

Vysis CLL FISH Probe Kit

pl
Vysis CLL
FISH Probe Kit

REF 04N02-022

G68455R03

B4N02P

UWAGA: Zmiany wyróżniono kolorem szarym.

Objaśnienia użytych symboli

	Numer katalogowy
	Numer partii
	Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Użyć do
	Ograniczenie dopuszczalnej temperatury
	Uwaga: Zatrzyj do dołączonej dokumentacji.
	Zagrożenia biologiczne
	Zatrzyj do instrukcji używania.
	Zawartość wystarczająca do <n> badań
	Test <i>in vitro</i>
	Wyprodukowano w USA.
	Do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Globalny numer jednostki handlowej
	Do użytku wyłącznie na zlecenie lekarza
	Niebezpieczeństwo
	Niebezpieczeństwo
	Niebezpieczeństwo
	Niebezpieczeństwo
	Upoważniony przedstawiciel w krajach Wspólnoty Europejskiej
	Producent

NAZWA

Vysis CLL FISH Probe Kit

PRZEWIDZIANE ZASTOSOWANIE

Zestaw sond Vysis CLL FISH Probe Kit jest przeznaczony do wykrywania delecji obszarów docelowych sondy LSI TP53, LSI ATM oraz LSI D13S319 oraz powielenia sekwencji D12Z3 w próbkach krwi obwodowej pobranych od pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową B-komórkową (ang. B-cell chronic lymphocytic leukemia, CLL). Test ten może być stosowany do dychotomizacji CLL (13q-, +12 lub grupa z prawidłowym genotypem względem grupy z delecją 11q- lub 17p-) oraz może służyć jako pomoc przy określaniu rokowania w połączeniu z dodatkowymi biomarkerami, wynikami morfologii oraz innymi danymi klinicznymi.

Badanie to wykonuje się wyłącznie na zlecenie lekarza.

WPROWADZENIE

Przewlekła białaczka limfocytowa (CLL) jest najczęstszym typem białaczki występującym u osób dorosłych w krajach rozwiniętych. Średnio u 1 osoby na 202 mężczyzn i kobiet w ciągu życia zostanie zdiagnozowana CLL.¹ Mediana wieku w momencie rozpoznania choroby to około 70 lat. Wskaźnik występowania choroby u mężczyzn jest wyższy (6,44 na 100 000 osób) niż u kobiet (3,51 na 100 000 osób).¹ Wskaźnik występowania białaczki jest najwyższy w populacji osób białych niełatynoskiego pochodzenia (13,6 na 100 000 osób), zaś najniższy - wśród Azjatów i ludności wysp Pacyfiku (7,4 na 100 000 osób) oraz rdzennych Indian Ameryki Północnej i mieszkańców Alaski (7,3 na 100 000 osób).²

Wykazano, iż białko p53 o aktywności supresora nowotworowego odgrywa kluczową rolę w onkogenezie oraz odpowiedzi na chemioterapię w różnych rodzajach ludzkich nowotworów. U ludzi gen TP53 występuje na krótkim ramieniu chromosomu 17 (17p13)³ i podlega supresji lub mutacji w wielu ludzkich nowotworach.⁴ Delecję regionu 17p powodujące nieprawidłowości białka supresorowego p53 uznano za jeden z czynników najbardziej niekorzystnego rokowania dla CLL, bowiem jest to czynnik predykcyjny, wskazujący na krótki okres do wystąpienia progresji choroby, krótki okres trwania odpowiedzi na leczenie, brak odpowiedzi na leczenie oraz krótki czas całkowitego przeżycia (ang. overall survival, OS).^{5,6}

Delecję 17p obserwuje się częściej u pacjentów poddawanych terapii niż u pacjentów wcześniej nieleczonych, przy czym jej częstotliwość wzrasta podczas trwania choroby u maksymalnie 50% pacjentów z nawrotową/oporną postacią choroby, w której występuje delecja.⁶ U około 8 do 12% pacjentów z CLL poddanych leczeniu pierwszego rzutu występuje delecja 17p.⁶ Ogólnie przyjmuje się, że u pacjentów z delecją 17p rokowania dotyczące wyników leczenia są słabe.^{7,8}

Gdy chemoimmunoterapia na bazie analogów purynowych nie powiedzie się, w wyniku kolejnych terapii czas przeżycia bez progresji choroby (ang. progression-free survival, PFS) jest krótszy.⁸ Na wynik leczenia silnie wpływa kilka cech natury molekularno-biologicznej, jak również kilka nieprzypadkowych zmian o podłożu cytogenetycznym oraz onkogeny. W szczególności wśród pacjentów z CLL zdefiniowano grupę bardzo wysokiego ryzyka, w której występuje delecja krótkiego ramienia chromosomu 17 (del 17p) przy medianie oczekiwanej długości życia wynoszącej mniej niż 2 do 3 lat.⁸

Obecnie u większości pacjentów ze zdiagnozowaną CLL choroba jest we wczesnym stadium rozwoju (stadium 0 lub 1 wg Rai). Pacjenci z CLL we wczesnym stadium stanowią grupę dość zróżnicowaną. U około 30% do 50% z nich występuje wysokie ryzyko przyspieszonej progresji choroby, podczas gdy pozostali pacjenci mogą przeżyć dziesiątki lat i nigdy nie wymagają leczenia. W wyniku najnowszych badań nad cechami biologicznymi białaczkowych komórek B odkryto nowe narzędzia prognostyczne [stan zmutowania genów w zmiennym regionie łańcucha

ciężkiego immunoglobulin, nieprawidłowości cytogenetyczne poddane ocenie metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) oraz ekspresja kinazy ZAP70 (ang. Z-chain-associated protein kinase-70)], które mogą ułatwić identyfikację pacjentów z chorobą we wczesnym stadium rozwoju, należących do grupy wysokiego ryzyka wczesnej progresji choroby.⁹

Rutynowa analiza kariotypu wykrywa jedynie aberracje chromosomowe związane z CLL w 40% do 50% przypadków. Zastosowanie metody FISH oraz innych technologii umożliwi wykrycie nieprawidłowości w obrębie genomu w ponad 80% przypadków CLL. Często występujące aberracje genów to trisomia 12 oraz delecje 13q, 17p oraz 11q.¹⁰⁻¹²

W kilku opublikowanych badaniach sugeruje się, iż niektóre z tych nieprawidłowości chromosomowych mogą być skorelowane z różnymi parametrami choroby.^{5,13-15} Zestaw sond Vysis CLL FISH Probe Kit stosuje technologię FISH z wykorzystaniem sond DNA do wykrywania statusu delecji obszarów docelowych dla sondy specyficznej dla danego locus: LSI (ang. locus-specific identifier) TP53 (zawierającej gen kodujący białko p53, zlokalizowany na chromosomie 17p), LSI ATM (zawierającej zmutowany gen odpowiadający za zespół ataksji-teleangiektazji, zlokalizowany na chromosomie 11q) oraz LSI D13S319 (zawierającej marker D13S319, zlokalizowany na chromosomie 13q), jak również do wykrywania trisomii 12 za pomocą sondy CEP12 (sekwencje alfa-satelitarne D12Z3, zlokalizowane na chromosomie 12).

Zestaw sond Vysis CLL FISH Probe Kit zawiera sondę LSI 13q34 (zawierającą gen kodujący białka błony lizosomalnej [ang. lysosomal-associated membrane protein 1], zlokalizowany na chromosomie 13q), pełniącą funkcję sondy kontrolnej.

Według wytycznych National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Practice Guidelines™ dotyczących chłoniaków nieziarniczych (v.2.2015), stanowiących zalecenia uzgodnione przez wiodących onkologów z USA, metoda FISH (z uwzględnieniem nieprawidłowości badanych przy użyciu tego zestawu) daje informatywne wyniki pod względem zarówno rokowania, jak i ustalenia terapii. W powyższych wytycznych zaleca się stosowanie metody FISH w chwili rozpoznania, jak i ponowną ocenę metodą FISH w chwili wznowy w celu doboru opcji leczenia (z uwzględnieniem nieprawidłowości badanych przy użyciu tego zestawu).¹⁶

ZASADA METODY

Opis sondy DNA

Sondy Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen Probes

Sonda LSI TP53 wyznakowana na pomarańczowo (SpectrumOrange), o wielkości około 172 kpz (chr17:7494395-7666098; February 2009 Assembly University of California, Santa Cruz [UCSC] Human Genome Browser¹⁷), jest położona na chromosomie 17p13.1 i zawiera cały gen TP53.

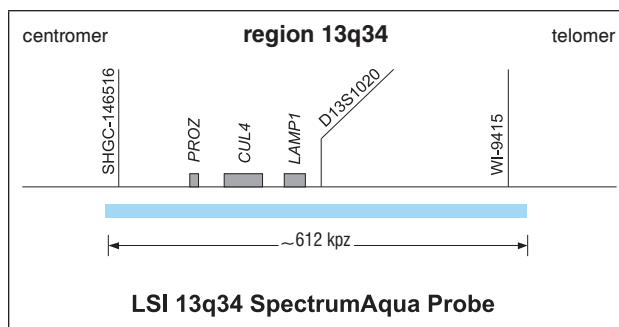
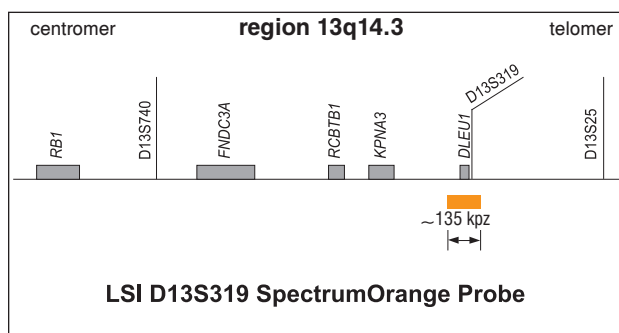
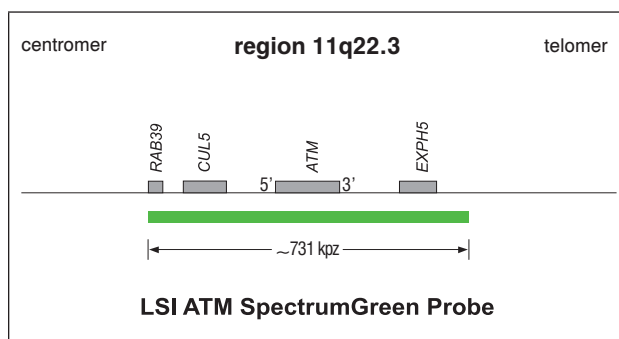
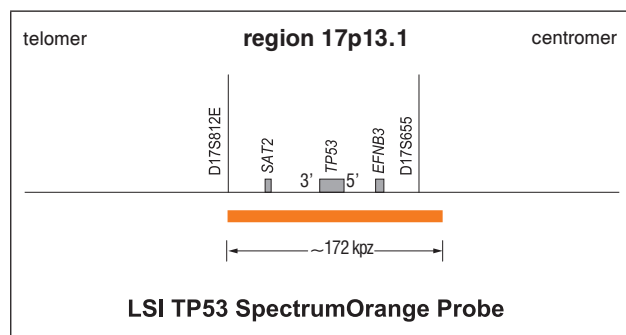
Sonda LSI ATM wyznakowana na zielono (SpectrumGreen), o wielkości około 731 kpz (chr11:107801007-108531514; February 2009 Assembly UCSC Human Genome Browser), jest położona na chromosomie 11q22.3 i zawiera gen ATM.

Sondy Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/CEP 12 SpectrumGreen Probes

Sonda LSI D13S319 wyznakowana na pomarańczowo (SpectrumOrange), o wielkości około 135 kpz (chr13:50602368-50737301; February 2009 Assembly UCSC Human Genome Browser), jest położona na chromosomie 13q14.3.

Sonda LSI 13q34 wyznakowana na jasnoniebiesko (SpectrumAqua), o wielkości około 612 kpz (chr13:113691322-114303435; February 2009 Assembly UCSC Human Genome Browser), jest położona na chromosomie 13q34.

Sonda CEP 12 wyznakowana na zielono (SpectrumGreen) jest położona na centromerze chromosomu 12.



Ogólny opis odczynników

Barwnik kontrastowy DAPI II

Barwnik kontrastowy DAPI II zawiera DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol·2HCl) (specyficzny barwnik wiążący się z DNA) oraz 1,4-fenyleneodiaminę (składnik przeciwdziałający wyświecaniu, który powoduje, iż sygnały emitowane przez fluorofory nie tracą intensywności) w mieszaninie glicerolu i roztworu soli fizjologicznej zbuforowanej fosforanami.

NP-40

NP-40 jest niejonową substancją czynną powierzchniowo, wykorzystywaną w wodnym roztworze płuczącym do płukania po zakończeniu hybrydyzacji.

Sól 20X Standard Sodium Citrate (SSC) Salt

20X SSC jest solą, stanowiącą mieszaninę chlorku sodu i cytrynianu sodu. Jest ona stosowana do sporządzania roztworu 20X SSC oraz kolejnych rozcieńczeń do przygotowania roztworów do denaturacji i płukania.

Opis metody

FISH jest techniką umożliwiającą wizualizację swoistych sekwencji kwasów nukleinowych na preparacie komórkowym. Dokładniej rzecz ujmując, metoda FISH polega na precyzyjnym przyłączeniu (ang. annealing) jednoniciowej, znakowanej fluoroforem sondy DNA do komplementarnej sekwencji docelowej. Efekt hybrydyzacji sondy do fragmentu komórkowego DNA może być obserwowany poprzez bezpośrednią detekcję przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego.

Próbki krwi obwodowej pobrane od pacjentów z CLL są nakładane na szkiełka mikroskopowe przy użyciu standardowych procedur cytogenetycznych. DNA wyizolowane z próbki ulega denaturacji do formy jednoniciowej, co w konsekwencji umożliwia hybrydyzację z sondami zestawu Vysis CLL FISH Probe Kit. Po hybrydyzacji niezwiązana sonda jest usuwana w serii płukań, a jądra są barwione przy użyciu barwnika kontrastowego DAPI, specyficznego barwnika wiążącego się z DNA, fluoryzującego na niebiesko. Efekt hybrydyzacji sond Vysis LSI TP53 SpectrumOrange, LSI ATM SpectrumGreen,

LSI D13S319 SpectrumOrange, LSI 13q34 SpectrumAqua oraz CEP 12 SpectrumGreen widoczny jest w mikroskopie fluorescencyjnym wyposażonym w odpowiednie filtry wzbudzające i emisyjne, jako pomarańczowe, zielone i jasnoniebieskie sygnały fluorescencyjne. W komórce z prawidłową liczbą kopii obszarów docelowych sond Vysis LSI TP53 SpectrumOrange oraz Vysis LSI ATM SpectrumGreen oczekiwanym wzorem sygnałów są dwa sygnały pomarańczowe i dwa sygnały zielone. W komórce z prawidłową liczbą kopii obszarów docelowych sond Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange oraz CEP 12 SpectrumGreen oczekiwanym wzorem sygnałów są dwa sygnały pomarańczowe i dwa sygnały zielone. Liczenie sygnałów sond Vysis LSI TP53 SpectrumOrange, LSI ATM SpectrumGreen, LSI D13S319 SpectrumOrange oraz CEP12 SpectrumGreen pozwoli określić bezwzględną liczbę kopii obszarów docelowych sond oraz stwierdzić obecność szukanых aberracji. Sonda LSI 13q34 SpectrumAqua pełni funkcję kontroli wykonania oznaczenia i jest opisana w dalszej części niniejszej instrukcji w rozdziale „Kontrola jakości”.

ODCZYNNIKI

Materiały dostarczone

Zestaw ten zawiera pięć odczynników do przeprowadzenia 20 oznaczeń. Oznaczenie definiuje się jako pojedynczy obszar hybrydizacyjny o wymiarach 22 mm × 22 mm sond Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen oraz pojedynczy obszar hybrydizacyjny o wymiarach 22 mm × 22 mm sond Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/CEP 12 SpectrumGreen.

Sondy Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen Probes

Nr części: 30-241051
Ilość: 1 fiołka, 200 µL/fiołkę (300 oraz 200 ng/10 µL)
Przechowywanie: -20 °C (± 5 °C) bez dostępu światła
Skład: Sondy DNA wyznakowane fluoroforem SpectrumOrange oraz SpectrumGreen w buforze hybrydizacyjnym

Sondy Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/CEP 12 SpectrumGreen Probes

Nr części: 30-241050
Ilość: 1 fiołka, 200 µL/fiołkę (200, 400 oraz 25 ng/10 µL)
Przechowywanie: -20 °C (± 5 °C) bez dostępu światła
Skład: Sondy DNA wyznakowane fluoroforem SpectrumOrange, SpectrumAqua oraz SpectrumGreen w buforze hybrydizacyjnym

Barwnik kontrastowy DAPI II

Nr części: 30-804811
Ilość: 1 fiołka, 600 µL/fiołkę (125 ng/mL)
Przechowywanie: -20 °C (± 5 °C) bez dostępu światła
Skład: DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindolo · 2HCl) oraz 1,4-fenilenodiamina w mieszaninie glicerolu oraz roztworu soli fizjologicznej zbuforowanej fosforanami

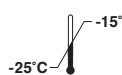
NP-40

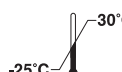
Nr części: 30-804810
Ilość: 2 fiołki, 2000 µL/fiołkę
Przechowywanie: -25 °C do 30 °C
Skład: NP-40 (niejonowy detergent)

Sól 20X SSC

Nr części: 30-804812
Ilość: 1 buteleczka, 66 g
Przechowywanie: -25 °C do 30 °C
Skład: Chlorek sodu i cytrynian sodu

INSTRUKCJE DOTYCZĄCE PRZECHOWYWANIA I POSTĘPOWANIA Z ODCZYNNIKAMI

 Zestaw sond Vysis CLL FISH Probe Kit musi być przechowywany w temp. -20 °C (± 5 °C) i w miejscu bez dostępu światła, jeśli nie jest stosowany.

 NP-40 oraz sól 20X SSC mogą być przechowywane oddzielnie w temperaturze pokojowej.

Warunki transportowania

Zestaw sond Vysis CLL FISH Probe Kit jest transportowany w suchym lodzie.

Jeśli stan dostarczonych odczynników jest inny niż podany na etykiecie bądź odczynniki są uszkodzone, należy skontaktować się z przedstawicielem firmy Abbott Molecular.

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

IVD Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*

Wyłącznie do diagnostyki *in vitro*



UWAGA: Zgodnie z zastrzeżeniem prawa federalnego USA produkt ten podlega sprzedaży i dystrybucji na zlecenie lekarza lub laboratorium klinicznego i przeznaczony jest do stosowania na zlecenie lekarza.

Środki bezpieczeństwa



UWAGA: Produkt 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

Składniki warunkujące stopień zagrożenia umieszczone na etykiecie:

- formamid
- eter oktylofenylowy glikolu polietylenowego

Zastosowanie mają poniższe środki ostrożności:



Niebezpieczeństwo

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.

H315 Działa drażniąco na skórę.

H318 Powoduje poważne uszkodzenie oczu.



H411 Działa toksycznie 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.

P310 Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem.

P301+P312 W PRZYPADKU POŁKNIECIA: W przypadku złego samopoczucia skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub z lekarzem.

P302+P352 W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Umyć dużą ilością wody.

P332+P313 W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: Zasięgnąć porady / zgłosić się pod opiekę lekarza.

P330 Wypłukać usta.

P362 Zdjąć zanieczyszczoną odzież.

P501 Zawartość / pojemnik usuwać zgodnie z miejscowymi przepisami.



Niebezpieczeństwo

H360	Może działać szkodliwie na płodność lub na dziecko w łonie matki.
P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
P202	Nie używać przed zapoznaniem się i zrozumieniem wszystkich środków bezpieczeństwa.
P280	Stosować rękawice ochronne / odzież ochronną / ochronę oczu.
P308+P313	W PRZYPADKU narażenia lub styczności: Zasięgnąć porady / zgłosić się pod opiekę lekarza.
P405	Przechowywać pod zamknięciem.
P501	Zawartość / pojemnik usuwać zgodnie z miejscowymi przepisami.

Oświadczenie dotyczące karty charakterystyki: Ważne informacje dotyczące bezpiecznego obchodzenia się z produktem, jego transportu i usuwania zawarte są w karcie charakterystyki.

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

Środki ostrożności dotyczące użytkowania

- Zestaw sond Vysis CLL FISH Probe Kit jest przeznaczony do użytku wyłącznie z próbkami, z którymi obchodzono się i które przechowywano zgodnie z opisem podanym w niniejszej instrukcji używania.
- Nie stosować zestawu sond Vysis CLL FISH Probe Kit po upływie daty ważności.
- Należy przestrzegać zaleceń zamieszczonych w instrukcji używania. Niezastosowanie się do tych zaleceń może spowodować uzyskiwanie błędnych wyników.

Środki ostrożności dotyczące pracy laboratorium

- Wszelkie materiały pochodzenia biologicznego powinny być traktowane jako czynniki potencjalnie zakaźne. Jako że często nie jest możliwe stwierdzenie ich zakaźności, podczas pracy ze wszystkimi próbkami pochodzenia ludzkiego należy przestrzegać uniwersalnych środków ostrożności.
- Próbkę, w której doszło do hemolizy, mogą uniemożliwić prawidłową hodowlę do standardowej analizy cytogenetycznej. Próbkę należy chronić przed działaniem kwasów, silnych zasad lub wysokich temperatur. Czynniki te powodują uszkodzenie DNA oraz mogą doprowadzić do uzyskania błędnych wyników testu FISH.
- Nieprzestrzeganie wszystkich procedur denaturacji preparatów, hybrydyzacji i detekcji może skutkować uzyskaniem nieakceptowalnych lub błędnych wyników.
- Barwnik kontrastowy DAPI II zawiera DAPI oraz 1,4-fenyleneodiaminę.
- DAPI może wykazywać działanie mutagenne na podstawie efektu genotoksycznego. Unikać wdychania, połykania lub kontaktu ze skórą. Szczegółowe ostrzeżenia, patrz karta charakterystyki.
- 1,4-fenyleneodiamina jest znana jako substancja powodująca reakcje alergiczne skóry i możliwe reakcje alergiczne ze strony układu oddechowego. Unikać wdychania, połykania lub kontaktu ze skórą. Szczegółowe ostrzeżenia, patrz karta charakterystyki.
- Fluorofory szybko ulegają degradacji (fotobłaknięciu) pod wpływem światła. Ograniczenie dostępu światła do wszystkich preparatów i zestawów sond zawierających fluorofory, jak również przechowywanie preparatów i zestawów sond bez dostępu światła, zmniejsza tę degradację. Dotyczy to wszystkich kroków, w trakcie których opracowuje się hybrydyzowany preparat. Wszystkie etapy procedury, do przeprowadzenia których nie jest wymagane światło (inkubacje, płukania itd.), należy przeprowadzać bez dostępu światła lub przy słabym świetle.
- Zestaw sond Vysis CLL FISH Probe Kit zawiera formamid, który ma właściwości teratogenne. Unikać zanieczyszczenia skóry i błon śluzowych.
- Do pomiaru temperatury roztworów i łaźni wodnych należy używać skalibrowanych termometrów.
- Przed każdym użyciem należy zawsze sprawdzić temperaturę roztworów płuczających, mierząc temperaturę roztworu w kominku do barwienia przy użyciu skalibrowanego termometru.
- Wszystkie substancje niebezpieczne należy usuwać zgodnie z zasadami usuwania materiałów niebezpiecznych obowiązującymi w danej placówce.

PROCEDURA BADANIA

Materiały dostarczone

- Vysis CLL FISH Probe Kit (nr kat. 04N02-022)

Materiały wymagane, lecz niedostarczone

- Olejek imersyjny odpowiedni do mikroskopii fluorescencyjnej
- Etanol (100%). Przechowywać w temperaturze pokojowej.
- Metanol
- Kwas octowy lodowaty
- Oczyszczona woda
- Klej kauczukowy
- 12 N kwas chlorowodorowy (HCl)
- 1 N lub 2N wodorotlenek sodu (NaOH)
- Formamid (o wysokim stopniu czystości)
- 0,075 M chlorek potasu (KCl)

Sprzęt laboratoryjny

- Szkiełka mikroskopowe, odtłuszczone
- Szkiełka nakrywkowe o wymiarach 22 mm x 22 mm
- Pipeta mikrolitrowa (o zakresie od 1 do 10 µL) oraz jałowe końcówki
- Timery
- Mikrowirówka
- Wirówka kliniczna osiągająca obroty równoważne 250 x g oraz mieszcząca probówkę wirówkową o poj. 15 mL
- Probówki stożkowe o poj. 15 mL
- Cylindry miarowe (100 mL do 1000 mL)
- Łaźnia wodna (70 do 80 °C)
- Łaźnia wodna (37 °C)
- Pęseta
- Strzykawka jednorazowego użytku
- Pipety jednorazowe (5 mL do 20 mL)
- Naczynka Coplina/pionowy kominik do barwienia
- Mikroskop fluorescencyjny wyposażony w zalecane filtry (patrz rozdział „Sprzęt mikroskopowy oraz akcesoria”)
- Skalibrowany termometr
- Kasetka na szkiełka z zamykaną pokrywą
- Mieszadło magnetyczne
- Pehametr
- Paski do pomiaru pH do sprawdzania wartości pH w zakresie 7,0 do 8,0
- Worteks
- Filtr o wielkości porów 0,45 µm
- Ciepłota z możliwością ustawienia temp. 37 °C
- Wilgotna komora
- Płyta grzejna do preparatów (45 do 50 °C)
- Komora do suszenia preparatów cytogenetycznych (opcjonalnie)
- Probówki do mikrowirówek
- Mikroskop fazowo-kontrastowy
- Piec osiągający temp. 90 °C lub odpowiednik

Sprzęt mikroskopowy oraz akcesoria

Mikroskop Do oględzin rezultatów hybrydyzacji wymagany jest mikroskop fluorescencyjny z systemem epiluminacji. W celu uzyskania optymalnego przebiegu oględzin preparatu FISH należy sprawdzić, czy mikroskop działa prawidłowo. Mikroskop przystosowany do oględzin rezultatów typowego barwienia DNA barwnikiem DAPI, jodkiem propidyny lub kwinakryną może nie być odpowiedni do pracy z testami FISH. Zaleca się rutynowe czyszczenie mikroskopu oraz okresowy przegląd techniczny, zwłaszcza 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 przedstawicielem serwisu producenta, aby upewnić się, czy system iluminacji fluorescencji jest odpowiedni do oględzin próbek badanych metodą FISH. Należy zapisać liczbę godzin pracy żarówki i wymienić ją, zanim upłynie wyznaczony czas jej zużycia. Należy upewnić się, czy lampa jest właściwie wyregulowana.

Obiektywy Używając mikroskopu wyposażonego w 100-watową lampę rtęciową lub jej odpowiednika o zbliżonym natężeniu oraz spektrum emitowanego światła, należy stosować obiektywy 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. Satysfakcjonujące rezultaty zliczania sygnałów FISH uzyskuje się przy użyciu obiektywów achromatycznych z imersją olejową, powiększających 60/63-krotnie lub 100-krotnie.

Olejek imersyjny Do obiektywów należy używać olejku imersyjnego przewidzianego dla niewielkiej autofluorescencji i przeznaczonego do użytku w mikroskopii fluorescencyjnej.

Filtr Hybrydyzacja sond Vysis LSI TP53 SpectrumOrange, LSI ATM SpectrumGreen, LSI D13S319 SpectrumOrange, LSI 13q34 SpectrumAqua oraz CEP 12 SpectrumGreen do obszarów docelowych DNA widoczna jest poprzez zastosowanie odpowiednio pomarańczowego, jasnoniebieskiego i zielonego barwnika fluorescencyjnego. DNA, do którego sondy nie hybrydowały, będzie fluoryzował na niebiesko w wyniku barwienia DAPI II.

Filtry zalecane do stosowania z zestawem sond Vysis CLL FISH Probe Kit to filtr dwupasmowy Vysis Dual Band Green/Orange V2, filtr jednopasmowy Vysis Single Band DAPI, filtr jednopasmowy Vysis Single Band Orange, filtr jednopasmowy Vysis Single Band Aqua oraz filtr jednopasmowy Vysis Single Band Green lub odpowiedniki.

PROTOKÓŁ BADANIA

Przed przystąpieniem do przygotowania próbek, patrz rozdział „**OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI**” w niniejszej instrukcji używania.

Przygotowanie odczynnika roboczego

Roztwory etanolu (70%, 85% oraz 100%)

Przygotować rozcieńczenia (v/v) 70% oraz 85% etanolu, stosując 100% etanol oraz oczyszczoną wodę. Przygotowane w ten sposób roztwory przechowywać w temperaturze pokojowej w szczelnie zamkniętych pojemnikach. Roztwór podstawowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmutowania lub zanieczyszczenia roztworu. Rozcieńczenia w kominkach do barwienia można stosować przez okres maksymalnie jednego tygodnia, chyba że doszło do wyparowania, rozcieńczenia lub zmutowania roztworu na skutek wielokrotnego użycia.

Roztwór 20X SSC

Rozpuścić 66 g soli 20X SSC w 200 mL oczyszczonej wody w odpowiednim naczynku. Zmierzyć pH w temperaturze pokojowej za pomocą pehametru i doprowadzić je do wartości $5,3 \pm 0,2$, stosując 12 N HCl, jeśli zajdzie taka potrzeba. Przebrać roztwór do cylindra miarowego i dodać wodę oczyszczoną do uzyskania końcowej objętości wynoszącej 250 mL. Wymieszać i przefiltrować przygotowany w ten sposób roztwór przez filtr o wielkości porów wynoszącej 0,45 μm . Przygotowany roztwór podstawowy przechowywać w temperaturze pokojowej. Roztwór podstawowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmutowania lub zanieczyszczenia roztworu.

Roztwór 2X SSC

Dokładnie wymieszać 100 mL roztworu 20X SSC z 850 mL oczyszczonej wody w odpowiednim naczynku. Używając pehametru, zmierzyć pH w temperaturze pokojowej, aby stwierdzić, czy wartość pH mieści się w zakresie $7,0 \pm 0,2$. Jeśli to konieczne, zmodyfikować wartość pH przy użyciu 1N lub 2N wodorotlenku sodu. Dodać oczyszczoną wodę do uzyskania końcowej objętości 1 litra. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów wynoszącej 0,45 μm . Przygotowany roztwór podstawowy przechowywać w temperaturze pokojowej. Roztwór podstawowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmutowania lub zanieczyszczenia roztworu. Roztwór używany w badaniu wymieniać po każdym dniu pracy.

Roztwór do denaturacji (roztwór 70% formamidu/2X SSC)

Dokładnie wymieszać 49 mL formamidu, 7 mL roztworu 20X SSC oraz 14 mL oczyszczonej wody. Zmierzyć pH w temperaturze pokojowej, używając pasków do pomiaru pH, aby stwierdzić, czy wartość pH mieści się w zakresie od 7,0 do 8,0. Przechowywać przygotowany roztwór podstawowy w temp. 2 do 8 °C. Przed każdym użyciem sprawdzić, czy wartość pH mieści się w zakresie od 7,0 do 8,0, stosując paski do pomiaru pH. Roztwór wylać po upływie jednego tygodnia.

Roztwór płuczący 0,4X SSC/0,3% NP-40

Dokładnie wymieszać 20 mL roztworu 20X SSC z 950 mL oczyszczonej wody w odpowiednim naczynku. Dodać 3 mL NP-40 i dokładnie wymieszać aż do całkowitego rozpuszczenia NP-40. Przy pomocy pehametru zmierzyć pH w temperaturze pokojowej i doprowadzić je do wartości $7,4 \pm 0,1$ przy użyciu 1 N lub 2 N wodorotlenku sodu. Dodać oczyszczoną wodę do uzyskania końcowej objętości 1 litra. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów wynoszącej 0,45 μm . Przygotowany roztwór podstawowy przechowywać w temperaturze pokojowej. Roztwór podstawowy wylać

po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmutowania lub zanieczyszczenia roztworu. Roztwór używany w badaniu wymieniać po każdym dniu pracy.

Roztwór płuczący 2X SSC/0,1% NP-40

Dokładnie wymieszać 100 mL roztworu 20X SSC z 850 mL oczyszczonej wody w odpowiednim naczynku. Dodać 1 mL NP-40 i dokładnie wymieszać aż do całkowitego rozpuszczenia NP-40. Przy pomocy pehametru zmierzyć pH w temperaturze pokojowej i doprowadzić je do wartości $7,0 \pm 0,2$ przy użyciu 1 N lub 2 N wodorotlenku sodu. Dodać oczyszczoną wodę do uzyskania końcowej objętości 1 litra. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów wynoszącej 0,45 μm . Przygotowany roztwór podstawowy przechowywać w temperaturze pokojowej. Roztwór podstawowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmutowania lub zanieczyszczenia roztworu. Roztwór używany w badaniu wymieniać po każdym dniu pracy.

Pobieranie próbek i ich transport

Krew obwodowa powinna być pobrana zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danym laboratorium. Podręcznik „AGT Cytogenetics Laboratory Manual” zawiera zalecenia dotyczące pobierania i przetwarzania próbek.²² Zgodnie z tymi wytycznymi dopuszcza się pobieranie próbek krwi obwodowej do próbki zawierającej heparynę sodu. Do wykonania oznaczenia wymagana jest objętość jednego (1) mL krwi obwodowej. Próbkę można przetwarzać od razu lub transportować na woreczkach z lodem oraz przechowywać w temp. 2 do 8 °C przez maksymalnie 96 godzin przed rozpoczęciem etapu przygotowywania próbek. Próbkę nigdy nie wolno umieszczać w lodzie ani zamrażać. Nie należy stosować próbek, w których doszło do utworzenia się skrzepów lub które nie były transportowane w podanych warunkach.

Przetwarzanie próbek

UWAGA: Utrwalacz (metanol:lodowaty kwas octowy, 3:1 lub 2:1) należy przygotowywać codziennie.

1. Dodać 1 mL krwi obwodowej do stożkowej próbki wirówkowej o poj. 15 mL.
2. Powoli dodawać 10 mL 0,075 M KCl. Delikatnie wymieszać, odwracając próbkę kilka razy do góry dnem. Opcjonalnie: Inkubować próbkę(i) przez 10 do 20 minut w temperaturze pokojowej lub w temp. 37 °C.
3. Powoli dodawać 2 mL utrwalacza do zawiesiny komórek. Delikatnie wymieszać, odwracając próbkę kilka razy do góry dnem.
4. Wirować przez 8 do 12 minut przy wartości 1000 do 1200 obr./min. (225 do 250 x g).
5. Zlać i wyrzucić supernatant do poziomu ok. 0,5 do 1,0 mL powyżej osadu komórkowego, uważając, by go nie naruszyć. Ponownie rozproszyc osad, delikatnie potrząsając próbką.
6. Powoli dodawać 10 mL utrwalacza do zawiesiny komórek. Wymieszać, odwracając próbkę kilka razy do góry dnem.
7. Wirować przez 8 do 12 minut przy wartości 1000 do 1200 obr./min. (225 do 250 x g).
8. Powtórzyć płukanie z użyciem utrwalacza (kroki 5. do 7.) jeszcze dwa razy lub do czasu, aż utrwalacz będzie klarowny.
9. Ponownie rozproszyc osad komórkowy w utrwalaczu. Dopasować objętość zawiesiny, aby gęstość komórek była odpowiednia do przygotowania preparatu. W razie potrzeby przygotować szkiełko, aby zweryfikować gęstość komórek.
10. Pozostawić próbkę w utrwalaczu w temperaturze pokojowej (15 do 30 °C) na co najmniej 10 minut przed rozpoczęciem przygotowywania preparatu.
11. Rozpocząć etap przygotowywania preparatu lub, w razie potrzeby, utrwalić osad przechowywać w temp. -20 °C (± 5 °C) przez maksymalnie 24 miesiące. W razie potrzeby, szczególnie w przypadku przechowywania przez dłuższy okres czasu, przemyc osad utrwalaczem przed przystąpieniem do przygotowywania preparatu.

Przygotowanie preparatu

12. W celu uzyskania optymalnych wyników można użyć komory do suszenia preparatów cytogenetycznych. Podgrzać urządzenie do temp. 20 do 30 °C przy względnej wilgotności wynoszącej 30 do 50%. Jeśli komora do suszenia preparatów cytogenetycznych nie jest dostępna, można zastosować inne metody w celu uzyskania optymalnej temperatury i wilgotności do przygotowania docelowego preparatu.
13. Każde szkiełko odpowiednio oznakować.

14. Przed przygotowaniem preparatu upewnić się, czy próbka jest odpowiednio wymieszana. Przy użyciu pipety jednomiarowej odmierzyć 5 do 25 μL zawiesiny komórek na lewą połowę odtłuszczonego szkiełka mikroskopowego oraz 5 do 25 μL zawiesiny komórek na prawą połowę szkiełka, tworząc dwa obszary hybrydyzacyjne. Preparat pozostawić do wyschnięcia na powietrzu.
15. Przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego obliczyć ilość jąder interfazowych w każdym polu przy małym powiększeniu (obiektyw powiększający 10-krotnie). W celu uzyskania optymalnych wyników badania przy małym powiększeniu w każdym polu powinno się uzyskać co najmniej 100 komórek. Doprowadzić do uzyskania odpowiedniej gęstości preparatu w celu uzyskania zalecanej liczby jąder interfazowych.
UWAGA: Optymalnie przygotowana próbka będzie zawierała znikome ilości resztek komórkowych i/lub cytoplazmy lub nie będzie ich w ogóle zawierać. Jądra powinny być widoczne jako ciemne, szare, płaskie obiekty bez załamań. W celu uzyskania optymalnej morfologii jąder należy dopasować odpowiednią temperaturę, wilgotność oraz objętość.
16. Preparaty prażyć w temp. 90 °C przez 10 minut (opcjonalnie).

Przygotowanie próbki docelowej

UWAGA: Rozpocząć procedurę ręcznej denaturacji sondy przed przejściem do kroku 19. opisanego w tym rozdziale, aby zapewnić wystarczającą ilość czasu na rozmrożenie materiałów.

17. Przebrać roztwór do denaturacji oraz roztwór 2X SSC do osobnych kominków lub wyjąć uprzednio przygotowany roztwór do denaturacji z lodówki (2 do 8 °C).
18. Wstawić kominek(i) do barwienia zawierający(e) roztwór do denaturacji do łaźni wodnej. Podgrzewać, aż temperatura roztworu do denaturacji wyniesie $73 \pm 1^\circ\text{C}$.
19. Wstawić kominek(i) do barwienia zawierający(e) roztwór 2X SSC do łaźni wodnej. Podgrzewać do temp. $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Pozostawić preparaty z próbką w roztworze 2X SSC na 30 minut w temp. $37 \pm 1^\circ\text{C}$, aby mogły dojrzeć. Ewentualnie preparaty można pozostawić w roztworze 2X SSC na 2 minuty w temp. $73^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, aby mogły dojrzeć.
UWAGA: Sprawdzić temperaturę roztworów przy użyciu skalibrowanego termometru. W każdym kominku do barwienia nie należy zanurzać więcej niż 4 preparatów równocześnie.
20. Wyjąć preparaty z roztworu 2X SSC, a następnie niezwłocznie przenieść je do kominka(ów) do barwienia zawierającego(ych) 70% etanol na co najmniej 1 minutę. Po zanurzeniu preparatów w 70% etanolu zanurzyć je kolejno w 85% etanolu na co najmniej 1 minutę, a następnie w 100% etanolu na co najmniej 1 minutę.
21. Po odwodnieniu w etanolu zanurzyć preparaty w roztworze do denaturacji o temp. $73 \pm 1^\circ\text{C}$ na 5 minut. Rozpocząć odmierzanie czasu w chwili, gdy ostatni preparat zostanie umieszczony w kominku do barwienia.
UWAGA: Aby utrzymać właściwą temperaturę roztworu do denaturacji, należy denaturować 4 preparaty równocześnie. Jeśli preparatów jest mniej niż 4, należy dołożyć pustych szkiełek o temperaturze pokojowej tak, aby razem było ich 4.
22. Wyjąć preparaty z roztworu do denaturacji, a następnie niezwłocznie przenieść je do kominka do barwienia zawierającego 70% etanol na co najmniej 1 minutę. Po zanurzeniu preparatów w 70% etanolu zanurzyć je kolejno w 85% etanolu na co najmniej 1 minutę, a następnie w 100% etanolu na co najmniej 1 minutę.
UWAGA: Zostawić preparaty w 100% etanolu do momentu, w którym będzie możliwe wysuszenie wszystkich preparatów i nałożenie mieszaniny sondy.

Denaturacja sondy

23. Wyjąć uprzednio opracowane mieszaniny sond z miejsca przechowywania i odstawić odczynniki do osiągnięcia temperatury pokojowej.
24. Sondy poddać wirowaniu przez 2 do 3 sekund. Wytrząsnąć na worteksie, a następnie ponownie krótko odwirować.
25. Umieścić próbówki w temp. $73 \pm 1^\circ\text{C}$ na 5 minut.
26. Probówki poddać wirowaniu przez 2 do 3 sekund.
27. Umieścić próbówki na płycie grzejnej rozgrzanej do temp. 45 do 50 °C do momentu, w którym będzie możliwe nałożenie sondy na docelową próbkę.
UWAGA: Jeśli preparaty z badanym materiałem są gotowe, gdy sondy są poddawane denaturacji, należy niezwłocznie nanieść sondy na obszary hybrydyzacyjne na preparacie.

Hybrydyzacja

28. Wyjąć preparaty z próbkami ze 100% etanolu.
29. Wysuszyć preparaty, opierając dolną krawędź każdego szkiełka na ręczniku papierowym (lub odpowiedniku) i wycierając do sucha spód szkiełka (strona, która nie zawiera materiału badanego).
30. Przenieść preparaty na płytę grzejną o temp. 45 do 50 °C na maksymalnie 2 minuty dla odparowania resztek etanolu.
31. Przy użyciu pipety mikrolitrowej nałożyć 10 μL mieszaniny sondy Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen na jeden obszar docelowy i natychmiast nałożyć szkiełko nakrywkowe, nie wprowadzając pęcherzyków powietrza. Powtórzyć procedurę dla mieszaniny sond Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/CEP 12 SpectrumGreen.
32. Uszczelnąć szkiełko nakrywkowe, używając strzykawki napełnionej klejem kauczukowym.
33. Umieścić preparaty w nagrzaną komorze wilgotnej, szczelnie zamknąć, a następnie inkubować w temp. $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ przez 6 do 24 godzin. Ewentualnie można zastosować ciepłąkę z nawilżeniem o temp. 37°C .

Procedura płukania

34. Wlać odpowiednią ilość roztworów 0,4X SSC/0,3% NP-40 oraz 2X SSC/0,1% NP-40 do osobnych kominków do barwienia aż do przykrycia preparatów. Wstawić kominek(i) do barwienia zawierający(e) 0,4X SSC/0,3% NP-40 do łaźni wodnej. Podgrzewać do momentu, aż temperatura roztworu 0,4X SSC/0,3% NP-40 wyniesie $73 \pm 1^\circ\text{C}$. Sprawdzić temperaturę roztworu przy użyciu skalibrowanego termometru. Stosować 2X SSC/0,1% NP-40 o temperaturze pokojowej. Roztworów używać wyłącznie przez 1 dzień, a następnie wylać.
35. Usunąć szkiełka nakrywkowe z preparatu i natychmiast zanurzyć preparat w 0,4X SSC/0,3% NP-40. Potrząsać preparatami znajdującymi się wewnątrz kominka do barwienia przez 1 do 3 sekund. Powtórzyć proces z innymi szkiełkami, tak aby razem było ich 4. Rozpocząć odmierzanie czasu w momencie zanurzenia czwartego szkiełka.
UWAGA: Dla utrzymania właściwej temperatury roztworu 0,4X SSC/0,3% NP-40 należy płukać cztery preparaty równocześnie. Jeśli preparatów jest mniej niż cztery, należy dołożyć pustych szkiełek o temperaturze pokojowej tak, aby razem było ich cztery.
36. Wyjąć preparaty po upływie 2 minut ± 30 sekund.
37. Zanurzyć preparat(y) w kominku do barwienia zawierającym 2X SSC/0,1% NP-40. Potrząsać preparat(ami) znajdującym(i) się wewnątrz kominka do barwienia przez 1 do 3 sekund.
38. Po zanurzeniu preparatu(ów) przez 5 do 60 sekund wyjąć go(je) z 2X SSC/0,1% NP-40.

UWAGA: Przeprowadzając procedurę płukania dalszych szkiełek, upewnić się, że przez rozpoczęciem płukania temperatura roztworu 0,4X SSC/0,3% NP-40 wynosi $73 \pm 1^\circ\text{C}$.

Procedura barwienia kontrastowego

39. Wysuszyć preparaty, opierając dolną krawędź każdego szkiełka na ręczniku papierowym (lub odpowiedniku) i wycierając do sucha spód szkiełka (strona, która nie zawiera materiału badanego).
40. Preparaty suszyć na powietrzu w ciemności, ustawione pod kątem, maksymalnie przez 2 godziny, aby ułatwić parowanie i uniknąć gromadzenia się 2X SSC/0,1% NP-40.
41. Wyjąć barwnik kontrastowy DAPI II z miejsca przechowywania i odstawić do osiągnięcia temperatury pokojowej.
42. Barwnik kontrastowy DAPI II wytrząsnąć na worteksie przez 2 do 3 sekund.
43. Probówkę poddać wirowaniu przez 2 do 3 sekund.
44. Przy użyciu pipety mikrolitrowej nanieść 10 μL barwnika kontrastowego DAPI II na każdy obszar docelowy preparatu, a następnie nałożyć szkiełko nakrywkowe. Powtórzyć ww. czynności dla każdego szkiełka.
45. Przed rozpoczęciem obserwacji pod mikroskopem odczekać co najmniej 10 minut.

Procedura przechowywania

Preparaty poddane hybrydyzacji przechowywać w temp. $-20^\circ\text{C} (\pm 5^\circ\text{C})$ bez dostępu światła. W tych warunkach preparaty mogą być przechowywane nie dłużej niż 3 tygodnie po nałożeniu barwnika kontrastowego DAPI II bez znaczącej utraty intensywności sygnału fluorescencyjnego.

Ocena preparatów

Oglądać preparaty przy użyciu odpowiedniego zestawu filtrów w optymalnie ustawionym mikroskopie fluorescencyjnym. Podane poniżej zestawy filtrów optycznych pozwolą na wizualizację fluoroforów użytych podczas hybrydyzacji.

Użycie filtra Vysis (lub odpowiednika)...	pozwala na wzbudzenie i emisję fluoroforów...
Single Band Green	fluoroforu zielonego (SpectrumGreen)
Single Band Aqua	fluoroforu jasnoniebieskiego (SpectrumAqua)
Single Band Orange	fluoroforu pomarańczowego (SpectrumOrange)
Single DAPI	DAPI
Dual Band Green/Orange Filter v2	fluoroforu pomarańczowego (SpectrumOrange) i zielonego (SpectrumGreen)

Rutynowa ocena preparatów i liczenie sygnałów wykonywane jest przy użyciu filtra dwupasmowego (Dual Band). Jeśli w danym jądrze sygnał(y) emitowany(e) przez określoną sondę jest(są) słabo widoczny(e) podczas oględzin z użyciem filtra dwupasmowego, zaleca się stosowanie jednopasmowego filtra, aby ułatwić liczenie.

Interpretacja i podawanie wyników

Kontrola jakości

Sondy zawarte w zestawie Vysis CLL FISH Probe Kit pełnią funkcję wewnętrznych kontroli. Obecność co najmniej jednego sygnału hybrydyzacyjnego dla sond w każdej mieszaninie sond oznacza, że sondy działają prawidłowo w warunkach przeprowadzania oznaczenia, z wyjątkiem nullisomii D13S319, gdy obie kopie obszaru docelowego D13S319 ulegają delecji. Sonda LSI 13q34 SpectrumAqua pełni funkcję kontroli statusu delecji D13S319, rozróżnienia mieszaniny sond oraz ogólnej jakości hybrydyzacji.

Ocena jakości obszaru docelowego

Ocenę jakości hybrydyzacji do obszaru docelowego przeprowadza się na podstawie podanych poniżej kryteriów. Jeśli kryteria te nie są spełnione, nie powinno się oceniać takiego preparatu.

- Morfologia jąder komórkowych:** Granice jąder komórkowych powinny być wyraźne, a struktura jąder nienaruszona.
- Tło:** Tło powinno być ciemne lub czarne i stosunkowo wolne od fluorujących cząsteczek czy zamglenia.
- Intensywność sygnału sondy:** Sygnały powinny być jasne, zwarte, okrągłe lub owalne, wyraźne i łatwe do oceny.

Potwierdzenie obszaru docelowego sondy

Bezpośrednio przed rozpoczęciem liczenia sygnałów dla każdego obszaru hybrydyzacyjnego należy stwierdzić i zapisać obecność lub brak jasnoniebieskich sygnałów w obszarze hybrydyzacyjnym przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego z systemem epiiluminacji wyposażonego w obiektyw powiększający 60/63-krotnie lub 100-krotnie. Czynność ta spełnia rolę kontroli jakości, mającej na celu upewnienie się, czy na obszar hybrydyzacyjny naniesiono prawidłową sondę i czy doszło do prawidłowej hybrydyzacji typu LSI, nawet jeśli brak jest obu kopii obszaru docelowego sondy Vysis LSI D13S319 Probe (brak pomarańczowych sygnałów). Sygnał jasnoniebieski będzie obecny wyłącznie w obszarze hybrydyzacyjnym sondy Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/CEP 12 SpectrumGreen Probe, przy zachowaniu odpowiednich warunków hybrydyzacji. W obszarze hybrydyzacyjnym sondy Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen Probe nie powinno być żadnych sygnałów jasnoniebieskich.










Liczenie sygnałów

Używając właściwych filtrów wymienionych powyżej, dwie osoby oceniające określają i zapisują obecne wzory sygnałów w każdym ze 100 jąder w obu obszarach hybrydyzacyjnych. Pierwsza osoba liczy jądra na jednej połowie obszaru docelowego hybrydyzacji (możliwie jak najdokładniej), zaś druga osoba liczy jądra na drugiej połowie obszaru docelowego hybrydyzacji (możliwie jak najdokładniej). Patrz Tabela 1. Wskazówki dotyczące liczenia sygnałów dwukolorowych.

- Wybierać tylko nienaruszone jądra, które nie są zagięte, nie nachodzą na siebie lub których liczenie nie jest utrudnione przez obecność resztek komórkowych.

- Unikać liczenia preparatów lub obszarów na preparatach, w których doszło do nadmiernej nieswoistej hybrydyzacji lub które zawierają wiele jąder ze zbyt małą ilością sygnałów lub bez sygnałów.
- Unikać liczenia jąder zawierających zlepy lub skupiska sygnałów.
- Stykające się sygnały tego samego koloru bez względu na ich rozmiar liczy się jako jeden sygnał. Jeśli oddalone od siebie sygnały są ze sobą połączone niewielkim pasmem sygnału, sygnały te liczy się również jako jeden sygnał.
- Jeśli w danym obszarze przerwy pomiędzy sygnałami tego samego koloru nie są większe niż szerokość sygnału, należy liczyć je jako jeden sygnał. Jednakże jeśli dwa sygnały tego samego koloru są wyraźne, zwarte, mają taki sam rozmiar i intensywność, są wyraźnie oddzielone i nie jest widoczne żadne łączące je pasmo sygnału, należy liczyć je jako dwa sygnały, mimo iż odstęp między sygnałami jest mniejszy niż szerokość sygnału.
- Sygnały tego samego koloru mogą posiadać różną intensywność w danym jądrze. A zatem konieczne może być użycie odpowiedniego filtra jednopasmowego i/lub wyregulowanie płaszczyzny ogniskowej.
- Jeśli pojawią się jakiegokolwiek wątpliwości, czy liczyć daną komórkę, takiej komórki nie należy uwzględniać w obliczeniach.

Tabela 1. Wskazówki dotyczące liczenia sygnałów dwukolorowych

Legenda:		
		= zielony
		= pomarańczowy
1		Jeśli jądra nachodzą na siebie, nie liczyć.
2		Liczyć jako dwa sygnały pomarańczowe i dwa sygnały zielone. Jeden sygnał pomarańczowy jest rozmyty.
3		Liczyć jako dwa sygnały pomarańczowe i dwa sygnały zielone. Jeden sygnał pomarańczowy jest rozszczepiony.
4		Liczyć jako jeden sygnał pomarańczowy i dwa sygnały zielone. Jeden sygnał zielony jest rozszczepiony i sygnał pomarańczowy jest rozszczepiony.
5		Liczyć jako dwa sygnały pomarańczowe i jeden sygnał zielony.
6		Obszar sygnału zaznaczony przerywaną linią. Brak odstępów między sygnałami w górnym obszarze większych niż szerokość nienaruszonego zielonego sygnału; górny sygnał liczyć jako jeden sygnał zielony. Liczyć jako 2 sygnały pomarańczowe i 2 sygnały zielone.
7		Oba blisko siebie położone sygnały pomarańczowe są zwarte i posiadają tę samą intensywność i rozmiar. Liczyć jako dwa sygnały pomarańczowe i dwa sygnały zielone.

Po zapisaniu wyników liczba nietypowych wzorów sygnałów uzyskanych przez każdą osobę jest poddawana ocenie, a następnie wykonuje się poniższe czynności, aby uzyskać końcowy wynik dla 200 jąder. Patrz Rycina 1. przedstawiająca zasady zestawiania wyników i rolę trzeciej osoby oraz Tabela 2. i 3. zawierające wartości punktu odcięcia warunkujące włączenie trzeciej osoby do liczenia nietypowych wzorów sygnałów.

Określanie potrzeby włączenia trzeciej osoby

Liczba nieprawidłowych wzorów sygnałów pomarańczowych i zielonych uzyskana przez każdą osobę oceniającą jest poddawana ocenie i porównywana z wartościami punktu odcięcia przedstawionymi w Tabeli 2. oraz Tabeli 3.

Tabela 2. Wartości punktu odcięcia próbek prawidłowych dla określenia konieczności włączenia trzeciej osoby do liczenia sygnałów sondy Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen Probe

Sonda/Kolor	Nieprawidłowy wzór	Punkt odcięcia na 100 jąder	Nieprawidłowość
Vysis LSI TP53 SpectrumOrange	1 sygnał pomarańczowy (1R) ^a	7	17p-
Vysis LSI ATM SpectrumGreen	1 sygnał zielony (1G) ^b	6	11q-

^a Nieprawidłowy wzór sygnałów dla delecji TP53 to 1R. Dowolny wzór zawierający pojedynczy sygnał pomarańczowy (R), bez względu na liczbę sygnałów zielonych (G), uważany jest za wzór nieprawidłowy wskazujący na delecję TP53.

^b Nieprawidłowy wzór sygnałów dla delecji genu ATM to 1G. Dowolny wzór zawierający pojedynczy sygnał zielony (G), bez względu na liczbę sygnałów pomarańczowych (R), uważany jest za wzór nieprawidłowy wskazujący na delecję ATM.

Tabela 3. Wartości punktu odcięcia próbek prawidłowych dla określenia konieczności włączenia trzeciej osoby do liczenia sygnałów sondy Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/CEP 12 SpectrumGreen Probe

Sonda/Kolor	Nieprawidłowy wzór	Punkt odcięcia na 100 jąder ^c	Nieprawidłowość
Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange	1 sygnał pomarańczowy (1R) ^a	5,5	13q- (monosomia)
Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange	zero sygnałów pomarańczowych (0R) ^a	1,5	13q- (nullisomia)
Vysis CEP 12 SpectrumGreen	3 sygnały zielone (3G) ^b	2,5	+12

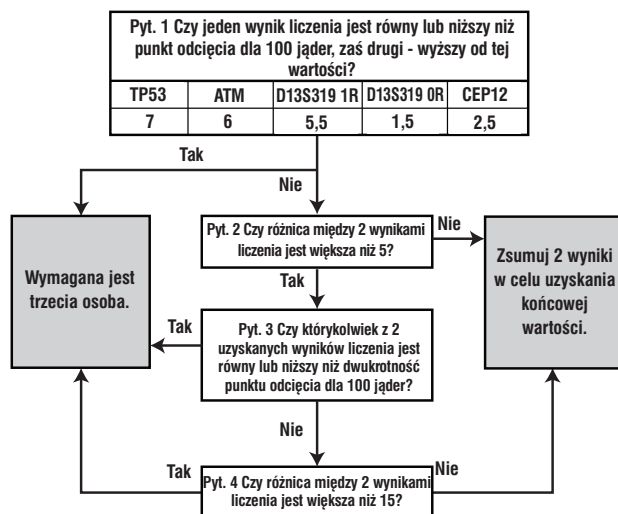
^a Nieprawidłowe wzory sygnałów dla delecji D13S319 to 1R (monosomia) lub 0R (nullisomia). Dowolny wzór zawierający sygnał 1R lub 0R, bez względu na liczbę sygnałów zielonych (G) uważany jest za wzór nieprawidłowy wskazujący na delecję D13S319.

^b Nieprawidłowy wzór sygnałów dla powielenia CEP 12 to 3G (trisomia). Dowolny wzór zawierający sygnały 3G, bez względu na liczbę sygnałów pomarańczowych (R) uważany jest za wzór nieprawidłowy wskazujący na powielenie CEP 12.

^c Wartość stanowi połowę punktu odcięcia dla próbek prawidłowych dla 200 jąder (patrz Tabela 4. oraz 5.).

Patrz Rycina 1. zawierająca opis zasad określania potrzeby włączenia trzeciej osoby.

Rycina 1. Zasady zestawiania wyników liczenia i rola trzeciego technika dla każdego nieprawidłowego wzoru sygnałów



Aby określić, czy istnieje potrzeba włączenia trzeciej osoby, należy zastosować zasady liczenia osobno dla każdego znacznika sondy.

Wynik liczenia uzyskany przez trzecią osobę jest wykorzystywany wyłącznie dla określonego znacznika sondy, który wymaga udziału trzeciej osoby. Określenie, czy uzyskany wzór sygnałów jest prawidłowy czy nieprawidłowy dla pozostałych znaczników sondy, odbywa się na podstawie zliczeń wykonanych przez pierwsze dwie osoby.

Trzecia osoba dokonuje zliczenia dla 100 jąder w obrębie obszaru docelowego hybrydyzacji, jeśli ma miejsce jeden z poniższych przypadków:

- Liczba nieprawidłowych wzorów sygnałów uzyskana przez jedną osobę jest równa lub niższa niż punkt odcięcia dla 100 jąder, zaś liczba zliczeń uzyskana przez drugą osobę jest wyższa od tej wartości.
- Różnica między liczbą nieprawidłowych wzorów zliczonych przez dwie osoby wynosi więcej niż 5 dla 100 ocenianych jąder, zaś liczba nieprawidłowych wzorów sygnałów uzyskana przez którąkolwiek z tych osób jest mniejsza niż lub równa dwukrotności punktu odcięcia.
- Różnica między liczbą nieprawidłowych wzorów sygnałów uzyskaną przez obie osoby jest większa niż 15 na 100 ocenianych jąder.

Wyniki

Liczyby zaobserwowanych wzorów sygnałów pomarańczowych i zielonych uzyskane przez każdą z dwóch osób są sumowane, dając w ten sposób liczbę zliczeń dla 200 jąder dla każdej badanej próbki. Gdy w celu uzupełnienia oceny włączona zostaje trzecia osoba, sumuje się dwa najbardziej zbliżone do siebie wyniki w celu uzyskania liczby zliczeń dla 200 jąder. Jeśli różnica pomiędzy dowolnymi dwoma wynikami a trzecim wynikiem jest taka sama, wartość mediany zostaje podwojona i stanowi uzyskany wynik zliczeń dla 200 jąder.

Interpretacja wyników

Określenie prawidłowości/nieprawidłowości wzoru

Daną próbkę uznaje się za prawidłową lub nieprawidłową poprzez porównanie liczby jąder z zaobserwowanymi nieprawidłowymi wzorami na 200 ocenianych jąder z podaną wartością punktu odcięcia (Tabela 4 oraz Tabela 5). Jeśli liczba jąder z określonym nieprawidłowym wzorem przekracza podaną wartość punktu odcięcia, uzyskany wynik jest nieprawidłowy. Jeśli liczba takich jąder jest mniejsza niż lub równa podanej wartości punktu odcięcia, uzyskany wynik jest prawidłowy.

Tabela 4. Wartości punktu odcięcia dla określania prawidłowości/nieprawidłowości próbki dla sondy Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen Probe

Sonda	Nieprawidłowy wzór	Wartość punktu odcięcia dla 200 jąder (%)	Nieprawidłowość
Vysis LSI TP53 SpectrumOrange	1 sygnał pomarańczowy (1R)	14 (7,0%)	17p-
Vysis LSI ATM SpectrumGreen	1 sygnał zielony (1G)	12 (6,0%)	11q-

Tabela 5. Wartości punktu odcięcia dla określania prawidłowości/nieprawidłowości próbki dla sondy Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/CEP 12 SpectrumGreen Probe

Sonda	Nieprawidłowy wzór	Wartość punktu odcięcia dla 200 jąder	Nieprawidłowość
Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange	1 sygnał pomarańczowy (1R)	11 (5,5%)	13q- (monosomia)
Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange	zero sygnałów pomarańczowych (0R)	3 (1,5%)	13q- (nullisomia)
Vysis CEP 12 SpectrumGreen	3 sygnały zielone (3G)	5 (2,5%)	+12

Klasyfikacja Döhnera

Patrz **Tabela 6** przedstawiająca **klasyfikację Döhnera** każdej badanej próbki na podstawie wykrytych nieprawidłowości.⁵

Tabela 6. Klasyfikacja Döhnera

13q- (monosomia lub nullisomia) jako jedyna nieprawidłowość

brak nieprawidłowości cytogenetycznych

+12 bez 17p- lub 11q-

11q- bez 17p-

17p-

Określanie kategorii prognostycznych

Patrz Tabela 7, aby określić kategorię prognostyczną (zgodnie z aktualnymi wytycznymi NCCN¹⁶) każdej badanej próbki.

Tabela 7. Określanie kategorii prognostycznych

Nieprawidłowość cytogenetyczna	Kategoria prognostyczna
del(11q)	niekorzystne rokowanie
del(17p)	niekorzystne rokowanie
prawidłowa	neutralne rokowanie
+12	neutralne rokowanie
del(13q) (jako jedyna nieprawidłowość)	korzystne rokowanie

OGRANICZENIA PROCEDURY

- Zestaw sond Vysis CLL FISH Probe Kit jest przeznaczony do stosowania wraz z wynikami oznaczeń dodatkowych biomarkerów, wynikami badań morfologicznych oraz innymi danymi klinicznymi.
- Mogą pojawić się też inne wzory sygnałów. Przy ich interpretacji przydatna może być analiza metafaz.
- Jeśli dla danej próbki uzyskano słaby nieprawidłowy wzór znakowania FISH, należy użyć odpowiedniego filtra jednopasmowego w celu potwierdzenia uzyskanego wzoru. Niezastosowanie się do tego zalecenia może spowodować niedokładną identyfikację wzorów sygnałów.

SZCZEGÓŁOWA CHARAKTERYSTYKA DZIAŁANIA

Swoistość analityczna

Swoistość analityczna zdefiniowana jest jako odsetek sygnałów emitowanych przez sondy, które hybrydują do właściwego *locus* i nie hybrydują do żadnego innego miejsca. Test ten pozwala wzmocnić, czy każda sonda hybryduje swoiście do oczekiwanego miejsca na chromosomie. Swoistość analityczna sond w zestawie Vysis CLL FISH Probe Kit w odniesieniu do ich docelowych *loci* chromosomowych została wyznaczona z użyciem chromosomów metafazowych przygotowanych z hodowli krwi obwodowej, umieszczonych na szkiełkach mikroskopowych, uzyskanych od pięciu mężczyzn o prawidłowym kariotypie. Lokalizacja hybrydyzacji każdego sygnału FISH na chromosomach 20 kolejnych jąder metafazowych na każdym z 5 szkiełek została oceniona przez jedną osobę dla 200 docelowych *loci*.

Dla każdej sondy i badanej próbki zliczono liczbę sygnałów FISH w chromosomach metafazowych emitowanych przez sondy, które hybrydowały do prawidłowego *locus*, oraz liczbę sygnałów FISH w chromosomach metafazowych emitowanych przez sondy, które hybrydowały do nieprawidłowego *locus*. Swoistość każdej sondy została obliczona jako liczba sygnałów FISH w chromosomach metafazowych emitowanych przez sondy, które hybrydowały do prawidłowego *locus*, podzielona przez całkowitą liczbę sygnałów FISH w chromosomach metafazowych emitowanych przez hybrydujące sondy oraz pomnożona przez 100 w celu uzyskania wartości procentowej.

Swoistość analityczna każdej sondy w zestawie Vysis CLL FISH Probe Kit wyniosła 100% (200/200) (patrz Tabela 8).

Tabela 8. Swoistość analityczna

Sonda	Prawidłowa cytogenetyczna sekwencja docelowa	Liczba sygnałów w chromosomach metafazowych		Swoistość (%)	Przedział ufności 95%
		Hybrydyzacja do prawidłowego docelowego locus	Łączna liczba sygnałów po hybrydyzacji		
Vysis LSI TP53 SpectrumOrange	17p13.1	200	200	100	(98,17, 100)
Vysis LSI ATM SpectrumGreen	11q22.3	200	200	100	(98,17, 100)
Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange	13q14.3	200	200	100	(98,17, 100)
Vysis LSI 13q34 SpectrumAqua	13q34	200	200	100	(98,17, 100)
Vysis CEP 12 SpectrumGreen	12p11.1-q11	200	200	100	(98,17, 100)

Czułość analityczna

Czułość analityczna zdefiniowana jest jako odsetek nadających się do oceny jąder interfazowych, dla których uzyskano oczekiwany prawidłowy wzór sygnałów. Oczekiwanym prawidłowym wzorem sygnałów dla wszystkich sond z zestawu Vysis CLL FISH Probe Kit są 2 sygnały dla każdego jądra.

Czułość analityczna sond w zestawie Vysis CLL FISH Probe Kit w odniesieniu do ich docelowych *loci* chromosomowych została wyznaczona z użyciem jąder interfazowych przygotowanych z hodowli krwi obwodowej uzyskanej od 25 pacjentów o prawidłowym kariotypie. Dla każdej próbki wzory sygnałów dla 200 badanych jąder zostały ocenione poprzez zliczanie sygnałów pomarańczowych i zielonych obecnych w każdym obszarze docelowym sondy. Każda z osób oceniała 100 jąder w każdej próbce, uzyskując łącznie wynik dla 200 jąder w każdej próbce i 5000 dających się zliczyć jąder pochodzących z prawidłowych próbek.

Czułość (przy przedziałach ufności 95% na podstawie rozkładu dwumianowego) obliczono jako odsetek nadających się do oceny jąder interfazowych, dla których uzyskano oczekiwany wzór 2 sygnałów dla każdego jądra.

W Tabeli 9. pokazano, że zestaw sond Vysis CLL FISH Probe Kit wykazuje czułość na poziomie 97,98% dla sondy LSI TP53 SpectrumOrange, 98,68% dla sondy LSI ATM SpectrumGreen, 98,60% dla sondy LSI D13S319 SpectrumOrange oraz 98,94% dla sondy CEP 12 SpectrumGreen.

Tabela 9. Czułość analityczna

Sonda	Liczba jąder interfazowych		Czułość	
	Z oczekiwanym wzorem sygnałów	Sygnały nadające się do liczenia	Odsetek (%)	Przedział ufności 95%
Vysis LSI TP53 SpectrumOrange	4899	5000	97,98	97,55, 98,35
Vysis LSI ATM SpectrumGreen	4934	5000	98,68	98,32, 98,98
Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange	4930	5000	98,60	98,23, 98,91
Vysis CEP 12 SpectrumGreen	4947	5000	98,94	98,62, 99,21

Analityczna charakterystyka punktu odcięcia dla próbek prawidłowych

Punkt odcięcia wyznaczający próbki prawidłowe w odniesieniu do sond DNA FISH definiuje się jako maksymalny odsetek jąder interfazowych nadających się do oceny o określonym nieprawidłowym wzorze sygnałów, przy którym próbka uważana jest za prawidłową dla danego wzoru sygnałów. Punkt odcięcia wyznaczający próbki prawidłowe wyrażony jest jako odsetek lub rzeczywista liczba nieprawidłowych wzorów sygnałów FISH w odniesieniu do standardowej liczby badanych jąder. Kryteria stosowane do klasyfikacji jądra jako nadającego się do oceny podano w rozdziale „Interpretacja i podawanie wyników” w niniejszej instrukcji używania. Rozdziały „Kontrola jakości” oraz „Liczenie sygnałów”, jak również „Wskazówki dotyczące liczenia sygnałów dwukolorowych” (Tabela 1) zawierają instrukcje, w jaki

sposób określić, czy cały preparat jest odpowiedni do liczenia sygnałów oraz które typy komórek/sygnałów można liczyć.

Punkty odcięcia sygnałów sond z zestawu Vysis CLL FISH Probe Kit dla ich docelowych *loci* chromosomowych zostały wyznaczone z użyciem jąder interfazowych przygotowanych z hodowli krwi obwodowej uzyskanej od 25 pacjentów o prawidłowym kariotypie. Dla każdej próbki wzory sygnałów dla 200 badanych jąder zostały ocenione poprzez zliczanie sygnałów pomarańczowych i zielonych obecnych w każdym obszarze docelowym sondy.

Oczekiwany prawidłowy wzorek sygnałów jąder interfazowych dla wszystkich sond z zestawu Vysis CLL FISH Probe Kit są dwa sygnały w każdym jądrze. Jako że populacja próbek nie pasuje do rozkładu Gaussa, punkt odcięcia próbek prawidłowych obliczono przy użyciu funkcji odwróconej beta.²³

Wykazano, iż dla zestawu sond Vysis CLL FISH Probe Kit wartość punktu odcięcia wynosi 14 na 200 badanych jąder (7,0%) dla sondy LSI TP53 SpectrumOrange (1 sygnał), 12 na 200 badanych jąder (6,0%) dla sondy LSI ATM SpectrumGreen (1 sygnał), 11 na 200 badanych jąder (5,5%) dla sondy LSI D13S319 SpectrumOrange (1 sygnał), 3 na 200 badanych jąder (1,5%) dla sondy LSI D13S319 SpectrumOrange (0 sygnałów) oraz 5 na 200 badanych jąder (2,5%) dla sondy CEP 12 SpectrumGreen (3 sygnały). Patrz Tabela 10.

Tabela 10. Analityczna charakterystyka wartości punktu odcięcia próbek prawidłowych

Sonda (nieprawidłowy wzór sygnałów)	Liczba badanych jąder (n)	Maksymalna liczba wzorów fałszywie dodatnich	Wartość punktu odcięcia próbek prawidłowych (na 200 jąder)	Wartość punktu odcięcia próbek prawidłowych (%)
Vysis LSI TP53 SpectrumOrange (1 sygnał)	200	8	14	7,0 (14/200)
Vysis LSI ATM SpectrumGreen (1 sygnał)	200	6	12	6,0 (12/200)
Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange (1 sygnał)	200	5	11	5,5 (11/200)
Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange (0 sygnałów)	200	0	3	1,5 (3/200)
Vysis CEP 12 SpectrumGreen (3 sygnały)	200	1	5	2,5 (5/200)

Precyzja

Nieprecyzyjność sond w zestawie Vysis CLL Probe Kit wyznaczono przy użyciu jąder interfazowych przygotowanych z 2 osobnych próbek krwi obwodowej nieobciążonych delecją del(17p13.1), del(11q22.3), del(13q14.3) oraz trisomii 12, oraz 8 dodatkowych próbek, spośród których co najmniej 2 wykazywały jedną z podanych nieprawidłowości (badanie precyzji nr 1).

Ten zaślepiony panel 10 próbek składający się zarówno z próbek ujemnych, jak i dodatnich, został użyty do zbadania 3 partii sond Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen oraz Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/CEP 12 SpectrumGreen w ciągu każdego z 2 dni, oraz 1 z 3 partii trzeciego dnia.

Dla każdej próbki wzory sygnałów FISH dla 200 badanych jąder zostały ocenione poprzez zliczanie sygnałów pomarańczowych i zielonych obecnych w każdym obszarze docelowym sondy.

Precyzję przeanalizowano osobno dla każdej próbki na każdą sondę na podstawie odsetka nieprawidłowych komórek o badanym(ch) wzorze(ach) sygnałów.

Zaślepiony panel utworzony z 8 niepowtarzalnych próbek zbadano przy użyciu trzech różnych partii sond DNA FISH w ciągu 3 dni (badanie precyzji nr 2). Przeprowadzono badania precyzji pod kątem wartości punktu odcięcia próbek prawidłowych na podstawie odsetka komórek o badanym wzorze sygnałów oraz przeanalizowano je osobno dla każdej próbki panelu.

Wartość średnią oraz odchylenie standardowe dla zaobserwowanego odsetka nieprawidłowych komórek w próbkach ujemnych, dodatnich oraz próbkach o liczbie sygnałów zbliżonej do punktu odcięcia próbek prawidłowych, uzyskane w badaniu precyzji nr 1 oraz nr 2, przedstawiono w Tabelach 11. do 15.

Tabela 11. Analiza precyzji na podstawie odsetka nieprawidłowych wzorów sygnałów dla sondy Vysis LSI TP53 SpectrumOrange Probe [del(17p13.1)(1 sygnał)]^a

Bada-	Próbka	Kategoria	n	Wartość średnia	Składowa SD pomiędzy partiami	Składowa SD pomiędzy partiami	Całkowite SD ^b
1	1	ujemna	7	2,6	1,23	0,00	1,23
1	2	ujemna	7	2,9	1,58	1,11	1,94
1	3	ujemna	7	3,8	3,48	0,00	3,48
1	4	ujemna	7	3,1	2,00	0,00	2,00
1	5	ujemna	7	2,7	0,76	0,65	1,00
1	6	ujemna	7	2,4	2,90	0,00	2,90
1	7	ujemna	7	2,1	1,38	0,00	1,38
1	8	ujemna	7	2,8	1,29	0,00	1,29
1	9	dodatnia	7	29,8	5,15	4,54	6,87
1	10	dodatnia	7	73,2	5,29	0,00	5,29
2	7	dodatnia ^c	9	13,6	3,11	0,00	3,11
2	8	dodatnia ^c	9	16,9	3,90	0,00	3,90

^a Wartość średnia oraz odchylenia standardowe są przedstawione jako odsetki nieprawidłowych wzorów sygnałów.

^b Całkowita wariancja stanowi sumę pozostałych komponentów wariancyjnych.

^c Próbkę dodatnią zbliżoną do punktu odcięcia dla próbki prawidłowej.

Tabela 12. Analiza precyzji na podstawie odsetka nieprawidłowych wzorów sygnałów dla sondy Vysis LSI ATM SpectrumGreen Probe [del(11q22.3)(1 sygnał)]^a

Bada-	Próbka	Kategoria	n	Wartość średnia	Składowa SD pomiędzy partiami	Składowa SD pomiędzy partiami	Całkowite SD ^b
1	1	ujemna	7	1,6	0,54	0,59	0,80
1	2	ujemna	7	1,8	0,59	0,00	0,59
1	3	ujemna	7	2,6	0,81	1,54	1,74
1	4	ujemna	7	2,1	2,25	1,08	2,50
1	5	ujemna	7	2,9	1,71	1,64	2,37
1	6	ujemna	7	1,1	1,34	0,00	1,34
1	7	dodatnia	7	64,1	3,18	0,00	3,18
1	8	dodatnia	7	13,7	4,31	5,10	6,68
1	9	ujemna	7	1,6	0,99	0,00	0,99
1	10	ujemna	7	1,5	1,51	0,00	1,51
2	1	dodatnia ^c	9	8,4	3,12	0,91	3,25
2	2	dodatnia ^c	9	7,8	3,00	1,89	3,55
2	8	dodatnia ^c	9	18,7	3,46	0,00	3,46

^a Wartość średnia oraz odchylenia standardowe są przedstawione jako odsetki nieprawidłowych wzorów sygnałów.

^b Całkowita wariancja stanowi sumę pozostałych komponentów wariancyjnych.

^c Próbkę dodatnią zbliżoną do punktu odcięcia próbki prawidłowej.

Tabela 13. Analiza precyzji na podstawie odsetka nieprawidłowych wzorów sygnałów dla sondy Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange Probe [del(13q14.3)(1 sygnał)]^a

Bada-	Próbka	Kategoria	n	Wartość średnia	Składowa SD pomiędzy partiami	Składowa SD pomiędzy partiami	Całkowite SD ^b
1	1	ujemna	7	3,5	1,12	1,10	1,57
1	2	ujemna	7	2,2	1,69	0,00	1,69
1	3	dodatnia	7	66,1	6,13	0,00	6,13
1	4	dodatnia	7	20,1	4,88	0,00	4,88
1	5	ujemna	7	0,6	0,83	0,00	0,83
1	6	ujemna	7	0,4	0,64	0,00	0,64
1	7	dodatnia	7	84,9	4,14	0,00	4,14
1	8	ujemna	7	0,6	0,97	0,00	0,97
1	9	ujemna	7	2,3	2,08	0,00	2,08
1	10	dodatnia	7	53,6	8,57	0,00	8,57
2	5	dodatnia ^c	9	5,8	2,49	0,00	2,49
2	6	dodatnia ^c	9	14,9	2,46	1,15	2,72

- ^a Wartość średnia oraz odchylenia standardowe są przedstawione jako odsetki nieprawidłowych wzorów sygnałów.
- ^b Całkowita wariancja stanowi sumę pozostałych komponentów wariancyjnych.
- ^c Próbką dodatnią zbliżoną do punktu odcięcia próbki prawidłowej.

Tabela 14. Analiza precyzji na podstawie odsetka nieprawidłowych wzorów sygnałów dla sondy Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange Probe [del(13q14.3)(0 sygnałów)]^a

Bada- nie	Próbka	Kategoria	n	Wartość średnia	Skladowa SD między Skladowa dniami (w SD partii) partiami			Całkowite SD ^b
1	1	ujemna	7	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	2	ujemna	7	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	3	ujemna	7	0,2	0,21	0,38	0,44	0,44
1	4	ujemna	7	0,1	0,40	0,00	0,40	0,40
1	5	ujemna	7	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	6	ujemna	7	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	7	ujemna	7	0,2	0,32	0,00	0,32	0,32
1	8	ujemna	7	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	9	ujemna	7	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	10	dodatnia	7	18,4	6,32	0,87	6,38	6,38
2	8	dodatnia ^c	9	19,8	2,53	0,00	2,53	2,53

- ^a Wartość średnia oraz odchylenia standardowe są przedstawione jako odsetki nieprawidłowych wzorów sygnałów.
- ^b Całkowita wariancja stanowi sumę pozostałych komponentów wariancyjnych.
- ^c Próbką dodatnią zbliżoną do punktu odcięcia próbki prawidłowej.

Tabela 15. Analiza precyzji na podstawie odsetka nieprawidłowych wzorów sygnałów dla sondy Vysis CEP 12 SpectrumGreen Probe [trisomia 12 (3 sygnały)]^a

Bada- nie	Próbka	Kategoria	n	Wartość średnia	Skladowa SD między Skladowa dniami (w SD partii) partiami			Całkowite SD ^b
1	1	ujemna	7	0,2	0,42	0,00	0,42	0,42
1	2	ujemna	7	0,2	0,60	0,00	0,60	0,60
1	3	ujemna	7	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	4	ujemna	7	0,1	0,40	0,00	0,40	0,40
1	5	dodatnia	7	21,6	6,07	0,00	6,07	6,07
1	6	dodatnia	7	70,7	4,06	1,07	4,19	4,19
1	7	ujemna	7	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	8	dodatnia	7	67,3	4,84	0,00	4,84	4,84
1	9	ujemna	7	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	10	ujemna	7	0,1	0,20	0,00	0,20	0,20
2	3	dodatnia ^c	9	8,3	2,77	0,00	2,77	2,77
2	4	dodatnia ^c	9	3,6	3,05	0,00	3,05	3,05

- ^a Wartość średnia oraz odchylenia standardowe są przedstawione jako odsetki nieprawidłowych wzorów sygnałów.
- ^b Całkowita wariancja stanowi sumę pozostałych komponentów wariancyjnych.
- ^c Próbką dodatnią zbliżoną do punktu odcięcia próbki prawidłowej.

Odtwarzalność I

Trzy osobne laboratoria przebadaly zaślepiony panel 20 preparatów próbek reprezentujących pięć kategorii według klasyfikacji Döhnera (patrz **Tabela 7**). Badanie zostało przeprowadzone z użyciem 10 preparatów dziennie, przez 2 dni, dając łącznie 6 cykli w 3 ośrodkach badawczych. W każdym laboratorium przebadano te same partie sond Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen Probes oraz LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/CEP 12 SpectrumGreen Probes. Wyniki przedstawione w **Tabeli 16**, wykazują całkowitą zgodność z próbkami reprezentującymi każdą z 5 kategorii klasyfikacji Döhnera.

Tabela 16. Całkowita zgodność pomiędzy ośrodkami, wg sondy

Sonda (Nieprawid- łowość)	Niezgodność ^a			Ogółem		
	Ośro- dek nr 1	Ośro- dek nr 2	Ośro- dek nr 3	Liczba wyników zgodnych ^a	Liczba badanych próbek	Procentowa zgodność
TP53 (17p-)	0	0	0	20	20	100
ATM (11q-)	2	0	0	18	20	90
CEP 12 (+12)	0	0	0	20	20	100
D13S319 1x (13q-)	2	0	0	18	20	90
D13S319 2x (13q-)	0	1	1	18	20	90

^a Niezgodność = Liczba próbek, w przypadku których wynik uzyskany w jednym ośrodku był niezgodny z wynikami uzyskanymi w pozostałych ośrodkach. Zgodność = Liczba próbek, w przypadku których uzyskano zgodne wyniki we wszystkich 3 ośrodkach.

Odtwarzalność zestawu sond Vysis CLL FISH Probe Kit dla każdej kategorii prognostycznej wykazała niemal idealną zgodność²⁴ przy zastosowaniu rozszerzonego współczynnika kappa dla trzech ośrodków badawczych (**Tabela 17**).

Tabela 17. Odtwarzalność zestawu sond Vysis CLL FISH Probe Kit na podstawie rozszerzonego współczynnika kappa

Próbka	Kategoria prognostyczna	
	Rokowanie pośrednie/ korzystne ^a	Rokowanie niekorzystne ^a
1	3	0
2	3	0
3	3	0
4	3	0
5	3	0
6	3	0
7	3	0
8	3	0
9	3	0
10	3	0
11	3	0
12	3	0
13	0	3
14	1	2
15	0	3
16	1	2
17	0	3
18	0	3
19	0	3
20	0	3
Kappa	0,86	
Stopień zgodności	Prawie idealna zgodność ²⁴	

^a Liczba ośrodków na podstawie kategorii prognostycznej

Ponadto dane przeanalizowano według ośrodków i sond przy użyciu dokładnego testu Fishera (Fisher's Exact Test). Patrz **Tabela 18 i 19**.

Tabela 18. Odtwarzalność zestawu sond Vysis CLL FISH Probe Kit wg ośrodka (na podstawie dokładnego testu Fishera)

Ośrodek	Kategoria prognostyczna	
	Rokowanie pośrednie/ korzystne ^a	Rokowanie niekorzystne ^a
1	12	8
2	12	8
3	14	6
wartość p	0,8396	

^a Liczba próbek panelu na podstawie kategorii prognostycznej

Tabela 19. Odtwarzalność zestawu sond Vysis CLL FISH Probe Kit wg sondy na podstawie dokładnego testu Fishera				
Sonda (Nieprawidłowość)	Ośrodek	Wykryta nieprawidłowość	Nie wykryto nieprawidłowości	Wartość <i>p</i>
TP53 (17p-)	1	4	16	1,0000
	2	4	16	
	3	4	16	
ATM (11q-)	1	2	18	0,7495
	2	4	16	
	3	4	16	
D13S319 1x (13q-[x1])	1	6	14	0,8396
	2	8	12	
	3	8	12	
D13S319 2x (13q-[x2])	1	2	18	1,000
	2	3	17	
	3	3	17	
CEP 12 (+12)	1	5	15	1,000
	2	5	15	
	3	5	15	

Odtwarzalność II

Odtwarzalność zestawu sond Vysis CLL FISH Probe Kit oceniono w trzech zewnętrznych laboratoriach, badając zakodowany, randomizowany 8-próbkowy panel (8 niepowtarzalnych próbek, po 2 preparaty na każdą), składający się z sześciu niepowtarzalnych próbek krwi obwodowej, w których wykryto nieprawidłowości TP53 o różnym stopniu (próbki o wartościach blisko punktu odcięcia 1 oraz 2, próbki słabo dodatnie 1 oraz 2, próbki wysoce dodatnie 1 oraz 2) oraz dwóch niepowtarzalnych próbek krwi obwodowej, w których nie wykryto nieprawidłowości TP53 (próbka prawidłowa 1 oraz 2).

Panel 8 próbek składał się z 2 próbek należących do każdej z podanych kategorii:

Typ próbki	Docelowy odsetek komórek dodatnich
próbka prawidłowa	<7%
próbka dodatnia o wartościach blisko punktu odcięcia (17p-)	7% do 19%
próbka słabo dodatnia (17p-)	20% do 50%
próbka wysoce dodatnia (17p-)	> 50%

W badaniu zastosowano trzy partie zestawu sond Vysis CLL FISH Probe Kit w każdym z 3 ośrodków.

Co najmniej dwie wyznaczone osoby w każdym z trzech ośrodków badawczych dokonywały zliczeń sygnałów dla próbek panelu pod kątem TP53. Badanie każdej partii odczynników przeprowadzano przez pięć (5) nienastępujących po sobie dni, przez około 25 kalendarzowych dni. Każdy ośrodek oceniał 240 preparatów, dając łącznie 720 ocenionych preparatów. Dla każdego preparatu z próbką panelu dwie osoby dokonywały zliczeń sygnałów dla 100 jąder, uzyskując łącznie wynik dla 200 jąder.

Dla każdej próbki panelu obliczono procentową zgodność z oczekiwaną klasyfikacją próbek według ośrodka oraz łącznie dla wszystkich ośrodków. Wyniki przedstawiono w Tabeli 20. Dla każdej próbki panelu obliczono procentową zgodność z oczekiwaną klasyfikacją próbek według partii oraz łącznie dla wszystkich partii. Wyniki przedstawiono w Tabeli 21.

Tabela 20. Całkowita odtwarzalność wg ośrodka										
Ośrodek nr 1			Ośrodek nr 2			Ośrodek nr 3		Łącznie		
Próbka panelu	Próbki zgodne/ Próbki ogółem*	% zgod- ności	Próbki zgodne/ Próbki ogółem*	% zgod- ności	Próbki zgodne/ Próbki ogółem*	% zgod- ności	Próbki zgodne/ Próbki ogółem*	% zgod- ności	95% przedział ufności	
wysoce dodatnia 1	30/30	100	30/30	100	30/30	100	90/90	100	(96,100)	
wysoce dodatnia 2	30/30	100	30/30	100	30/30	100	90/90	100	(96,100)	
słabo dodatnia 1	30/30	100	30/30	100	30/30	100	90/90	100	(96,100)	
słabo dodatnia 2	30/30	100	30/30	100	30/30	100	90/90	100	(96,100)	
bliska punktu odcięcia 1	30/30	100	29/30	97	25/30	83	84/90	93	(86,97)	
bliska punktu odcięcia 2	30/30	100	29/30	97	29/30	97	88/90	98	(92,99)	
prawidłowa 1	30/30	100	27/30	90	30/30	100	87/90	97	(91,99)	
prawidłowa 2	30/30	100	27/30	90	30/30	100	87/90	97	(91,99)	

* Liczba badanych próbek zgodnych z oczekiwaną klasyfikacją spośród łącznej liczby badanych próbek

Tabela 21. Całkowita odtwarzalność wg partii										
	Partia nr 1			Partia nr 2		Partia nr 3		Łącznie		
Próbka panelu	Próbki zgodne/ Próbki ogółem*	% zgod- ności	Próbki zgod- ogółem*	% zgod- ności	Próbki zgod- ogółem*	% zgod- ności	Próbki zgod- ogółem*	% zgod- ności	95% przedział ufności	
wysoce dodatnia 1	30/30	100	30/30	100	30/30	100	90/90	100	(96,100)	
wysoce dodatnia 2	30/30	100	30/30	100	30/30	100	90/90	100	(96,100)	
słabo dodatnia 1	30/30	100	30/30	100	30/30	100	90/90	100	(96,100)	
słabo dodatnia 2	30/30	100	30/30	100	30/30	100	90/90	100	(96,100)	
bliska punktu odcięcia 1	28/30	93	27/30	90	29/30	97	84/90	93	(86,97)	
bliska punktu odcięcia 2	29/30	97	29/30	97	30/30	100	88/90	98	(92,99)	
prawidłowa 1	29/30	97	30/30	100	28/30	93	87/90	97	(91,99)	
prawidłowa 2	29/30	97	29/30	97	29/30	97	87/90	97	(91,99)	

* Liczba badanych próbek zgodnych z oczekiwaną klasyfikacją spośród łącznej liczby badanych próbek

Przydatność kliniczna

Tradycyjne systemy określania stopnia zaawansowania klinicznego białaczki CLL wg Rai oraz Bineta opierają się na obciążeniu chorobą oraz są przydatne przy klasyfikowaniu pacjentów do grup o podobnych czasach przeżycia.^{25,26} Systemy te jednakże nie są skuteczne w przewidywaniu okresu przeżycia we wczesnych stadiach choroby, gdy rozpoznawana jest większość przypadków CLL. W związku z tym opracowano markery molekularne, które pozwalają rozróżniać pacjentów podatnych na szybką progresję choroby od pacjentów, u których przebieg choroby będzie powolny.

W badaniu kluczowym przeprowadzonym przez Döhnera i wsp. zatytułowanym „Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia” wykryto, iż zmiany genomowe wykrywane metodą FISH stanowią czynnik predykcyjny progresji choroby oraz całkowitego przeżycia.⁵ Liczne badania potwierdzają wniosek Döhnera

i wsp., że utrata markerów 17p oraz 11q jest czynnikiem predykcyjnym skróconego czasu przeżycia w porównaniu z innymi grupami klasyfikacji Döhnera, na podstawie wykrytych metodą FISH aberracji.¹³⁻¹⁵ Dzięki tym badaniom metoda FISH została uwzględniona w wytycznych NCCN jako narzędzie do określania rokowania dla CLL. Zgodnie z aktualnymi wytycznymi NCCN według kategorii prognostycznych w CLL pacjenci dzielą się na 3 grupy – z rokowaniem korzystnym, neutralnym oraz niekorzystnym.¹⁶

W badaniu prospektywnym z 2006 roku z udziałem 151 pacjentów, przeprowadzonym przez Shanafelta i wsp. z użyciem sond FISH firmy Vysis wyznaczono korelację pomiędzy całkowitym przeżyciem a kategorią ryzyka w badaniu FISH dla CLL w chwili rozpoznania.¹⁵ Pacjentów podzielono na 2 grupy rokownicze. W przypadku braku aberracji chromosomowych lub jeśli obecne były wyłącznie aberracje w postaci 13q- i/lub +12, pacjenci byli zaliczani do grupy o rokowaniu korzystnym/pośrednim wg badania FISH. W przypadku występowania aberracji chromosomowej w postaci delecji 17p- lub 11q- pacjent był zaliczany do grupy o niekorzystnym rokowaniu wg badania FISH. Każdy z czynników takich jak niekorzystne rokowanie względem korzystnego/pośredniego rokowania wg badania FISH (P=0,004), wiek w chwili rozpoznania (P=0,0006) oraz stopień zaawansowania wg Rai (P=0,0026) wykazywał znaczącą korelację z całkowitym przeżyciem od chwili rozpoznania w analizie jednoczynnikowej. Gdy uwzględniono wszystkie czynniki w wieloczynnikowym modelu regresji Coxa, każdy z tych trzech czynników nadal był znaczący: rokowanie niekorzystne względem rokowania korzystnego/pośredniego wg badania FISH (P=0,00022), wiek w chwili rozpoznania (P=0,000024) oraz stopień zaawansowania wg Rai (P=0,00012).

Kliniczna przydatność zestawu sond Vysis CLL FISH Probe Kit została określona głównie na podstawie wysokiej zgodności z oznaczeniem wykorzystanym w publikacji Shanafelta i wsp.¹⁵ (Patrz **Zgodność metod**.)

Ponadto jak wykazano w badaniu Shanafelta, u wszystkich pacjentów z delecją 17p- nieprawidłowość ta dotyczyła 24 do 94% komórek.¹⁵ A zatem niemożliwe było określenie skutku delecji 17p- przy bardzo niskim poziomie. W publikacji na temat nieleczonych pacjentów chorych na CLL, u których występuje delecja 17p-, Tam i wsp. podają, iż całkowite przeżycie 3-letnie wynosi 92% dla pacjentów, u których występuje delecja 17p- na poziomie < 25% względem 54% dla pacjentów, u których delecja 17p- jest na poziomie ≥ 25% (P=0,007).⁷

Zgodność metod

Przeprowadzono badanie, porównując metodę zastosowaną w zestawie sond Vysis CLL FISH Probe Kit z metodą zastosowaną przez Shanafelta i wsp.¹⁵ W badaniu tym określono przydatność kliniczną zestawu sond Vysis CLL FISH Probe Kit, wykazując zgodność z metodą FISH zastosowaną w badaniu Shanafelta. Przydatność kliniczną zestawu sond Vysis CLL FISH Probe Kit jest udokumentowana w recenzowanych publikacjach.

W badaniu tym analizie poddano 64 próbki, zaszeregowane wg klasyfikacji Döhnera na podstawie wcześniejszych wyników uzyskanych metodą FISH użytą w badaniu Shanafelta. Tabela 22. przedstawia rozkład analizowanych próbek wg klasyfikacji Döhnera.

Tabela 22. Liczba badanych próbek wg klasyfikacji Döhnera

Klasyfikacja Döhnera	Liczba badanych próbek
13q- (monosomia lub nullisomia) jako jedyna nieprawidłowość	13
prawidłowa (brak nieprawidłowości cytogenetycznych)	12
+12 bez 11q- lub 17p-	14
11q- bez 17p-	18
17p-	7

Do każdego wyniku przypisano kategorię wg klasyfikacji Döhnera (Tabela 6), a następnie określono kategorię prognostyczną (patrz Tabela 7).

Procentowa zgodność pomiędzy zestawem sond Vysis CLL FISH Probe Kit a metodą FISH użytą w badaniu Shanafelta dla kategorii prognostycznej wyniosła 97% (62/64), przy dolnej granicy jednostronnego 95% przedziału ufności wynoszącej 90% (patrz Tabela 23). Całkowitą zgodność zdefiniowano jako odsetek próbek należących do tej samej kategorii prognostycznej podczas badania z użyciem zestawu sond Vysis CLL FISH Probe Kit oraz metody FISH użytej w badaniu Shanafelta.

Tabela 23. Zgodność dla kategorii prognostycznej^a

Vysis CLL FISH Probe Kit	Referencyjny test FISH Shanafelta		
	Rokowanie pośrednie/korzystne	Rokowanie niekorzystne	Ogółem
Rokowanie pośrednie/korzystne	38	1	39
Rokowanie niekorzystne	1	24	25
Ogółem	39	25	64

^a Wartości w tej tabeli odzwierciedlają liczbę próbek.

Dane dotyczące badania klinicznego

Badanie kliniczne było badaniem wieloosrodkowym, w którym analizowano próbki krwi obwodowej pobrane od osób chorych na CLL. Analizie poddano skuteczność Venetoclaxu (inhibitora BCL2) w jednoramiennym badaniu poddanych uprzednio leczeniu pacjentów chorych na CLL z delecją 17p (Badanie 1). Badanie 1 przeprowadzono przy użyciu zestawu sond Vysis CLL FISH Probe Kit w próbkach krwi obwodowej pobranych od pacjentów z nawrotową/oporną postacią CLL. Łącznie badaniu przesiewowemu w kierunku delecji 17p poddano 167 osób w głównej kohorcie biorącej udział w Badaniu 1.

Łącznie 167 pacjentów z Badania 1 poddano analizie pod kątem informacji prognostycznych zgodnie z wytycznymi NCCN. Pacjenci z delecją 17p lub 11q zostali zaklasyfikowani do kategorii o niekorzystnym rokowaniu. Spośród 167 pacjentów 8 zaklasyfikowani do kategorii o korzystnym rokowaniu, 8 - do kategorii neutralnej, 150 - do kategorii o niekorzystnym rokowaniu oraz w przypadku 1 pacjenta uzyskano wynik nieinformatywny. Dane dotyczące kategorii prognostycznych z Badania 1 podano w Tabeli 24.

Tabela 24. Kategoria prognostyczna osób poddanych badaniu przesiewowemu w Badaniu 1 w oparciu o metodę FISH

Kategoria prognostyczna	Liczba
Rokowanie niekorzystne	150
Rokowanie neutralne	8
Rokowanie korzystne	8
Wynik nieinformatywny	1
Łącznie	167

Spośród 167 osób poddanych badaniu przesiewowemu 107 osób zostało zarejestrowanych do Badania 1. Dane demograficzne oraz charakterystykę choroby dla populacji badanej w Badaniu 1 podano w Tabeli 25.

Tabela 25. Dane demograficzne oraz charakterystyka choroby w Badaniu 1

Charakterystyka	N=107 ^a		
Wiek (w latach)	Mediana (zakres)	67	(37-85)
Rasa, n (%)			
	Azjatycka	0	(0)
	Czarna	3	(2,8)
	Biała/Nieznana ^b	104	(97,2)
Płeć, n (%)			
	Mężczyźni	70	(65,4)
	Kobiety	37	(34,6)
ECOG, n (%)			
	0	42	(39,3)
	1	56	(52,3)
	2	9	(8,4)
Liczba wcześniejszych terapii	Mediana (zakres)	2	(1-10)

^a U jednego pacjenta nie wystąpiła delecja 17p.

^b Nieznana rasa jednego pacjenta

PIŚMIENICTWO

1. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/, based on November 2013 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2014.
2. Leukemia and Lymphoma Society Facts Spring 2014.
3. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, et al. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 1986; 320:84-85.
4. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49-53.
5. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343:1910-6.
6. Zenz T, Gribben JG, Hallek M, et al. Risk categories and refractory CLL in the era of chemoimmunotherapy. *Blood*. 2012;119:4101-7.
7. Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood*. 2009;114:957-64.
8. Stilgenbauer S, Zenz T. Understanding and managing ultra high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:481-8.
9. Shanafelt TD, Byrd JC, Call TG, et al; Narrative review: initial management of newly diagnosed, early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Ann Intern Med*. 2006;145:435-47.
10. Mehes G. Chromosome abnormalities with prognostic impact in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Pathol Oncol Res*. 2005;11(4):205-10.
11. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P et al. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberration and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia*. 2002; 16(6):993-1007.
12. Ripolles L, Ortega M, Ortuno F et al. Genetic abnormalities and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;171(1):57-64.
13. Krober A, Seiler T, Benner A et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100(4):1410-6.
14. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood*. 2002; 100(4):1177-84.
15. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2006; 24(28): 4634-41.
16. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™ NON-HODGKIN'S LYMPHOMAS (Version 2.2015). National Comprehensive Cancer Network, Inc. Available at: [NCCN.org](http://www.nccn.org).
17. The University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser. <http://genome.ucsc.edu/>
18. 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.]
19. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
20. 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.
21. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
22. Margaret J. Barch, Turid Knutsen, Jack Spurbeck, The AGT Cytogenetics Laboratory Manual - Third Edition. June 1997.
23. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med*. 2006;8(1):16-23.
24. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-174.
25. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-34.
26. Binet JL, Auguier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(1):198-206.

Firma Abbott Molecular Inc. jest producentem zestawu sond Vysis CLL FISH Probe Kit.

Zestaw sond Vysis CLL FISH Probe Kit oraz wiele innych bezpośrednio znakowanych sond DNA FISH jest chronionych patentami amerykańskimi o nr 5 663 319 oraz 5 491 224 przyznanymi firmie Abbott Molecular. Bezpośrednio znakowane sondy fluorescencyjne LSI oraz CEP firmy Vysis są chronione następującymi patentami amerykańskimi: RE 40 494, 6 596 479, 7 115 709, 5 756 696 oraz 6 607 877 przyznanymi na mocy wyłącznej licencji firmie Abbott Molecular Inc. przez *The Regents of the University of California*. Metody jednoczesnego wykrywania wielu sygnałów hybrydacyjnych są chronione patentem amerykańskim o nr 6 203 977, przyznanym na mocy wyłącznej licencji firmie Abbott Molecular Inc. przez Uniwersytet Yale (*Yale University*).

LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumAqua oraz SpectrumOrange są znakami towarowymi grupy spółek firmy Abbott podlegających różnym jurysdykcjom.

Pomoc techniczna:

Aby uzyskać pomoc techniczną, prosimy o kontakt z przedstawicielem firmy Abbott Molecular w Polsce lub o odwiedzenie strony internetowej firmy Abbott Molecular pod adresem <http://www.abbottmolecular.com>.



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



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

© 2016, 2020 Abbott. Wszelkie prawa zastrzeżone.
www.abbottmolecular.com

sierpień 2020