie być odpowiedni do pracy z testami FISH. Zaleca się rutynowe czyszczenie mikroskopu oraz okresowe strojenie, zwłaszcza, o ile to konieczne, dostrojenie/centrowanie lampy, wykonywane przez inżyniera serwisowego producenta.

Źródło światła wzbudzającego: Rekomendowane źródło światła wzbudzającego to 100-watowa lampa rtęciowa lub jej odpowiednik o zbliżonym natężeniu oraz spektrum emitowanego światła. Należy skonsultować się z inżynierem serwisowym producenta, czy dany system iluminacji fluorescencyjnej jest odpowiedni do oględzin próbek FISH. Należy zapisać liczbę godzin pracy żarówki i wymienić ją, zanim upłynie wyznaczony czas jej zużycia. O ile to konieczne, należy upewnić się, czy lampa jest właściwie wyregulowana.

Obiektyw: Używając mikroskopu wyposażonego w 100-watową lampę rtęciową lub jej odpowiednika o zbliżonym natężeniu oraz spektrum emitowanego światła, należy stosować obiektyw do fluorescencji z imersją olejową o aperturze numerycznej $\geq 0,75$. Obiektyw powiększający 40-krotnie z okulem powiększającym 10-krotnie jest właściwy do skanowania próbek w celu wybrania obszarów odpowiednich do zliczania sygnałów. Satisfakcjonujące

rezultaty zliczania sygnałów FISH uzyskuje się przy użyciu obiektywów achromatycznych z imersją olejową, powiększających 63-lub 100-krotnie. **Olejek imersyjny:** Do obiektywów należy używać olejku imersyjnego przeznaczonego do mikroskopii fluorescencyjnej, charakteryzującego się niską autofluorescencją.

Filtr: Zestawy filtrów wielopasmowych przeznaczone do mikroskopu fluorescencyjnego firmy Abbott Molecular zostały zoptymalizowane do wykonywania analizy przy użyciu bezpośrednio wyznakowanych sond CEP. Dla większości modeli mikroskopów dostępne są kompletne, złożone i wyregulowane zestawy filtrów firmy Abbott Molecular. Zalecanym filtrem do zestawu sond CEP 8 SpectrumOrange DNA Probe Kit jest filtr dwupasmowy DAPI/Orange Filter, który umożliwia jednocześnie wzbudzenie i emisję fluoroforów SpectrumOrange oraz DAPI (niebieski). Aby uzyskać więcej informacji na temat zestawów filtrów firmy Abbott Molecular, prosimy o kontakt z przedstawicielem firmy Abbott Molecular.

Przygotowanie roztworów roboczych

20X SSC

Aby przygotować roztwór, należy dodać:

66 g	20X SSC
200 mL	oczyszczonej wody
250 mL	końcowej objętości

Dokładnie wymieszać. Zmierzyć pH w temperaturze pokojowej za pomocą pehametru. W razie potrzeby doprowadzić pH do wartości 5,3 przy użyciu stężonego HCl. Doprowadzić do uzyskania końcowej objętości 250 mL. Przefiltrować przez filtr o wielkości porów wynoszącej 0,45 µm. Przechowywać w zamkniętym pojemniku w temperaturze pokojowej przez maksymalnie 6 miesięcy.

Roztwór denaturujący

Aby przygotować roztwór, należy dodać:

49 mL	formamidu
7 mL	20X SSC, pH 5,3
14 mL	oczyszczonej wody
70 mL	końcowej objętości

Dobrze wymieszać i przelać do kominka szklanego (Coplin). Zmierzyć pH w temperaturze pokojowej za pomocą pehametru. Sprawdzić, czy pH mieści się w zakresie 7,0 do 8,0. Przechowywać w zamkniętym pojemniku w temp. 2 do 8 °C. Roztwór używać nie dłużej niż 1 tydzień. Przed każdym użyciem sprawdzić pH roztworu.

Roztwory płuczące etanolu

Przygotować rozcieńczenia (v/v) 70%, 85% i 100% etanolu, stosując 100% etanol i oczyszczoną wodę. Przechowywać w temperaturze pokojowej w szczelnie zamkniętych pojemnikach. Roztwory można stosować nie dłużej niż 1 tydzień, chyba że doszło do wyparowania lub rozcieńczenia roztworu na skutek nadmiernego użycia.

Roztwór płuczący 0,4X SSC

Aby przygotować roztwór, należy dodać:

950 mL	oczyszczonej wody
20 mL	20X SSC, pH 5,3
1000 mL	końcowej objętości

Dokładnie wymieszać. Zmierzyć pH w temperaturze pokojowej za pomocą pehametru. W razie potrzeby doprowadzić pH do wartości 7,0 do 7,5. Uzupełnić wodą do uzyskania objętości 1 litra. Przefiltrować przez filtr o wielkości porów 0,45 µm. Nieużywany roztwór przechowywać w zamkniętym pojemniku w temperaturze pokojowej przez maksymalnie 6 miesięcy. Roztwór używany w badaniu wymieniać po każdym dniu pracy.

Roztwór płuczący 0,1% NP-40 w 2X SSC

Aby przygotować roztwór, należy dodać:

100 mL	20X SSC, pH 5,3
849 mL	oczyszczonej wody
1 mL	NP-40
1000 mL	końcowej objętości

Dokładnie wymieszać. Zmierzyć pH w temperaturze pokojowej za pomocą pehametru. Doprowadzić pH do wartości 7,0 do 7,5 przy użyciu 1N NaOH. Uzupełnić wodą do uzyskania objętości 1 litra. Przefiltrować przez filtr o wielkości porów 0,45 µm. Dodać 70 mL roztworu do kominka (Coplin) i utrzymać temperaturę pokojową. Nieużywany roztwór przechowywać w zamkniętym pojemniku w temperaturze pokojowej przez maksymalnie 6 miesięcy. Roztwór używany w badaniu wymieniać po każdym dniu pracy.

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

IVD | Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*

1. Do diagnostyki *in vitro*
2. Wszelkie materiały pochodzenia biologicznego powinny być traktowane jako czynniki potencjalnie zakaźne. Szkiełka kontrolne zawarte w zestawie zostały wytworzone z kultur ludzkich komórek limfoblastycznych utrwalonych w roztworze metanolu: kwasu octowego (3:1, v:v). Jako że często nie jest możliwe stwierdzenie zakaźności, podczas pracy z wszystkimi próbkami pochodzenia ludzkiego i szkiełkami kontrolnymi należy przestrzegać uniwersalnych środków ostrożności. Wytyczne dotyczące obchodzenia się z próbkami można uzyskać w Amerykańskim Centrum Zwalczania i Zapobiegania Chorób (U.S. Centers for Disease Control and Prevention).¹¹
3. Użycie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę Abbott Molecular może mieć niekorzystny wpływ na warunki hybrydyzacji.
4. Nieprzestrzeganie wszystkich procedur denaturacji preparatów i hybrydyzacji może skutkować uzyskaniem nieakceptowalnych lub błędnych wyników.
5. Fluorofory szybko ulegają fotobłaknięciu pod wpływem światła. Ograniczenie dostępu światła do wszystkich roztworów zawierających fluorofory zmniejsza tę degradację. Dotyczy to wszystkich kroków, w trakcie których opracowuje się hybrydizowany preparat. Wszystkie etapy procedury, do przeprowadzenia których nie jest wymagane światło (inkubacje, płukania itd.), należy przeprowadzać bez dostępu światła.
6. Sonda DNA CEP 8 zawiera formamid, który jest substancją teratogenną. Unikać zanieczyszczenia skóry i błon śluzowych. Dalsze informacje, patrz karta charakterystyki substancji niebezpiecznej.
7. Do pomiaru temperatury roztworów, temperatury w łaźniach wodnych i inkubatorach należy używać skalibrowanych termometrów.
8. Wszystkie niebezpieczne materiały należy utylizować zgodnie z zasadami utylizacji materiałów niebezpiecznych, obowiązującymi w danej placówce.

CEP 8 SpectrumOrange DNA Probe



UWAGA: Preparat ten zawiera materiały pochodzenia ludzkiego i/lub potencjalnie zakaźne składniki. Nie istnieje żadna znana metoda badawcza, która mogłaby w pełni zagwarantować, że produkty pochodzenia ludzkiego lub inaktywowane mikroorganizmy nie będą źródłem zakażenia. Z tymi odczynnikami oraz próbkami pochodzenia ludzkiego należy obchodzić się jak z materiałem zakaźnym, przestrzegając procedur laboratoryjnych dotyczących bezpieczeństwa, jak np. procedur opisanych w publikacji „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories”,¹⁸ standardach OSHA dotyczących patogenów przenoszonych drogą krwi (Standards on Bloodborne Pathogens),¹⁹ w dokumencie CLSI M29-A3²⁰ oraz innych odpowiednich praktyk związanych z bezpieczeństwem biologicznym.²¹ A zatem wszystkie materiały pochodzenia ludzkiego należy traktować jako zakaźne.

Do środków ostrożności należą między innymi następujące wskazania:

- Podczas pracy z badanymi próbkami lub odczynnikami nosić rękawice ochronne.
- Nie pipetować ustami.
- W miejscach, w których opracowuje się tego typu materiały, nie spożywać pokarmów, nie spożywać napojów, nie palić, nie nakładać kosmetyków ani szkieł kontaktowych.
- Wszelkie miejsca, w których doszło do rozlania się badanych próbek, wyczyścić i zdezynfekować przy pomocy prątkobójczego środka dezynfekującego, takiego jak 1,0% podchloryn sodu, lub innego odpowiedniego środka o podobnym działaniu.¹⁸
- Wszystkie potencjalnie zakaźne materiały odkazić, a następnie usuwać zgodnie z lokalnymi, jak i ogólnokrajowymi przepisami.²¹



Niebezpieczeństwo

Składniki warunkujące stopień zagrożenia umieszczone na etykiecie: formamid

- H360 Może działać szkodliwie na płodność lub na dziecko w tonie matki.
- P201 Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
- P202 Nie używać przed zapoznaniem się i zrozumieniem wszystkich środków bezpieczeństwa.
- P281 Stosować wymagane środki ochrony indywidualnej.
- P308+P313 W PRZYPADKU narażenia lub styczności: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
- P405 Przechowywać pod zamknięciem.
- P501 Usuwać produkt i jego opakowanie w bezpieczny sposób.

NP-40



Niebezpieczeństwo

Składniki warunkujące stopień zagrożenia umieszczone na etykiecie: eter oktylofenolu z glikolem polietylenowym

- H302 Działa szkodliwie po połknięciu.
- H318 Powoduje poważne uszkodzenie oczu.
- H412 Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.
- P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu.
- P264 Dokładnie umyć ręce po użyciu.
- P273 Unikać uwolnienia do środowiska.
- P305+P351+P338 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
- P501 Usuwać produkt i jego opakowanie w bezpieczny sposób.

Karty charakterystyki substancji niebezpiecznych dla wszystkich odczynników zawartych w zestawie są dostępne na życzenie u przedstawiciela firmy Abbott Molecular.

POBIERANIE, OBRÓBKĄ, PRZECHOWYWANIE PRÓBEK I PRZYGOTOWYWANIE PREPARATÓW

Pobieranie próbek i ich obróbka

Szpik kostny powinien być pobierany zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danej placówce. Zalecenia dotyczące pobierania i hodowli próbek znajdują się w instrukcji „ACT Cytogenetics Laboratory Manual”. ACT zaleca pobieranie szpiku kostnego na podłożu transportowym powlekany heparyną sodową lub do próbek typu Vacutainer zawierających heparynę sodową. Zgodnie z instrukcją ACT dopuszcza się stosowanie obydwu pojemników.²

Instrukcja ACT zaleca, aby po przetransportowaniu próbek do pracowni cytogenetyki niezwłocznie rozpocząć przygotowanie bezpośrednich rozmazów lub hodowli szpiku kostnego. Instrukcja ACT zawiera szereg zaleceń dotyczących hodowli, rozmazów bezpośrednich i zakończenia hodowli. Po zakończeniu hodowli próbki szpiku kostnego mogą być bezpośrednio użyte do przygotowania preparatów lub przechowywane w utrwalczu w temp. –20 °C.²

Próbki żółtaczkowe lub hemolizowane mogą uniemożliwiać prawidłową hodowlę konieczną do przeprowadzenia klasycznego badania cytogenetycznego. Probki należy chronić przed działaniem kwasów, silnych zasad oraz wysokich temperatur. Czynniki te powodują uszkodzenie DNA oraz mogą doprowadzić do uzyskania błędnych wyników testu FISH.

Przygotowania preparatu z utrwalonego osadu komórkowego

W celu przygotowania preparatów z wyhodowanych próbek można stosować następującą metodę.

1. Umieścić łaźnię wodną oraz nawilżacz w urządzeniu z obudową zabezpieczającą przed utratą wilgotności z dostępem umieszczonym z przodu. Zamknąć otwór urządzenia, luźno przykrywając go folią, lecz nie blokując całkowicie dostępu do wnętrza. Jeśli pokojowy wilgotnościomierz pokazuje poziom wilgotności poniżej 45%, użyć nawilżacza.

2. Podgrzać łaźnię wodną do temp. $67 \pm 2^\circ\text{C}$. Umieścić statyw na probówce w środku łaźni wodnej tak, aby nie dotykały jej ścianek. Przez cały czas trwania procedury poziom wody w łaźni powinien dochodzić do górnej powierzchni statywu na probówce.
3. Przygotować osad komórkowy, stosując utrwalcacz w taki sposób, aby zawiesina była lekko mętna.
4. Oczyszczyć szkielko mikroskopowe, przemywając obie powierzchnie szkiełka 70% etanolem (używać tryskawki). Wyrzeć szkielko do sucha przy pomocy ściereczki laboratoryjnej wzdłuż całej jego długości, zaczynając od oznakowanego końca. Podpisać szkielko przy użyciu ołówka.
5. Zanurzyć odtłuszczone szkielko w kominku (Coplin) zawierającym utrwalcacz. Przechylić szkielko, aby równomiernie rozprowadzić utrwalcacz na górnej powierzchni szkiełka.
6. Niezwłocznie przenieść szkielko nad łaźnię wodną. Trzymając pipetę Pasteura 5 do 10 cm nad szkiełkiem, nanieść 3 do 4 kropli zawiesiny komórek wzdłuż całej długości szkiełka.
7. Włożyć szkielko do łaźni wodnej i położyć na statywie na probówce tak, aby powierzchnia z materiałem badanym była zwrócona do góry. Pozostawić szkielko do wyschnięcia na 10 minut.
8. Zdjąć szkielko ze statywu na probówce i obejrzeć preparat pod mikroskopem fazowo-kontrastowym. Ocenić liczbę komórek interfazowych w każdym polu widzenia, stosując małe powiększenie (obiektyw powiększający 10-krotnie). W celu uzyskania optymalnych wyników badań w jednym polu widzenia powinno znajdować się co najmniej 100 komórek. W celu uzyskania zalecanej liczby jąder interfazowych doprowadzić gęstość preparatu do zalecanej, stosując świeży utrwalcacz.
9. Delikatnie obrysować obszar zawierający jądra interfazowe na spodzie szkiełka przy pomocy rysika z diamentową końcówką. Ze względu na fakt, iż do utworzenia obszaru hybrydyzacyjnego stosuje się szkielko nakrywkowe (22 mm x 22 mm), obszar ten nie powinien być większy niż powierzchnia szkiełka nakrywkowego. Na jednym szkiełku można użyć maksymalnie 2 szkiełek nakrywkowych.
10. Umieścić preparaty w kasetce na szkiełka.
11. Przed rozpoczęciem hybrydyzacji lub przechowywania pozwolić dojrzeć preparatom w temperaturze pokojowej przez 24 godziny w otwartej kasetce.

Przechowywanie preparatów

Umieścić przygotowane szkiełka w zamykanej kasetce na szkiełka. Kasetkę szczelnie zamknąć w torebce plastikowej napełnionej azotem w postaci gazu i zawierającej około 1 łyżeczkę desykantu Drierite. Przed rozpoczęciem hybrydyzacji przechowywać w temp. -20°C .

PROCEDURA BADANIA: SKRÓT PROCEDURY FISH

Denaturacja DNA próbek:

1. Przed przygotowaniem szkiełek podgrzać komorę hybrydyzacyjną (hermetyczny pojemnik) do temp. 42°C , umieszczając ją w inkubatorze o temp. 42°C .
2. Dodać roztwór denaturujący do kominka (Coplin) i umieścić go w łaźni wodnej o temp. $73 \pm 1^\circ\text{C}$ na co najmniej 30 minut. Przed użyciem sprawdzić temperaturę roztworu.
3. Zdenaturować DNA próbki, zanurzając przygotowane preparaty w roztworze denaturującym o temp. $73 \pm 1^\circ\text{C}$ na 5 minut. W jednym kominku (Coplin) nie denaturować jednocześnie więcej niż 4 preparatów. Przed każdym użyciem sprawdzić, czy pH roztworu denaturującego wynosi 7,0 do 8,0.
4. Pęsetą usunąć preparat(y) z roztworu denaturującego i natychmiast umieścić go(je) w roztworze płuczącym w postaci 70% etanolu w temperaturze pokojowej na 1 minutę. Potrząsnąć szkiełkiem w celu usunięcia formamidu. Preparat(y) pozostawić w etanolu przez 1 minutę.
5. Usunąć preparat(y) z 70% roztworu etanolu. Powtórzyć krok 4., używając 85%, a następnie 100% etanolu.
6. Odsączyć nadmiar etanolu z preparatu, opierając dolną krawędź preparatu na bibule, a następnie wycierając do sucha spodnią część szkiełka przy pomocy ściereczki laboratoryjnej.
7. Przed naniesieniem roztworu sondy umieścić preparat(y) na płycie grzejnej o temp. 45 do 50°C na maksymalnie 2 minuty.

UWAGA: Jeśli po hybrydyzacji preparat jest gotowy przez ponad 2 minuty, zanim gotowa jest sonda, powinien on pozostać w naczyniu zawierającym 100% etanol. Nie osuszać preparatu na powietrzu przed umieszczeniem go na płycie grzejnej.

Przygotowanie sondy

1. Pozostawić sondę do osiągnięcia temperatury pokojowej, zmniejszając w ten sposób jej lepkość i umożliwiając jej dokładne odpipetowanie.

2. Wymieszać na wytrząsarce typu worteks. Każdą probówkę krótko odwirować (1 do 3 sekund) w mikrowirówce, aby zawartość osiadła na dnie probówki. Ponownie delikatnie wymieszać na wytrząsarce typu worteks.

UWAGA: Sonda jest poddana wstępnej denaturacji i jest gotowa do naniesienia na zdenaturowany obszar docelowy szkiełka.

Hybrydyzacja

1. Nanieść 10 μL alikwotu roztworu sondy na obszar docelowy preparatu. Natychmiast przykryć roztwór sondy szkiełkiem nakrywkowym o wymiarach 22 mm x 22 mm, umożliwiając jego równomiernie rozprzestrzenienie się pod szkiełkiem. Unikać powstawania pęcherzyków powietrza, gdyż mogą one niekorzystnie wpłynąć na hybrydyzację.

UWAGA: Nie nanosić roztworu sondy na kilka obszarów docelowych, zanim każdy z nich nie zostanie przykryty szkiełkiem nakrywkowym.

2. Umieścić szkielko w komorze hybrydyzacyjnej podgrzanej do temp. 42°C i szczelnie zamknąć pokrywę komory.
3. Wstawić komorę z preparatem do inkubatora o temp. 42°C i poddać hybrydyzacji przez co najmniej 30 minut.

UWAGA: W przypadku niektórych próbek może być wymagany dłuższy czas hybrydyzacji w celu uzyskania wystarczająco intensywnego sygnału. Inkubację można przeprowadzać przez całą noc (16 godzin). W przypadku inkubacji trwających ponad 1 godzinę należy uszczelnić szkiełka nakrywkowe przy użyciu usuwalnego szczeliwa, jak np. klej kauczukowy, a komora hybrydyzacyjna musi być nawilżona. Procedurę tę opisano poniżej.

- Pobrać klej do strzykawki o poj. 5 mL. Uszczelnić szkiełko nakrywkowe, nanosząc niewielką ilość kleju wokół brzegów szkiełka nakrywkowego, tak aby zachodziło ono zarówno na szkielko, jak i preparat, tworząc szczelną warstwę naokoło szkiełka.
- Umieścić preparat w hybrydyzacyjnej komorze wilgotnościowej (hermetyczny pojemnik z kawałkiem wilgotnej bibuły lub ręcznikiem papierowym o wymiarach 2,5 cm x 7,5 cm przyklejonym do ścianki pojemnika).
- Szczelnie zamknąć pokrywę komory i inkubować przez 1 do 16 godzin, zgodnie z potrzebami.
- Po zakończeniu inkubacji usunąć klej ze szkiełka nakrywkowego poprzez pociągnięcie warstwy kleju do góry.

Płukania po zakończeniu hybrydyzacji

1. Dodać 0,4X SSC (pH 7,0 do 7,5) do kominka (Coplin). Podgrzać roztwór 0,4X SSC, umieszczając kominek (Coplin) w łaźni wodnej o temp. $73 \pm 1^\circ\text{C}$ na co najmniej 30 minut lub do czasu, aż roztwór osiągnie temp. $73 \pm 1^\circ\text{C}$.

UWAGA: W celu utrzymania właściwego zakresu temperatur NALEŻY jednorazowo umieścić 4 szkiełka w podgrzanym roztworze płuczącym. Jeśli hybrydyzacji poddawanych jest mniej niż 4 preparaty, można stosować uzupełniając szkiełka mikroskopowe o temperaturze pokojowej (bez nałożonej próbki) tak, aby łączna liczba szkiełek wynosiła 4. Jeśli hybrydyzacji poddawanych jest więcej niż 4 preparaty, należy je płukać w więcej niż jednej serii. Przed wykonaniem kolejnego płukania roztwór płuczący musi ponownie osiągnąć temp. $73 \pm 1^\circ\text{C}$.

2. Zdjąć szkielko nakrywkowe z obszaru docelowego pierwszego szkiełka i natychmiast przełożyć szkielko do kominka (Coplin) zawierającego 0,4X SSC o temp. $73 \pm 1^\circ\text{C}$. Poruszać preparatem przez 1 do 3 sekund. Powtórzyć ten krok z pozostałymi 3 szkiełkami i inkubować przez 2 minuty w temp. $73 \pm 1^\circ\text{C}$.

UWAGA: Nie usuwać szkiełek nakrywkowych z kilku preparatów jednocześnie przed umieszczeniem któregośkolwiek z nich w łaźni wodnej. Rozpocząć odmierzenie czasu dla 2-minutowej inkubacji od momentu włożenia do łaźni wodnej ostatniego szkiełka.

3. Przełożyć każde szkielko z łaźni wodnej do kominka zawierającego 2X SSC/0,1% NP-40 o temperaturze pokojowej i pozostawić na 5 do 60 sekund, a po włożeniu do łaźni kolejnych szkiełek wstrząsać nimi przez 1 do 3 sekund.
4. Preparaty pozostawić do wyschnięcia na powietrzu, w ciemnym miejscu (wystarczy zamknięta szuflada lub półka w zamykanej szafce.)
5. Nanieść 10 μL barwnika kontrastowego DAPI II na obszar docelowy preparatu i przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Preparat(y) przechowywać w ciemnym miejscu do czasu rozpoczęcia liczenia sygnałów.

Przechowywanie

Preparaty (ze szkiełkami nakrywkowymi) poddane hybrydyzacji przechowywać w temp. – 20°C w ciemności. W tych warunkach preparaty mogą być przechowywane przez maksymalnie 12 miesięcy bez znaczącej utraty intensywności fluorescencji sygnałów. W celu dłuższego przechowywania szkiełka nakrywkowe należy uszczelnić, aby zapobiec wysychaniu preparatu, a następnie preparaty przechowywać w temp. – 20°C.

Liczenie sygnałów

Ocena adekwatności preparatu

Ocenę adekwatności preparatu przeprowadza się na podstawie następujących kryteriów:

- Intensywność sygnału sondy: Sygnał powinien być jasny, wyraźny i łatwy do oceny. Sygnały mogą być jasne, zwarte i owalne lub też włókniaste, rozlane i owalne.
- Tło: Tło powinno być ciemne lub czarne i pozbawione cząstek fluorescencyjnych czy zamglenia.
- Hybrydyzacja krzyżowa/swistość sekwencji docelowej: Sonda powinna hybrydyzować i świecić wyłącznie na obszarze docelowym (centromer chromosomu 8). W celu zidentyfikowania jakiegokolwiek hybrydyzacji krzyżowej do sekwencji niedocelowych powinno ocenić się płytki metafazowe. Jeżeli hybrydyzacja została przeprowadzona poprawnie, co najmniej 98% komórek powinno wykazywać 1 lub więcej sygnałów (patrz wytyczne dotyczące liczenia sygnałów poniżej).

Jeśli którykolwiek z powyższych warunków nie jest spełniony, należy poznać się z **Tabelą 3.**, opisującą wykrywanie i usuwanie problemów, i powtórzyć procedurę na świeżych preparatach.

Wybór optymalnego obszaru oględzin i jąder nadających się do oceny

Do oglądania obszaru hybrydyzacji oraz badania rozkładu próbek należy stosować obiektyw powiększający 10- do 25-krotnie. Wybrać obszar, na którym próbka jest rozmieszczona niezbyt gęsto, jądra interfazowe lub płytki metafazowe rzadko na siebie nachodzą i w obrębie jednego pola widzenia można obejrzeć kilka jąder interfazowych lub płytek metafazowych. Omijać obszary, na których komórki są zbite, nachodzą na siebie lub nie można zidentyfikować granic poszczególnych jąder. Omijać obszary, gdzie komórki występują w grupach. Zliczać wyłącznie te komórki, które dają sygnały dyskretne.

Skanowanie

Za pomocą obiektywu powiększającego 40- lub 63-krotnie rozpocząć analizę w lewym górnym kwadrancie wybranego obszaru i, przesuwając się z lewej strony do prawej, liczyć ilość sygnałów w każdej płytce metafazowej lub na obszarze jądra w każdej badanej komórce interfazowej. Obszary na szkiełku o dużej gęstości komórek należy losowo pomijać w celu zeskanowania całego obszaru docelowego. Kontynuować skanowanie do momentu zliczenia 500 jąder interfazowych oraz zliczenia i przebadania co najmniej 20 płytek metafazowych. Jeśli po zliczeniu 200 jąder ponad 2% z nich nie wykazuje sygnału hybrydyzacyjnego, oznacza to, że dla danego preparatu hybrydyzacja nie powiodła się, a uzyskanych wyników nie należy raportować.

Liczenie sygnałów jąder interfazowych

Za pomocą obiektywu powiększającego 40- lub 63-krotnie liczyć sygnały fluorescencyjne w każdym badanym jądrze interfazowym o odpowiedniej jakości. Postępować zgodnie z wytycznymi dotyczącymi liczenia sygnałów zamieszczonymi na **Rycinie**. W celu zweryfikowania lub przeprowadzenia dokładniejszej analizy sygnałów rozszczepionych lub rozmytych należy stosować obiektywy o większym powiększeniu (np. 63- lub 100-krotnie).

- Dwa sygnały podobnej wielkości, leżące w bliskim sąsiedztwie, ale niepołączone widoczną linią, liczy się jako 2 sygnały.
- Rozmyty sygnał liczyć jako 1 sygnał, jeśli rozmycie sygnału jest spójne i mieści się w akceptowalnych granicach.
- Dwa małe sygnały połączone widoczną linią liczyć jako 1 sygnał.
- Liczyć jądra, dla których uzyskano 0, 1, 2, 3, 4 lub > 4 sygnały. Liczyć jądra, dla których uzyskano zero sygnałów wyłącznie w przypadku, gdy istnieją inne jądra, dla których widoczny jest co najmniej 1 sygnał w polu widzenia. Jeśli istnieją wątpliwości co do dokładności liczenia, należy powtórzyć procedurę liczenia na innym obszarze szkiełka.
- Nie liczyć jąder z niepewnymi sygnałami.

Liczenie metafaz

- Płytki metafazowe powinny posiadać chromosomy, które są od siebie dobrze oddzielone, lecz bez wątpliwości pochodzą z tej samej komórki. Do liczenia i analizy chromosomów wybrać dobrej jakości kompletne płytki metafazowe z dobrze określonymi, niezachodzącymi na siebie chromosomami.

- Sygnał sondy DNA CEP 8 będzie widoczny jako wyraźny sygnał fluorescencyjny zlokalizowany blisko regionu centromerowego chromosomu 8. Sygnał sondy CEP może sprawiać wrażenie rozszczepionego (2 mniejsze sygnały położone blisko siebie), jeśli chromatydy są rozdzielone. Rozdzielenie chromatyd występuje w przypadku, gdy komórka znajduje się w późniejszych fazach mitozy (pomiędzy metafazą a anafazą). Rozdzielony sygnał wykryty na każdej z 2 chromatyd należy liczyć jako 1 sygnał. Postępować zgodnie z ogólnymi wytycznymi dotyczącymi powiększania i skanowania w rozdziale „**Liczenie sygnałów jąder interfazowych**”.

Rycina. Wzory obrazów i wytyczne dotyczące liczenia sygnałów interfazowych



Kontrola jakości

Zastosowanie szkiełek kontrolnych

Szkiełka z kontrolą dodatnią (niski poziom trisomii 8) oraz kontrolą ujemną (około 0% trisomii 8) należy oznaczać równolegle z preparatami z badanym materiałem w celu monitorowania jakości działania testu oraz oszacowania dokładności liczenia sygnałów. Kontrole należy oznaczać każdego dnia badania FISH oraz przy rozpoczęciu pracy z każdą nową partią zestawu sond. Opakowania kontroli ProbeChek wchodzą w skład zestawu, ale są też dostępne osobno; osobne opakowania zawierają 5 szkiełek z kontrolą dodatnią (niski poziom trisomii 8, nr produktu: 30-805002) lub 5 szkiełek z kontrolą ujemną (brak trisomii, nr produktu: 30-805000). Dopuszczalny zakres dla jąder z trzema sygnałami (%) podano w arkuszu ze specyfikacjami dołączonym do tych szkiełek. Adekwatność preparatów oraz dokładność liczenia sygnałów należy ocenić na podstawie kryteriów opisanych powyżej w rozdziale dotyczącym liczenia sygnałów. Kryteria dotyczące adekwatności szkiełek muszą być spełnione, zaś wyniki liczenia sygnałów powinny być zgodne ze specyfikacjami podanymi w arkuszach dołączonych do szkiełek kontrolnych w celu uzyskania możliwych do zaakceptowania wyników badania.

Jeśli szkiełka kontrolne nie spełniają kryteriów akceptowalności, prawdopodobnie test został nieprawidłowo przeprowadzony lub też działanie składnika(ów) zestawu CEP 8 SpectrumOrange DNA Probe Kit nie było satysfakcjonujące. Konieczne może być ponowne przeprowadzenie analizy z użyciem nowych szkiełek kontrolnych i preparatu(ów) z materiałem pobranym od pacjenta. Należy zapoznać się z treścią **Tabeli 3.**, opisującą wykrywanie i usuwanie problemów, aby uzyskać informacje na temat prawdopodobnych przyczyn i działań naprawczych.

Jeśli szkiełka kontrolne spełniają kryteria akceptowalności, ale uzyskane wartości zliczeń nie mieszczą się w ustalonym zakresie, prawdopodobnie liczenie sygnałów nie zostało przeprowadzone poprawnie. W takim przypadku należy wykonać niezależną, powtórzoną ocenę tego samego preparatu.

W żadnym wypadku nie należy raportować wyników rutynowej analizy FISH, jeśli oznaczenie kontroli testu nie powiedzie się. W przypadku próbek klinicznych, kiedy interpretacja sygnału hybrydyzacji jest utrudniona i nie ma wystarczającej ilości próbki do ponownego oznaczenia, test taki będzie miał charakter nieinformatywny. Jeśli ilość komórek do analizy jest niewystarczająca, test należy uznać za nieinformatywny.

Tabela 3. Wykrywanie i usuwanie problemów

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie
• Brak sygnału lub słabe sygnały	• Do przeglądania preparatów użyto nieodpowiedniego zestawu filtrów.	• Zastosować odpowiednie filtry.
	• Mikroskop nie działa prawidłowo.	• Skontaktować się z inżynierem serwisowym producenta mikroskopu.
	• Nieodpowiednie lampy (tj. ksenonowe lub wolframowe)	• Użyć lampy rtęciowej (zalecana 100-watowa).
	• Przestarzała lampa rtęciowa	• Wymienić lampę na nową.
	• Rozregulowana lampa rtęciowa	• Wyregulować lampę.
	• Zabrudzone i/lub porysowane soczewki kolektora	• Przeczyścić oraz wymienić soczewkę.
	• Zabrudzone lub pęknięte lustro w obudowie lampy	• Przeczyścić lub wymienić lustro.
	• Niewłaściwe obiektywy	• Zastosować zalecane obiektywy.
	• Sondy nieprawidłowo zdenaturowane	• Sprawdzić, czy temperatura łaźni wodnej wynosi $73 \pm 1^\circ\text{C}$.
	• Nieprawidłowe warunki hybrydyzacji	• Sprawdzić, czy temperatura inkubatora wynosi 42°C . • Wydłużyć czas hybrydyzacji do 1 godziny.
	• Nieodpowiednie warunki płukania	• Sprawdzić, czy temperatura łaźni wodnej wynosi $73 \pm 1^\circ\text{C}$. • Sprawdzić właściwości roztworów w łaźni wodnej (np. pH).
	• Pęcherzyki powietrza uwięzione pod szkiełkiem nakrywkowym, uniemożliwiające dostęp sondy	• Nałożyć szkiełko nakrywkowe, dotykając najpierw powierzchni mieszaniny hybrydyzacyjnej.
	• Nieprawidłowo przechowywane sondy	• Przechowywać sondy w temp. -20°C bez dostępu światła.
	• Niska swoistość sygnałów	• Sprawdzić, czy temperatura inkubatora wynosi 42°C . • Utrzymywać temperaturę płukania na poziomie $73 \pm 1^\circ\text{C}$.
	• Nieprawidłowe warunki hybrydyzacji	
	• Zbyt niska temperatura płukania	

Tabela 3. Wykrywanie i usuwanie problemów (c.d)

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie
• Silne tło preparatu	• Płytki metafazowe dojrzewały przez prażenie lub zawierają dużą ilość cytoplazmy.	• Wydłużyć czas denaturacji preparatów do 10 minut.
	• Resztki komórek na preparacie	• Pięciokrotnie przemyć zawieszoną komórek świeżym utrwalcaczem i powtórzyć procedurę „Przygotowania preparatów”.
	• Zanieczyszczone DNA próbki	• Zastąpić płukanie po hybrydyzacji w 0,4X SSC płukaniem w formamidzie w następujący sposób: 1. płukać każde szkiełko(a) 3 razy przez 10 minut w 50% roztworze formamidu/2X SSC o pH 7,5 do 8,0 w temp. $46 \pm 1^\circ\text{C}$. 2. płukać szkiełko(a) 1 raz przez 10 minut w 2X SSC w temp. $46 \pm 1^\circ\text{C}$. 3. płukać szkiełko(a) 1 raz przez 5 minut w 2X SSC/0,1% NP-40 w temp. $46 \pm 1^\circ\text{C}$.
	• Zastosowano filtry górnoprzepustowe, które przepuszczają dużą ilość światła.	• Zamienić na filtry o mniejszej szerokości pasma lub filtry wielopasmowe.
	• Płukania przeprowadzono w nieodpowiedniej temperaturze lub nieprawidłowo sporządzono roztwory.	• Sprawdzić temperaturę łaźni, pH roztworów i/lub poprawność ich przygotowania.
	• Szkiełka nieprawidłowo odtuszczone przed naniesieniem komórek docelowych	• Zanurzyć szkiełka w roztworze etanolu i wytrzeć ściereczką laboratoryjną przed naniesieniem zawiesziny komórek.
	• Zaburzona morfologia chromosomów	• Zwiększyć względną wilgotność podczas przygotowywania preparatów. • Zwiększyć temperaturę łaźni wodnej podczas przygotowywania preparatów.
	• Denaturacji poddano zbyt świeży materiał.	• Wydłużyć czas suszenia szkiełek z naniesionym materiałem. • Pozwolić dojrzeć preparatom, pozostawiając je na co najmniej 24 godziny w temperaturze pokojowej przed rozpoczęciem denaturacji.
	• Preparaty nie zostały całkowicie wysuszone przed denaturacją.	• Podgrzewać preparaty w temp. 45°C przez 10 do 15 minut przed denaturacją.
	• Zbyt wysoka temperatura w roztworze denaturującym	• Sprawdzić temperaturę łaźni wodnej.
• Zbyt jaskrawy sygnał	• Zbyt wysokie stężenie sondy dla stosowanego mikroskopu	• Spróbować zablokować część sygnału poprzez umieszczenie na ścieżce wzbudzenia filtra o neutralnej gęstości.

INTERPRETACJA WYNIKÓW TESTU

Wyniki zliczania 500 jąder interfazowych podawane są w postaci liczby oraz odsetka jąder z 1, 2, 3, 4 oraz >4 sygnałami. Próbkę kliniczną zawierającą >2,2% jąder trójsygnałowych uważane są za posiadające nieprawidłowy klon komórkowy z trisomią 8; próbki zawierające ≤2,2% jąder trójsygnałowych uważane są za prawidłowe, choć nie można w pełni wykluczyć obecności trisomii 8. W przypadku, gdy odsetek trójsygnałowych jąder interfazowych jest zbliżony do wartości punktu odcięcia (2,0 do 2,5%), wyniki należy interpretować z zachowaniem ostrożności.

Wyniki zliczania 20 do 30 płytek metafazowych podawane są w postaci liczby oraz odsetka metafaz z 1, 2, 3, 4 oraz >4 sygnałami. Interpretacja wyników podlega tym samym zasadom, jak w klasycznym badaniu cytogenetycznym. Zgodnie z nimi próbka nie wykazuje obecności trisomii 8, jeśli w 20 metafazach nie znaleziono metafaz trójsygnałowych, zaś w przypadku, gdy w 20 do 30 metafazach znaleziono ≥2 metafazy trójsygnałowe, próbka jest dodatnia pod względem obecności trisomii 8. Jeśli w 20 metafazach znaleziono 1 metafazę trójsygnałową, należy kontynuować liczenie dla kolejnych 10 metafaz. Jeśli w 30 metafazach znaleziono 1 z trisomią 8, próbkę uważa się za niejednoznaczną.

W przypadku, gdy wyniki klasycznego badania cytogenetycznego oraz badania FISH nie są zgodne z objawami klinicznymi, należy dokładnie zbadać przyczynę niezgodności. Przyczyną niezgodności w wynikach uzyskanych drogą różnych metod badań może być niedokładność wyników 1 lub kilku metod badań, różnice w czułości/swoistości analitycznej pomiędzy metodami, rzeczywiste różnice w statusie chromosomu 8 w różnych populacjach komórek badanych z użyciem różnych metod (np. cykliczne procesy komórek metafazowych względem niecyklicznych procesów komórek interfazowych), itp. W przypadku, gdy wyniki uzyskane przy użyciu 1 lub więcej metod testowych są niejednoznaczne lub gdy odsetek trójsygnałowych jąder interfazowych jest zbliżony do wartości punktu odcięcia (2,0 do 2,5%), należy zachować ostrożność podczas interpretacji wyników i uwzględnić ewentualną konieczność dalszej oceny badanych próbek. Powtórne badanie FISH (przeprowadzone równolegle z materiałem kontroli jakości) i/lub powtórne klasyczne badanie cytogenetyczne z użyciem pozostałego materiału badanego może być pomocne przy ocenie prawdopodobieństwa uzyskania błędnych wyników. Jeśli przyczyna niezgodności pomiędzy wynikami badań nie zostanie ustalona lub wyniki testu nie są spójne z objawami klinicznymi, niezbędna jest konsultacja cytogenetyka i lekarza prowadzącego leczenie.

OGRANICZENIA

1. Zestaw sond CEP 8 SpectrumOrange DNA Probe Kit został scharakteryzowany wyłącznie w odniesieniu do identyfikacji chromosomów w preparatach zawierających jądra komórkowe lub płytkach metafazowych pochodzących z próbek szpiku kostnego.
2. Interpretacja kliniczna wyników testów powinna być przeprowadzona wraz z klasycznym badaniem cytogenetycznym oraz powinna zostać poddana ocenie w kontekście historii choroby pacjenta oraz wyników innych laboratoryjnych badań diagnostycznych.
3. Próbkę kliniczną zawierającą >2,2% jąder trójsygnałowych uważane są za posiadające nieprawidłowy klon komórek z trisomią 8; próbki zawierające ≤2,2% jąder trójsygnałowych powinny być uważane za prawidłowe, choć nie można całkowicie wykluczyć obecności trisomii 8.
4. Zestaw sond CEP 8 SpectrumOrange DNA Probe Kit nie jest przeznaczony do badania materiału pochodzącego z długotrwałych hodowli komórek, jak amniocyty, fibroblasty czy komórki nowotworowe.
5. Wyniki uzyskane za pomocą metody FISH mogą mieć charakter nieinformatywny w przypadku nieodpowiedniej jakości badanego materiału i/lub nieodpowiedniego przygotowania preparatu z badanym materiałem.
6. W przypadku wystąpienia znaczącego zanieczyszczenia próbek pobranych ze szpiku kostnego krwią obwodową, krew może rozcieńczać badaną próbkę. Ważne jest, aby uwzględnić potencjalny wpływ tego rozcieńczenia na wyniki analizy FISH.
7. Możliwe są przypadki występowania u pacjentów polimorfizmu chromosomów, które mogą hybrydyzować do sondy CEP 8. Analiza FISH jąder komórkowych w stadium metafazy powinna być przeprowadzona jako uzupełnienie analizy FISH jąder interfazowych. W badaniach klinicznych nie przebadano zjawiska polimorfizmu.
8. Test ten nie wykrywa obecności innych nieprawidłowości chromosomowych, często towarzyszących zaburzeniom hematologicznym.

9. Nie wykazano skuteczności tego badania w monitorowaniu trisomii 8 lub progresji choroby.

WARTOŚCI OCZEKIWANE

Zliczanie sygnałów jąder interfazowych metodą FISH przeprowadzono z użyciem próbek szpiku kostnego pobranych od osób zdrowych oraz osób wykazujących obecność komórek z trisomią 8 w celu oceny oczekiwanego odsetka komórek, dla których uzyskano 0, 1, 2, 3 oraz ≥4 sygnały dla obu tych kategorii pacjentów oraz wyznaczenia wartości odcięcia, definiującej obecność lub brak trisomii 8. W każdej badanej próbce liczono odsetek komórek, dla których uzyskano 0, 1, 2, 3 oraz ≥4 sygnały.

Wartości w grupie prawidłowych próbek szpiku kostnego

Analizę FISH jąder interfazowych przeprowadzono początkowo z użyciem próbek szpiku kostnego pobranych od 35 osób zdrowych. Rozkład sygnałów dla tej grupy badanej przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Procentowy rozkład ilości komórek, dla których uzyskano sygnał sondy CEP 8, w 35 prawidłowych próbkach szpiku kostnego

	Odsetek komórek, dla których uzyskano				
	0 sygnałów	1 sygnał	2 sygnały	3 sygnały	≥4 sygnały
Wartość średnia	0,22	2,23	96,7	0,71	0,18
SD	0,20	0,91	0,88	0,52	0,13

Ponadto przeprowadzono kluczowe badanie z użyciem 60 próbek szpiku kostnego uznanych za prawidłowe w badaniu cytogenetycznym, pobranych w 3 ośrodkach, w celu potwierdzenia wartości oczekiwanych oraz wyznaczenia wartości odcięcia testu. Rozkład sygnałów dla tych 60 próbek przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Procentowy rozkład ilości komórek, dla których uzyskano sygnał sondy CEP 8, w 60 prawidłowych próbkach szpiku kostnego

	Odsetek komórek, dla których uzyskano				
	0 sygnałów	1 sygnał	2 sygnały	3 sygnały	≥4 sygnały
Wartość średnia	0,11	2,67	96,7	0,41	0,14
SD	0,21	1,95	2,05	0,24	0,20

W próbkach szpiku kostnego potwierdzonych jako prawidłowe w badaniu cytogenetycznym odsetek komórek dwu- i trójsygnałowych stanowi 2 najważniejsze kategorie, służące do oceny wartości oczekiwanych. Średni odsetek dwu- i trójsygnałowych jąder komórkowych we wstępnym badaniu wynosił odpowiednio 96,7% (SD = 0,88%) oraz 0,71% (SD = 0,52%). Analogicznie, w badaniu potwierdzającym z użyciem 60 prawidłowych próbek średni odsetek dwu- i trójsygnałowych jąder komórkowych wynosił odpowiednio 96,7% (SD = 2,05%) oraz 0,41% (SD = 0,24%). A zatem, jeśli zalecane wytyczne dotyczące liczenia sygnałów są przestrzegane i stosowane, odsetek komórek dwusygnałowych w prawidłowych próbkach szpiku kostnego powinien mieścić się w zakresie od 92,7% do 100% (95% przedział ufności), zaś odsetek komórek trójsygnałowych powinien mieścić się w zakresie od 0% do 1,73% (95% przedział ufności).

Wartości w grupie próbek szpiku kostnego wykazujących obecność komórek z trisomią 8

Przeprowadzono badanie w celu oceny rozkładu sygnałów FISH w jądrach interfazowych w 151 próbkach szpiku kostnego, w których uprzednio stwierdzono obecność komórek z trisomią 8 w klasycznym badaniu cytogenetycznym. Rozkład sygnałów dla tych 151 próbek przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Procentowy rozkład ilości komórek z sygnałem sondy CEP 8 w 151 próbkach szpiku kostnego z trisomią 8

	Odsetek komórek, dla których uzyskano				
	0 sygnałów	1 sygnał	2 sygnały	3 sygnały	≥4 sygnały
Wartość średnia	0,08	1,21	48,76	48,81	1,22
SD	0,22	1,22	28,90	29,58	6,42

W próbkach szpiku kostnego uznanych za nieprawidłowe w badaniu cytogenetycznym krytyczną kategorię stanowi odsetek komórek z 3 sygnałami (% jąder trójsygnałowych). W oparciu o analizę FISH 151 próbek średnia wartość (\pm SD) odsetka jąder trójsygnałowych wyniosła 48,81% (\pm 29,58%). Odsetek jąder trójsygnałowych mieścił się w zakresie od 0,6% do 96,6%.

Wyznaczenie wartości odcięcia (cutoff)

Inną istotną kategorią w grupie prawidłowych próbek szpiku kostnego jest odsetek jąder trójsygnałowych. Odsetek jąder trójsygnałowych w próbkach prawidłowych został zastosowany do wyznaczenia punktu odcięcia dla trisomii 8. Odsetek komórek trójsygnałowych obliczono dla każdego z 60 uczestników badania kluczowego, po czym oceniono rozkład danych w odniesieniu do rozkładu normalnego w oparciu o test Shapiro-Wilka.¹⁰ Założenie normalności nie zostało spełnione, w związku z czym dane zostały przekształcone logarytmicznie i obliczono średni odsetek komórek trójsygnałowych oraz wartość odchylenia standardowego. Wyznaczono 95-procentowe przedziały ufności przy użyciu aproksymacji rozkładem normalnym, zaś jako wartość odcięcia zastosowano antylogarytm górnej granicy przedziału. Szczegółowe informacje na temat obliczeń zestawiono poniżej w Tabeli 7.

Tabela 7. Wyznaczenie punktu odcięcia w celu klasyfikacji komórek z trisomią 8

Statystyka	Odsetek jąder trójsygnałowych	
	Wartości przekształcone logarytmicznie	Arytmetyczna wartość antylogarytmu
Wartość średnia	-0,4783	—
Odchylenie standardowe	0,4178	—
Średnia górnej wartości 95% przedziału ufności + 1,96 SD	0,3406	2,19

Punkt odcięcia, wynoszący 2,19% i obliczony w Tabeli 7., zaokrąglono do 2,2%. Wartości prawidłowe (ujemne) zdefiniowano jako \leq 2,2% komórek trójsygnałowych, zaś $>$ 2,2% komórek trójsygnałowych zdefiniowano jako dodatnie pod względem obecności trisomii 8.

Wartość odcięcia wynosząca 2,2% jest również poparta analizą krzywej ROC (ang. *Receiver Operator Characteristic*) w celu wyznaczenia maksymalnej wartości względnej czułości i swoistości.

Przed zastosowaniem zestawu CEP 8 laboratorium powinno zweryfikować swoją wartość odcięcia poprzez przeanalizowanie i zliczenie sygnałów dla co najmniej 10 próbek szpiku kostnego zgodnie z zaleceniami opisanymi w rozdziale dotyczącym liczenia sygnałów w niniejszej instrukcji używania. Odsetek jąder trójsygnałowych w próbkach prawidłowych powinien być niższy niż punkt odcięcia wynoszący 2,2%. Jeśli ta wartość odcięcia nie jest odpowiednia dla danej placówki, użytkownik może ponownie ją wyznaczyć, przeprowadzając opisane powyżej procedury statystyczne. Należy pamiętać, że dysponowanie 10 próbkami nie jest wystarczające do wyznaczenia nowej wartości odcięcia.

SZCZEGÓŁOWA CHARAKTERYSTYKA TESTU

Czułość i swoistość analityczna

Wydatność hybrydyzacji

W badaniu próbnym z użyciem 35 próbek szpiku kostnego średni odsetek komórek bez sygnału hybrydyzacyjnego wyniósł 0,22% (SD = 0,20%). W badaniu kluczowym z użyciem 60 próbek szpiku kostnego średni odsetek komórek bez sygnału hybrydyzacyjnego wyniósł 0,11% (SD = 0,21%). A zatem $<$ 2% komórek bez żadnego sygnału stanowi realistyczną normę, w szczególności w badaniach metafaz metodą FISH.

Czułość analityczna

Czułość analityczną sondy CEP 8 przetestowano w opisanym poniżej badaniu odtwarzalności. W badaniu tym oszacowano, że próbki z trisomią na poziomie 0% wykazywały średnio 0,95% (SD = 0,51%) jąder trójsygnałowych, zaś dla próbek z trisomią na poziomie 5% odsetek ten wyniósł 5,37% (SD = 0,98%). W przypadku próbek z trisomią na poziomie 0% oraz 5% niektóre wartości pokrywały się. Górna wartość 95% przedziału ufności dla próbek z 0% trisomii wyniosła 1,95%, zaś dolna wartość 95% przedziału ufności dla próbek z 5% trisomii wyniosła 3,45%. A zatem, granicę wykrywalności dla sondy CEP 8 w komórkach interfazowych oszacowano na 4,0%.

Swoistość analityczna

Badania swoistości dla poszczególnych *locus* przeprowadzono z użyciem płytek metafazowych zgodnie ze standardowymi protokołami kontroli jakości firmy Abbott Molecular. Przebadano kolejno 62 płytki metafazowe wybarwione metodą „G-banding” w celu identyfikacji chromosomu 8, a następnie przeprowadzono oznaczenie metodą FISH. W żadnej z 62 badanych próbek nie zaobserwowano hybrydyzacji krzyżowej do *loci* na innych chromosomach. Hybrydyzacja ograniczyła się do regionu centromerowego chromosomu 8.

Odtwarzalność

Przeprowadzono badanie próbne w celu oceny odtwarzalności analizy interfaz CEP 8 przy określaniu odsetka komórek trójsygnałowych przy użyciu jednej partii sondy DNA CEP 8. Szkiełka z próbkami szpiku kostnego pobranymi od zdrowych dawców przygotowano w 1 ośrodku wewnętrznym i przekazano do 2 ośrodków w celu wykonania analizy FISH. Następnie sygnały były liczone przez 4 obserwatorów w ciągu różnych dni. Wartość średnią, odchylenie standardowe oraz procentowy współczynnik zmienności (CV) dla obserwowanego odsetka jąder trójsygnałowych przedstawiono w Tabelach 8. do 12.

W celu dalszej oceny odtwarzalności testu z użyciem sondy CEP 8 poddano badaniu komórki trójsygnałowe pod względem odtwarzalności pomiędzy ośrodkami, pomiędzy partiami, pomiędzy dniami i pomiędzy obserwatorami. Jedną próbkę szpiku kostnego wykazującą niski stopień (około 7%) trisomii 8 oceniono pod względem odsetka komórek trójsygnałowych zgodnie z instrukcjami dotyczącymi liczenia sygnałów podanymi w niniejszej instrukcji używania. Wartość średnią, SD oraz procentowy współczynnik zmienności (CV) dla obserwowanego odsetka jąder trójsygnałowych dla każdej zmiennej przedstawiono w Tabelach 8. do 12.

Tabela 8. Precyzja obserwowanego odsetka jąder trójsygnałowych

Stopień trisomii 8	n	Wartość średnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności
0%	24	0,99%	0,57%	58%
7%	24	7,70%	1,45%	19%

Tabela 9. Zestawienie danych statystycznych dotyczących odsetka jąder trójsygnałowych według ośrodka badawczego

Stopień trisomii 8	Statystyka	Ośrodek nr 1	Ośrodek nr 2	Ośrodek nr 3
0%	Wartość średnia	0,83	1,15	—
	SD	0,40	0,67	—
	CV (%)	48,20	46,20	—
	n	12,00	12,00	—
7%	Wartość średnia	8,93	8,02	6,17
	SD	0,96	1,09	1,10
	CV (%)	10,70	13,60	17,8
	n	8,00	8,00	8,00

SD (odchylenie standardowe), CV(%) (współczynnik zmienności)

Tabela 10. Zestawienie danych statystycznych dotyczących odsetka jąder trójsygnałowych według partii sondy

Stopień trisomii 8	Statystyka	Partia nr 1	Partia nr 2	Partia nr 3	Partia nr 4
0%	Wartość średnia	0,99	—	—	—
	SD	0,57	—	—	—
	CV (%)	58,00	—	—	—
	n	24,00	—	—	—
7%	Wartość średnia	8,30	7,63	7,80	7,10
	SD	1,72	1,45	0,95	2,02
	CV (%)	20,70	19,00	12,10	28,50
	n	6,00	6,00	6,00	6,00

SD (odchylenie standardowe), CV(%) (współczynnik zmienności)

Tabela 11. Zestawienie danych statystycznych dotyczących odsetka jąder trójsygnalowych według dnia badania					
Stopień trisomii 8	Statystyka	Dzień nr 1	Dzień nr 2	Dzień nr 3	Dzień nr 4
0%	Wartość średnia	0,83	1,15	—	—
	SD	0,40	0,67	—	—
	CV (%)	48,20	46,20	—	—
	n	12,00	12,00	—	—
7%	Wartość średnia	8,23	7,67	7,17	7,76
	SD	1,70	1,40	2,20	0,73
	CV (%)	20,70	18,30	30,70	9,40
	n	6,00	6,00	6,00	6,00

SD (odchylenie standardowe), CV(%) (współczynnik zmienności)

Tabela 12. Zestawienie danych statystycznych dotyczących odsetka jąder trójsygnalowych według obserwatora			
Stopień trisomii 8	Statystyka	Obserwator nr 1	Obserwator nr 2
0%	Wartość średnia	0,75	1,23
	SD	0,64	0,37
	CV (%)	85,30	30,10
	n	12,00	12,00
7%	Wartość średnia	7,82	7,60
	SD	1,35	1,76
	CV (%)	17,30	23,20
	n	12,00	12,00

SD (odchylenie standardowe), CV(%) (współczynnik zmienności)

Zaobserwowano znaczącą zmienność wartości pomiędzy ośrodkami oraz pomiędzy obserwatorami, co odzwierciedlało subiektywność wzrokowego liczenia sygnałów. Wyniki klasyfikacji szkiełek jako dodatnich lub ujemnych pod względem trisomii 8 (przy użyciu wartości odcięcia równej 2,2%) były w 96% prawidłowe (1 z 24 wykazywał obecność 2,4% jąder trójsygnalowych) w przypadku prawidłowych próbek szpiku kostnego i w 100% prawidłowe w przypadku próbek z niewielkim (7%) stopniem trisomii 8.

Porównanie metod: próbki kliniczne

Przeprowadzono wieloośrodkowe, zaślepione, kontrolne, porównawcze badanie w celu dalszego określenia działania zestawu sond CEP 8 SpectrumOrange DNA Probe Kit. Celem badania było wyznaczenie czułości i swoistości testu z użyciem sondy CEP 8 względem klasycznego badania cytogenetycznego, będącego standardową praktyką. Cztery laboratoria dostarczyły 368 archiwalnych próbek szpiku kostnego w celu przeprowadzenia analizy w 3 ośrodkach badawczych. Ośrodek nr 1 dostarczył 101 próbek. Ośrodek nr 2 dostarczył 57 próbek. Ośrodek nr 3 dostarczył 130 próbek. Ośrodek nr 4 dostarczył 80 próbek. Próbkę pochodzącą z ośrodka nr 4 przebadano w ośrodku nr 3. Po przeprowadzeniu klasycznego badania cytogenetycznego 151 próbek sklasyfikowano jako dodatnie pod względem trisomii 8, 201 - jako ujemne pod względem trisomii 8, zaś 16 - jako niejednoznaczne pod względem trisomii 8 (1 trisomia 8 na 30 przebadanych metafaz). Piętnaście spośród 16 niejednoznacznych przypadków zostało „celowo” wybranych po zakończeniu badania. Próbkę tę pochodziły od pacjentów, u których zdiagnozowano jedną z poniższych chorób:

1. ostra białaczka szpikowa (AML): 102 próbki
2. zespół mieloproliferacyjny (MPD), w tym czerwienica prawdziwa: 44 próbki
3. zespół mielodysplastyczny (MDS): 80 próbek
4. przewlekła białaczka szpikowa (CML): 72 próbki
5. choroby układu krwiotwórczego niesklasyfikowane gdzie indziej (HDNOS): 70 próbek (w tym choroby hiperproliferacyjne takie jak odczyn białaczkowy, zespoły limfoproliferacyjne lub przewlekła białaczka limfatyczna bez trisomii 8).

W jednym ośrodku badawczym około 50% archiwalnych próbek szpiku kostnego nie dało informatywnych wyników FISH. Dalsze badanie próbek wybranych z tej grupy wykazało brak integralności próbek i ustalono, iż w tym ośrodku próbki były przechowywane wbrew zaleceniom w temp. 4 °C, zamiast w temp. -20 °C. Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto wniosek, iż niektóre próbki i/lub preparaty były nieodpowiednie.

Analiza FISH jąder interfazowych względem klasycznego badania cytogenetycznego

Na podstawie tego samego wieloośrodkowego porównawczego badania opisanego powyżej porównano wyniki analizy jąder interfazowych uzyskane metodą FISH z wynikami klasycznego badania cytogenetycznego. W oparciu o punkt odcięcia wynoszący 2,2% jąder trójsygnalowych, który został zwalidowany w tym samym kluczowym badaniu klinicznym, względna czułość wyniosła 96,03% (145/151) [95% przedział ufności: 92,55 do 99,51%], zaś względna swoistość wyniosła 98,01% (197/201) [95% przedział ufności: 96,08 do 99,94%] dla analizy jąder interfazowych przy użyciu sondy CEP 8. Wyniki zestawiono w Tabeli 13.

Spośród 10 niezgodnych przypadków wyniki klasycznego badania cytogenetycznego mieściły się w zakresie od 0/20 do 8/22 komórek metafazowych z trisomią 8, zaś wyniki analizy jąder interfazowych przy użyciu sondy CEP 8 wyrażone jako odsetek jąder trójsygnalowych mieściły się w zakresie od 0,6% do 6,0%. Spośród 16 niejednoznacznych przypadków odsetek jąder trójsygnalowych w badaniu przy użyciu sondy CEP 8 mieścił się w zakresie od 0,2% do 2,2%.

Tabela 13. Czułość i swoistość analizy jąder interfazowych metodą FISH przy użyciu sondy CEP 8 przy zwalidowanym punkcie odcięcia (2,2%) względem klasycznego badania cytogenetycznego / Wszystkie 4 ośrodki łącznie

Klasyczne badanie cytogenetyczne				
Analiza jąder interfazowych z użyciem sondy CEP 8	Wynik dodatni	Wynik ujemny	Wynik niejednoznaczny	Ogółem
Wynik dodatni	145 (96,03%)	4	0	149
Wynik ujemny	6	197 (98,01%)	16	219
OGÓŁEM	151	201	16	368

W oparciu o 368 próbek klinicznych współczynnik korelacji dla trisomii 8 wynosił 0,91 pomiędzy klasycznym badaniem cytogenetycznym metafaz z analizą komórek interfazowych przy użyciu sondy CEP 8. Współczynnik regresji analizy z użyciem sondy CEP 8 względem badania cytogenetycznego wyniósł 0,71. Poniższe równanie przedstawia odzyskanie wyników analizy z użyciem sondy CEP 8 względem wyników badania cytogenetycznego:

$$y = 1,2944 + 0,7112x$$

gdzie: x = odsetek płytek metafazowych z trisomią 8 w klasycznym badaniu cytogenetycznym

$$y = \text{odsetek trójsygnalowych jąder interfazowych w analizie z użyciem sondy CEP 8}$$

Analiza metafaz w badaniu FISH względem klasycznego badania cytogenetycznego

W porównaniu analizy metafaz z użyciem sondy CEP 8 z klasycznym badaniem cytogenetycznym uwzględniono łącznie 348 przypadków. Dwadzieścia spośród 368 przypadków uwzględnionych w analizie jąder interfazowych z użyciem sondy CEP 8 zostało wyłączone z badania ze względu na niewystarczającą ilość płytek metafazowych do przeprowadzenia analizy z użyciem sondy CEP 8 (próbka musi zawierać ≥ 20 płytek metafazowych.)

Zgodnie z zasadami klasycznego badania cytogenetycznego badaną próbkę uważa się za dodatnią pod względem trisomii 8, jeśli w 2 lub więcej płytkach metafazowych występuje trisomia chromosomu 8. W oparciu o wartość odcięcia wynoszącą ≥ 2 metafaz trójsygnalowych względna czułość wyniosła 89,19% (132/148) [95% przedział ufności: 84,19 do 94,19%], zaś względna swoistość wyniosła 91,30% (168/184) [95% przedział ufności: 87,22 do 95,37%] dla analizy metafaz z użyciem sondy CEP 8. Wyniki zestawiono w Tabeli 14. Spośród 16 niejednoznacznych przypadków uzyskanych w klasycznym badaniu cytogenetycznym, 15 było ujemnych, zaś 1 był niejednoznaczny pod względem trisomii 8 w analizie metafaz z użyciem sondy CEP 8.

Tabela 14. Czułość i swoistość analizy metafaz w badaniu FISH z użyciem sondy CEP 8 przy punkcie odcięcia wynoszącym ≥ 2 metafaz trójsygnałowych, w porównaniu z klasycznym badaniem cytogenetycznym

Analiza metafaz z użyciem sondy CEP 8	Klasyczne badanie cytogenetyczne			Ogółem
	Wynik dodatni	Wynik ujemny	Wynik niejednoznaczny	
Wynik niejednoznaczny	6	12	1	19
Wynik dodatni	132 (89,19%)	4	0	136
Wynik ujemny	10	168 (91,30%)	15	193
OGÓŁEM	148	184	16	348

Na podstawie 348 próbek klinicznych współczynnik korelacji dla trisomii 8 wynosił 0,91 pomiędzy klasycznym badaniem cytogenetycznym metafaz z badaniem metafaz przy użyciu sondy CEP 8. Współczynnik regresji analizy z użyciem sondy CEP 8 względem badania cytogenetycznego wyniósł 0,83. Poniższe równanie przedstawia odwzorowanie wyników badania z użyciem sondy CEP 8 względem wyników badania cytogenetycznego:

$$y = 1,6979 + 0,8325x$$

gdzie: x = odsetek płytek metafazowych z trisomią 8 w klasycznym badaniu cytogenetycznym

y = odsetek trójsygnałowych płytek metafazowych w badaniu z użyciem sondy CEP 8

Analiza jąder interfazowych w badaniu FISH względem analizy metafaz w badaniu FISH

Celem uzupełnienia porównania badania FISH z klasycznym badaniem cytogenetycznym opisanym powyżej, porównano również analizę komórek interfazowych w badaniu FISH z badaniem metafaz metodą FISH. Zgodnie z Tabelą 15. obie metody wykazują zgodność na poziomie 90,8% [(133+183)/348].

Tabela 15. Porównanie analizy komórek interfazowych z użyciem sondy CEP 8 z analizą metafaz z użyciem sondy CEP 8, przy punkcie odcięcia wynoszącym ≥ 2 metafaz trójsygnałowych

Analiza metafaz z użyciem sondy CEP 8	Analiza komórek interfazowych z użyciem sondy CEP 8 (wartość odcięcia = 2,2%)			Ogółem
	Wynik dodatni	Wynik ujemny	Wynik niejednoznaczny	
Wynik niejednoznaczny	5	14	1	19
Wynik dodatni	133	3	0	136
Wynik ujemny	10	183	15	193
OGÓŁEM	148	200	16	348

Na podstawie 348 próbek klinicznych współczynnik korelacji dla trisomii 8 wynosił 0,95 pomiędzy badaniem komórek interfazowych przy użyciu sondy CEP 8 a badaniem metafaz przy użyciu sondy CEP 8. Współczynnik regresji analizy metafaz względem analizy komórek interfazowych przy użyciu sondy CEP 8 wynosił 0,81. Poniższe równanie przedstawia odwzorowanie wyników analizy metafaz przy użyciu sondy CEP 8 na wyniki analizy komórek interfazowych przy użyciu sondy CEP 8:

$$y = 1,0942 + 0,8119x$$

gdzie: x = odsetek trójsygnałowych komórek interfazowych w badaniu przy użyciu sondy CEP 8

y = odsetek trójsygnałowych płytek metafazowych w badaniu przy użyciu sondy CEP 8

PIŚMIENNICTWO


- Mertens F, Johansson M, Mitelman F. The pathogenetic significance of acquired trisomy 8 is not reducible to amplification of a single chromosome band. *Cancer Genet Cytogenet.* 1995;83:176-177.
- Barch MJ, ed. *The ACT Cytogenetics Laboratory Manual.* 2nd ed. New York, NY: Raven Press, Ltd; 1991:17-105,297-536.
- Jenkins RB, Le Beau MM, Kraker WJ, et al. Fluorescence in situ hybridization: A sensitive method for trisomy 8 detection in bone marrow specimens. *Blood.* 1992;70(12):3307-15.
- Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics.* Second Edition, New York, NY: John Wiley & Sons, Inc.; 1995.

- Testa JR. Cytogenetic Patterns in Polycythemia Vera. *Cancer Genet Cytogenet.* 1980;1:207-215.
- Swolin B, Weinfeld A, Westin J. A prospective long-term cytogenetic study in polycythemia vera in relation to treatment and clinical course. *Blood.* 1988;72:386-395.
- Solé F, Prieto F, Badia L, et al. Cytogenetic studies in 112 cases of untreated myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet.* 1992;64:12-20.
- Parlier V, Van Melle G, Beris P, et al. Hematologic, clinical, and cytogenetic analysis in 109 patients with primary myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet.* 1994;78:219-231.
- Yunis JJ. New chromosome techniques in the study of human neoplasia. *Human Pathology.* 1981;12(6):540-549.
- Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods.* Sixth Edition, Ames, IA: The Iowa State University Press; 1972.
- U.S. Centers for Disease Control. *Morbidity and Mortality Weekly Review.* 1987;36(suppl. 2S):2S-18S.
- Sandberg AA. *The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia.* 2nd ed. New York, NY: Elsevier Science Publishing Co; 1990.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization. *PNAS USA.* 1986;83:2934-38.
- Ploem JS, Tanke HJ. *Introduction to Fluorescence Microscopy.* New York, NY: Oxford University Press; Royal Microscopical Society. 1987.
- Bradbury S. *An Introduction to the Optical Microscope.* Revised Edition. New York, NY: Oxford University Press; Royal Microscopical Society. 1991.
- National Comprehensive Cancer Network, Inc. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Chronic Myelogenous Leukemia. Version 1.2013. 2012. NCCN Web site. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cml.pdf. Accessed July 28, 2012.
- National Comprehensive Cancer Network, Inc. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Myelodysplastic Syndromes. Version 1.2012. 2011. NCCN Web site. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/mds.pdf. Accessed July 28, 2012.
- US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009. [Also available online. Type > www.cdc.gov, search > BMBL5 > look up sections III and IV].
- US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens.*
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections*; Approved Guideline - Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
- World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual.* 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2004.


POMOC TECHNICZNA

W przypadku problemów technicznych prosimy o kontakt z przedstawicielem firmy Abbott Molecular w Polsce lub o odwołanie strony internetowej firmy Abbott Molecular pod adresem <http://www.abbottmolecular.com>.

CEP, Vysis, SpectrumOrange oraz ProbeChek są znakami towarowymi grupy spółek firmy Abbott podlegających różnym jurysdykcjom. Wszystkie pozostałe znaki towarowe stanowią własność poszczególnych firm.

 Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA



 EC REP Abbott GmbH
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany

© 2006, 2010, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

kwiecień 2020

 **Abbott**