

CEP X SpectrumOrange/ Y SpectrumGreen DNA Probe Kit

pl
CEP X SpectrumOrange/
Y SpectrumGreen
DNA Probe Kit
REF 07J20-050
07J22-050
G80942R03
B7JC0P

UWAGA: Zmiany wyróżnione kolorem szarym

Objaśnienia użytych symboli	
	Wytwórca
REF	Numer katalogowy
IVD	Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Wystarczy na przeprowadzenie <n> testów.
	Ograniczenie dopuszczalnej temperatury
	Niebezpieczeństwo
	Niebezpieczeństwo
	Niebezpieczeństwo
	Zagrożenia biologiczne
	Zajrzyj do instrukcji używania.
	Użyć do
EC REP	Autoryzowany przedstawiciel w krajach Wspólnoty Europejskiej

OBŚŁUGA KLIENTA:

PROSIMY O KONTAKT Z PRZEDSTAWICIELEM FIRMY ABBOTT.

Przed użyciem należy dokładnie zapoznać się z treścią niniejszej instrukcji używania. Należy ściśle przestrzegać zamieszczonych w niej zaleceń. Nie można zagwarantować wiarygodności wyników testu w przypadku jakichkolwiek odstępstw od opisanej procedury.

CEP X SPECTRUMORANGE/Y SPECTRUMGREEN DNA PROBE KIT (CEP X/Y)

(nr produktu: 30-161050, nr kat. 07J20-050)

(nr produktu: 32-161050, nr kat. 07J22-050)

NAZWA ZASTRZEŻONA

CEP X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit

NAZWA ZWYCZAJOWA LUB POWSZECHNIE STOSOWANA

Odczynniki do fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH)

PRZEZNACZENIE

Zestaw sond CEP X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen DNA Probe Kit przeznaczony jest do detekcji sekwencji satelity alfa w regionie centromerowym chromosomu X oraz satelity III DNA w regionie Yq12 chromosomu Y w połączeniu z rutynowymi diagnostycznymi badaniami cytogenetycznymi. Może on być wykorzystywany jako uzupełnienie klasycznych badań cytogenetycznych służących do identyfikowania i liczenia kopii chromosomów X oraz Y metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) w jądrach interfazowych oraz płytkach metafazowych komórek pochodzących ze szpiku kostnego pacjentów po transplantacji szpiku kostnego od dawcy przeciwnej płci z powodu przewlekłej białaczki szpikowej (ang. *Chronic Myelogenous Leukemia*, CML), ostrej białaczki szpikowej (ang. *Acute Myeloid Leukemia*, AML), zespołu mieloproliferacyjnego (ang. *Myeloproliferative Disorder*, MPD), zespołu mielodysplastycznego (ang. *Myelodysplastic Syndrome*, MDS), ostrej białaczki limfoblastycznej (ang. *Acute Lymphoid Leukemia*, ALL) oraz chorób układu krwiotwórczego niesklasyfikowanych gdzie indziej (ang. *Hematological disorder not otherwise specified*, HDNOS)]. Zestaw ten nie jest przeznaczony do użytku jako samodzielny test służący do raportowania wyników badań. Wyniki analizy FISH mogą być wydawane i interpretowane wyłącznie w połączeniu z wynikami klasycznych badań cytogenetycznych, przeprowadzonych równolegle z użyciem tej samej próbki pacjenta. Zestaw sond nie jest przeznaczony do stosowania u pacjentów po transplantacji szpiku kostnego od dawcy tej samej płci, z matrycami w postaci innej niż niestymulowane hodowle komórek szpiku kostnego czy jako badanie przesiewowe w kierunku konstytucyjnych aneuploidii chromosomów X i Y.

WPROWADZENIE

Przeszczep szpiku kostnego (ang. *bone marrow transplantation*, BMT) stanowi podstawową metodę leczenia wielu nowotworów hematologicznych. Do najczęstszych schorzeń leczonych poprzez BMT należą: przewlekła białaczka szpikowa (CML), ostra białaczka szpikowa (AML), ostra białaczka limfoblastyczna (ALL), zespół mielodysplastyczny (MDS), zespół mieloproliferacyjny (MPD) oraz sporadycznie przewlekła białaczka limfocytowa (CLL).^{1,2} Choć u wielu osób obserwuje się stabilny stan chimerizmu pomiędzy szpikiem dawcy i biorcy, w innych przypadkach mamy do czynienia ze stanem niestabilnym i wznową choroby nowotworowej z rosnącą liczbą komórek biorcy w szpiku kostnym lub krwi obwodowej.

Po przeszczepie oszacowanie liczby komórek dawcy w stosunku do liczby komórek biorcy może pomóc w ocenie przyjęcia się przeszczepionych komórek, wykryciu obecności neoplazji klonalnych czy zdiagnozowaniu wznowy. Szczególnie jest to istotne w przypadku BMT od dawcy płci przeciwnej. Obecnie stosowane metody oceniające przyjęcie się przeszczepionych komórek po BMT obejmują klasyczne badanie cytogenetyczne.³

Klasyczne badanie cytogenetyczne polega na określeniu kariotypu szpiku kostnego oraz na identyfikacji komórek dawcy i biorcy w oparciu o chromosomy płci lub chromosomalne różnice heteromorficzne pomiędzy dawką i biorcą. Płytki metafazowe przygotowuje się konwencjonalnymi metodami z niestymulowanego szpiku kostnego po 24- do 48-godzinnej hodowli, wybarwionego dichlorowodorkiem kwinakryny lub barwnikiem Giemsy. W zależności od danej placówki klasyczne badanie cytogenetyczne przeprowadza się zazwyczaj na 20 do 30 komórkach mitotycznych. Biorcy szpiku po BMT od dawcy płci przeciwnej są badani poprzez ocenę konstytucji hormonów płci w płytkach metafazowych (XX=kobieta, XY=mężczyzna). W próbkach szpiku kostnego pochodzących od biorców po BMT od dawcy płci przeciwnej, jeśli jedna lub więcej płytek metafazowych pochodzi od dawcy, próbkę uważa się za dodatnią pod względem komórek dawcy. Stosunek komórek XX do komórek XY może być przydatny w ocenie przyjęcia się przeszczepu. Zazwyczaj za całkowite przyjęcie się przeszczepu uznaje się przypadki, w których komórki dawcy znajdują się na poziomie 100%. Nie przywiązuje się istotnego znaczenia klinicznego przypadkom, w których tylko 1 płytka metafazowa wykazuje obecność komórek biorcy.

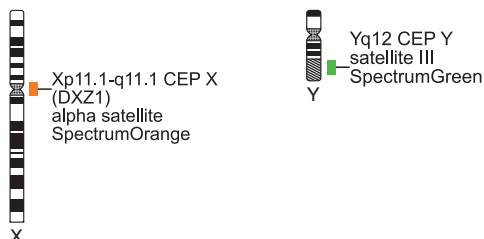
Zaletą klasycznej cytogenetyki jest to, że w przypadku, gdy wykryte zostają komórki gospodarza, można zastosować techniki prążkowania do wykrycia nieprawidłowości chromosomowych charakteryzujących klon białaczkowy, dokumentując tym samym wznowę choroby po przeszczepie szpiku kostnego. Jednakże ograniczeniem klasycznego badania cytogenetycznego jest wykrywanie chimeryzmu mieszanego w małych proporcjach oraz konieczność analizy dużej liczby metafaz dla poprawienia czułości badania.⁴ Analiza 32 metafaz wymagana jest w celu wykluczenia chimeryzmu na poziomie 9% i więcej z 95% ufnością;⁵ analiza 459 lub większej liczby metafaz wymagana jest w celu wykluczenia chimeryzmu na poziomie 1% z 95% ufnością.⁵ Z praktycznego punktu widzenia, w klasycznym badaniu cytogenetycznym trudno jest wykluczyć chimeryzmu poniżej 10%. Ponadto analiza kariotypu wymaga aktywnego podziału komórek, w związku z czym jest ona ograniczona do populacji komórek proliferujących. Brak dzielących się komórek spowodowany ubogokomórkowością szpiku jest główną przyczyną niepowodzenia klasycznego badania cytogenetycznego. Zastosowanie techniki FISH w połączeniu z klasycznym badaniem cytogenetycznym może zwiększyć czułość analityczną poprzez umożliwienie oceny dużej liczby komórek. Zasadniczo w danej próbce można ocenić co najmniej 500 jąder interfazowych. Dzięki dużej liczbie analizowanych komórek oraz raportowanemu wzrostowi czułości analitycznej badania FISH, badanie to powinno zapewnić lepszą precyzję szacowanego stosunku komórek biorcy do komórek dawcy niż ma to miejsce w przypadku klasycznego badania cytogenetycznego. Jednakże w dużym stopniu zależy to od integralności stosowanych w teście odczynników, optymalnego działania analitycznego testu w środowisku laboratoryjnym oraz rozpoznania wyników suboptymalnych.

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 przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego.

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 X/Y. 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 X/Y jest widoczny w mikroskopie fluorescencyjnym wyposażonym w odpowiednie filtry wzbudzające i emisyjne, umożliwiające wizualizację intensywnego pomarańczowego sygnału fluorescencyjnego skupionego w centromerze chromosomu X, intensywnego zielonego sygnału fluorescencyjnego skupionego w regionie Yq12 chromosomu Y, jak i wybarwionych na niebiesko chromosomów i jąder. Liczenie kopii chromosomów X i Y odbywa się w badaniu mikroskopowym jąder interfazowych i/lub metafazowych. Wybarwione fluorescencyjnie centromery chromosomu X oraz satelity III DNA chromosomu Y są dobrze widoczne na tle niebieskiej fluorescencji barwnika DAPI barwiącego jądrowe DNA. W porównaniu z klasycznym badaniem cytogenetycznym, procedura CEP pozwala na uzyskanie wyższego odsetka jąder interfazowych możliwych do zinterpretowania w każdym preparacie i umożliwia wzrokowe liczenie kopii chromosomów X i Y w obrębie jąder.

Wyniki testu podawane są jako odsetek jąder z sygnałami XX, XY oraz innymi w grupie wszystkich komórek z co najmniej jednym sygnałem fluorescencyjnym. Każdy pomarańczowy sygnał fluorescencyjny odpowiada centromerowi chromosomu X, każdy zielony sygnał fluorescencyjny odpowiada satelicie III DNA chromosomu Y.



Sonda DNA CEP X (*locus* DXZ1) jest bezpośrednio wyznakowaną na pomarańczowo (SpectrumOrange) fluorescencyjną sondą DNA swoistą dla alfa-satelitarnych sekwencji DNA bogatych w pary AT w regionie centromerowym chromosomu X (Xp11.1-Xq11.1). Sonda DNA CEP Y (*locus* DYZ1) jest bezpośrednio wyznakowaną na zielono (SpectrumGreen) fluorescencyjną sondą DNA swoistą dla satelity III DNA w regionie Yq12 chromosomu Y. Test przeznaczony jest do wykrywania i liczenia kopii chromosomów X i Y zarówno w jądrach interfazowych, jak i płytkach metafazowych metodą FISH.

ODCZYNNIKI I APARATY

Materiały dostarczone

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

Tabela 1. CEP X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen DNA Probe Kit (nr produktu: 30-161050, nr kat. 07J20-050)

Składnik	Skład	Nr produktu	Zawartość	Przechowywanie
Sonda DNA CEP X/Y: plazmid <i>E. coli</i> (sonda poddana uprzednio denaturacji)	14 ng/μL sondy satelity alfa DNA X znakowanej fluoroforem SpectrumOrange oraz sondy satelity III DNA Y znakowanej fluoroforem zielonym SpectrumGreen, uprzednio wymieszanych z blokującym DNA oraz buforem hybrydyzacyjnym (siarczan dekstranu, formamid, SSC)	30-171050	220 μL/ fiolkę	-20 °C bez dostępu światła
Barwnik kontrastowy DAPI II	125 ng/mL DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol) w dichlorowodoru fenylendiaminy, 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 °C do 25 °C

Tabela 2. CEP X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen DNA Probe Kit with ProbeChek Control Slides (nr produktu: 32-161050, nr kat. 07J22-050)

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

Składnik	Skład	Nr produktu/ nr kat.	Zawartość	Przechowywanie
Szkiełka kontrolne ProbeChek Control Slides Low Level Male (niski poziom komórek męskich) 5% XY/ 95% XX	Utrwalone, pochodzące z hodowli komórek męskich i żeńskie limfoblastów wymieszane w stosunku około 5% komórek męskich do 95% komórek żeńskich, naniesione na szkiełka mikroskopowe.	30-805011	5 szkiełek (10 obszarów docelowych)	-20 °C z desykantem
ProbeChek Control Slides Low Level Female (niski poziom komórek żeńskich) 95% XY/ 5% XX	Utrwalone, pochodzące z hodowli komórek męskich i żeńskie limfoblastów wymieszane w stosunku około 5% komórek żeńskich do 95% komórek męskich, naniesione na szkiełka mikroskopowe.	30-805011 /07J21-011	5 szkiełek (10 obszarów docelowych)	-20 °C z desykantem

PRZECHOWYWANIE I POSTĘPOWANIE Z PRODUKTEM

Oryginalnie zamknięty zestaw sond CEP X/Y DNA Probe Kit należy przechowywać w całości w temp. -20°C , w ciemnym i suchym miejscu. Sole 20X SSC i NP-40 mogą być przechowywane oddzielnie w temperaturze pokojowej. Szkiełka kontrolne ProbeChek Control Slides przechowywać w temp. -20°C w szczelnie zamkniętym pojemniku z desykantem, chroniącym szkiełka przed wilgocią. Daty ważności każdego, oryginalnie zamkniętego składnika testu podane są na poszczególnych etykietach. Powyższe warunki przechowywania dotyczą zarówno otwartych, jak i oryginalnie zamkniętych składników testu.

Materiały wymagane, lecz niedostarczone

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

Odczynniki laboratoryjne

- 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)

Sprzęt laboratoryjny

- Mikroskop fluorescencyjny wyposażony w zalecane filtry
- Mikroskop świetlny z kontrastem fazowym
- Odtuszczone szkiełka mikroskopowe
- Płyta grzejna do preparatów (45 do 50°C)
- Szklane szkiełka nakrywkowe o wymiarach $22\text{ mm} \times 22\text{ mm}$
- Pipeta mikrolitrowa (o zakresie od 1 do $10\text{ }\mu\text{L}$) oraz jałowe końcówki
- Mikroprobówki wirówkowe z polipropylenu ($0,5\text{ mL}$ lub $1,5\text{ mL}$)
- Timer
- Mieszadło magnetyczne
- Worteks
- Mikrowirówka
- Cylinder miarowy
- Łaźnię wodne ($67 \pm 2^{\circ}\text{C}$ oraz $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$)
- 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 probówki
- Klej kauczukowy
- Filtr o wielkości porów $0,45\text{ }\mu\text{m}$

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 propidyny lub kwinakryna 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 zarówno i wymienić ją, zanim upłynie wyznaczony czas jej zużycia. O ile to konieczne, 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 $\geq 0,75$. Obiektów powiększający 25- lub 40-krotnie z okulariem 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 40-krotnie, 63-krotnie lub 100-krotnie.

Olejek imersyjny: Do obiektywów należy używać olejku imersyjnego przeznaczanego do mikroskopii fluorescencyjnej, charakteryzującego się niską autofluorescencją.

Filtry: Zestawy filtrów wielopasmowych przeznaczone do większości modeli mikroskopów zostały zoptymalizowane do użycia z zestawami sond DNA CEP i są dostępne w firmie Abbott Molecular Inc. Dla zestawu CEP X/Y rekomendowany jest zestaw filtrów trójpasmowych DAPI/Green/Orange. Taka kombinacja filtrów umożliwia równoczesne wzbudzenie i emisję fluoroforów SpectrumOrange, SpectrumGreen oraz DAPI. Hybrydyzacja sondy CEP X/Y do jej 2 chromosomów docelowych uwidoczniła jest poprzez fluorescencję pomarańczową i zieloną. Wszystkie pozostałe sekwencje DNA będą fluoryzować na niebiesko poprzez zastosowanie barwnika DAPI.

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 $0,45\text{ }\mu\text{m}$. 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.

Roztwór 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 jeden 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 przy użyciu 1N NaOH. Uzupełnić wodą do uzyskania objętości 1 litra. Przefiltrować przez filtr o wielkości porów $0,45\text{ }\mu\text{m}$. Nieużywany roztwór przechowywać w zamkniętym pojemniku w temperaturze pokojowej przez maksymalnie 6 miesięcy. Roztwór używany w badaniu wymieniać po każdym dniu pracy.

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 $0,45\text{ }\mu\text{m}$. 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. Szkiełka kontrolne ProbeChek Control Slides do stosowania z niniejszym zestawem sond zostały wytworzone z kultur ludzkich komórek limfoblastycznych kilkakrotnie utrwalonych w roztworze metanolu: kwasu octowego (3:1). *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 Zwalczenia i Zapobiegania Chorób (U.S. Centers for Disease Control and Prevention).*⁶
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, hybrydyzacji i zliczania sygnałów 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 hybrydyzowany preparat. Wszystkie etapy procedury, do przeprowadzenia których nie jest wymagane światło (inkubacje, płukania itd.), należy przeprowadzać w przytłumionym świetle, aby fluorofor nie był poddany na bezpośrednie działanie światła.
6. Sonda DNA CEP X/Y zawiera formamid, który jest substancją teratogenną. Unikać zanieczyszczenia skóry i błon śluzowych. Dalsze informacje, patrz karta charakterystyki substancji niebezpiecznej.
7. W sposób szczególnie zaleca się stosowanie skalibrowanego termometru do pomiaru temperatury roztworów, łaźni wodnych oraz inkubatorów, gdyż w tych przypadkach temperatura jest czynnikiem gwarantującym poprawne działanie testu.
8. Wszystkie niebezpieczne materiały należy utylizować zgodnie z zasadami utylizacji materiałów niebezpiecznych, obowiązującymi w danej placówce.

Sonda CEP X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen 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 tego typu 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”,¹¹ standardach OSHA dotyczących patogenów przenoszonych drogą krwi (*Standards on Bloodborne Pathogens*),¹² w dokumencie CLSI M29-A3¹³ oraz innych odpowiednich praktyk związanych z bezpieczeństwem biologicznym.¹⁴ 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.¹¹
- Wszystkie potencjalnie zakaźne materiały odkazić, a następnie usuwać zgodnie z lokalnymi, jak i ogólnokrajowymi przepisami.¹⁴



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 styczości: 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+ | W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: |
| P351+ | Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. |
| P338 | Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. |
| P501 | Usuwać produkt i jego opakowanie w bezpieczny sposób. |

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

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

Szpiłk kostny powinien być pobierany zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danej placówce. Zalecenia dotyczące pobierania i hodowli próbek znajdują się w Instrukcji „AGT Cytogenetics Laboratory Manual”.⁷ AGT zaleca pobieranie szpiku kostnego na podłożu transportowym powlekany heparyną sodową lub do próbek typu Vacutainer zawierających heparynę sodową.⁷ Zgodnie z instrukcją AGT dopuszcza się stosowanie obydwu pojemników. Próbkę szpiku kostnego nie powinny być znacznie zanieczyszczone krwią, gdyż mogłaby ona rozcieńczyć szpiłk kostny oraz zaburzyć wyniki testu w odniesieniu do ilościowego stosunku komórek dawcy do komórek biorcy.

Instrukcja AGT zaleca, aby po przetransportowaniu próbek do pracowni cytogenetyki niezwłocznie rozpocząć przygotowanie hodowli szpiku kostnego. Instrukcja AGT zawiera szereg zaleceń dotyczących prowadzenia i zakończenia hodowli komórkowych. Przed założeniem hodowli lub jej zakończeniem szpiłk kostny nie może być zamrożony. Po wyizolowaniu próbki szpiku kostnego mogą być bezpośrednio użyte do przygotowania preparatów lub przechowywane w utrwalaczu w temp. –20 °C.⁷

Próbki żółtaczkowe lub shemolizowane mogą uniemożliwić prawidłową hodowlę koniecną do przeprowadzenia klasycznego badania cytogenetycznego. Próbkę 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 statywę na próbówce 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 próbówce.
3. Przygotować osad komórkowy, stosując utrwalacz w taki sposób, aby zawiesina była lekko mętna.
4. Oczyszczyć szkiełko mikroskopowe, przemywając obie powierzchnie szkiełka 70% etanolem (używać tryskawki). Wytrzeć szkiełko do sucha przy pomocy ściereczki laboratoryjnej wzdłuż całej jego długości, zaczynając od oznakowanego końca. Podpisać szkiełko przy użyciu ołówka.
5. Zanurzyć odtłuszczone szkiełko w kominku (Coplin) zawierającym utrwalacz. Przechylić szkiełko, aby równomiernie rozprowadzić utrwalacz na górnej powierzchni szkiełka.
6. Niezwłocznie przenieść szkiełko 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 szkiełko do łaźni wodnej i położyć na statywie na próbówce tak, aby powierzchnia z materiałem badanym była zwrócona do góry. Pozostawić szkiełko do wyschnięcia na 10 minut.
8. Zdjąć szkiełko ze statywu na próbówce 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 polu widzenia o małej rozdzielczości powinno znajdować się co najmniej 100 komórek. W celu uzyskania zalecanej liczby jąder interfazowych doprowadzić gęstość preparatu do zalecanej, stosując świeży utrwalacz.
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 szkiełko 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 tyżeczkę desykantu Drierite. Przed rozpoczęciem hybrydyzacji przechowywać w temp. -20°C .

PROCEDURA BADANIA: SKRÓT PROCEDURY FISH

Denaturacja DNA próbki:

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.
4. Pęsetą usunąć preparat(y) z roztworu denaturującego i natychmiast umieścić go(je) w roztworze płuczącym w postaci 70% etanolu w temperaturze pokojowej. 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 worteksie. Każdą próbkę krótko odwirować (1 do 3 sekund) w mikrowirówce, aby zawartość osiadła na dnie próbówki. Ponownie delikatnie wymieszać na worteksie.

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 szkiełko 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 (do 16 godzin). W przypadku inkubacji trwających ponad 1 godzinę należy uszczelnić szkiełka nakrywkowe przy użyciu usuwalnego szczeliwa, jak np. klej kauczkowy, 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 szkiełko, 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: Jeśli hybrydyzacji poddawanych jest więcej niż 4 preparaty, należy je płukać w więcej niż 1 serii. Przed wykonaniem kolejnego płukania roztwór płuczący musi ponownie osiągnąć temp. $73 \pm 1^\circ\text{C}$.
2. Zdjąć szkiełko nakrywkowe z obszaru docelowego pierwszego szkiełka i natychmiast przełożyć szkiełko 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 szkiełko 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.)

- 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 zarówno jasne, zwarte i owalne, jak też włókniste, rozlane i owalne.
- Tło: Tło powinno być ciemne lub czarne i pozbawione cząstek fluorescencyjnych czy zamglania.
- Hybrydyzacja krzyżowa/swoistość sekwencji docelowej: Sonda powinna hybrydyzować i świecić wyłącznie na obszarze docelowym (centromer chromosomu X lub region Yq12 chromosomu Y). 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 zostanie spełniony, należy zapoznać się z treścią **Tabeli 3. Wykrywanie i usuwanie problemów**, a następnie przeprowadzić procedurę z nowym preparatem.

Wybór optymalnego obszaru oględzin i jąder nadających się do oceny

Do oglądania obszaru hybrydyzacji oraz badania rozkładu próbek należy stosować obiektyw powiększający 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 przebadaniu 200 jąder ponad 5% z nich nie wykazuje sygnału hybrydyzacyjnego, oznacza to, że dla danego preparatu hybrydyzacja nie powiodła się, a uzyskanych wyników nie należy raportować.

Liczenie sygnałów w jądrach 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 1**. W celu zweryfikowania lub przeprowadzenia dokładniejszej analizy sygnałów rozszczepionych lub rozmytych należy stosować obiektywy o większym powiększeniu (np. 63-krotnie lub 100-krotnie).

- Dwa sygnały podobnej wielkości, leżące w bliskim sąsiedztwie, ale niepołączone widoczną linią, liczy się jako 2 sygnały.
- Rozmyty sygnał liczy się jako jeden sygnał, jeśli rozmycie sygnału jest spójne i mieści się w akceptowalnych granicach.
- Dwa małe sygnały połączone widoczną linią liczy się jako 1 sygnał.
- Zliczać jądra z 0, 1, 2, 3, 4 lub >4 sygnałami (zarówno sygnałami X, jak i Y), a następnie wynik zliczania zapisać w 2-kierunkowej tabeli. Zliczać jądra z 1 lub więcej sygnałami FISH każdego koloru. Jeśli istnieją wątpliwości co do dokładności liczenia, należy powtórzyć procedurę liczenia na innym obszarze szkiełka.
- Nie liczyć jąder z niepewnymi sygnałami.

Liczenie sygnałów w płytkach metafazowych

- 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 co najmniej 20 kompletnych płytek metafazowych o dobrej jakości, z dobrze określonymi, niezachodzącymi na siebie chromosomami.
- Sygnał sondy DNA CEP X/Y będzie widoczny jako wyraźny sygnał fluorescencyjny zlokalizowany w pobliżu regionu centromeru chromosomu X oraz regionu Yq12 chromosomu Y. 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 jeden sygnał. Postępować zgodnie z ogólnymi wytycznymi dotyczącymi powiększania i skanowania w rozdziale „**Liczenie sygnałów w jądrach interfazowych**”.
- Oprócz zliczania sygnałów X/Y analizie należy poddać komórki metafazowe w celu weryfikacji swoistości sond dla danego *locus* oraz w celu upewnienia się, że nie ma się do czynienia z hybrydującymi krzyżowo sekwencjami w innych miejscach chromosomowych.

Tabela 3. Wykrywanie i usuwanie problemów

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

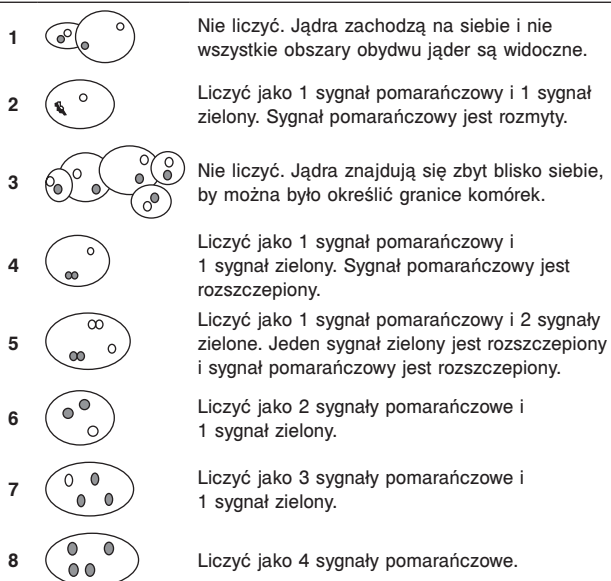
Tabela 3. Wykrywanie i usuwanie problemów (c.d.)

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie
• Mocne tło widoczne na preparacie	<ul style="list-style-type: none"> • Płytki metafazowe dojrzewały przez prażenie lub zawierają dużą ilość cytoplazmy. • Resztki komórek na preparacie • Zanieczyszczone DNA próbki 	<ul style="list-style-type: none"> • Wydłużyć czas denaturacji preparatów do 10 minut. • Pięciokrotnie przemyć zawieszoną komórek świeżym utrwalcaczem i powtórzyć procedurę „Przygotowania preparatów”. • Zastąpić płukanie po hybrydyzacji w 0,4X SSC płukaniem w formamidzie w następujący sposób: <ol style="list-style-type: none"> 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. $46 \pm 1^\circ\text{C}$.
	<ul style="list-style-type: none"> • Zastosowano filtry górnoprzepustowe, które przepuszczają dużą ilość światła. • Płukania przeprowadzono w nieodpowiedniej temperaturze lub nieprawidłowo sporządzono roztwory. • Szkiełka nieprawidłowo odtuszczone przed naniesieniem komórek docelowych 	<ul style="list-style-type: none"> • Zamienić na filtry o mniejszej szerokości pasma lub filtry wielopasmowe. • Sprawdzić temperaturę łaźni, pH roztworów i/lub poprawność ich przygotowania. • Zanurzyć szkiełka w roztworze etanolu i wytrzeć ściereczką laboratoryjną przed naniesieniem zawiesziny komórek.
• Zaburzona morfologia chromosomów	<ul style="list-style-type: none"> • Zbyt szybko wysuszone szkiełka w trakcie przygotowywania preparatu • Denaturacji poddano zbyt świeży materiał. • Preparaty nie zostały całkowicie wysuszone przed denaturacją. • Zbyt wysoka temperatura w roztworze denaturującym 	<ul style="list-style-type: none"> • Zwiększyć względną wilgotność podczas przygotowywania preparatów. • Zwiększyć temperaturę łaźni wodnej podczas przygotowywania preparatów. • Wydłużyć czas suszenia szkiełek z naniesionym materiałem. • Pozwolić dojrzeć preparatom, pozostawiając je na co najmniej 24 godziny w temperaturze pokojowej przed rozpoczęciem denaturacji. • Podgrzewać preparaty w temp. 45°C przez 10 do 15 minut przed denaturacją. • Sprawdzić temperaturę łaźni wodnej.
• Zbyt jaskrawy sygnał	<ul style="list-style-type: none"> • Zbyt wysokie stężenie sondy dla stosowanego mikroskopu 	<ul style="list-style-type: none"> • Spróbować zablokować część sygnału poprzez umieszczenie na ścieżce wzbudzenia filtra o neutralnej gęstości.

Rycina 1. Wzory obrazów i wytyczne dotyczące liczenia sygnałów

Legenda: ○ = sonda zielona

● = sonda pomarańczowa



Kontrola jakości

Zastosowanie szkiełek kontrolnych

Szkiełka kontrolne z niskim poziomem komórek męskich (*low level male*) (5% XY/95% XX) oraz komórek żeńskich (*low level female*) (5% XX/95% XY) muszą być oznaczane równolegle z preparatami z materiałem pacjenta w celu monitorowania działania testu oraz oceny dokładności zliczania sygnałów. Kontrole należy oznaczać każdego dnia badania FISH oraz przy rozpoczęciu pracy z każdą nową partią zestawu sond. Zalecane jest użycie szkiełek ProbeChek Control Slides.

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 X SpectrumOrange/CEP Y SpectrumGreen 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. Prawdopodobne przyczyny problemów oraz działania wymagane w celu ich usunięcia, patrz „Wykrywanie i usuwanie problemów” w Tabeli 3. 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, powtórzną 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.

UWAGA: Zestawy ProbeChek zawierają 5 szkiełek kontrolnych z niskim poziomem komórek męskich (nr produktu: 30-805012, nr kat. 07J21-012) lub 5 szkiełek kontrolnych z niskim poziomem komórek żeńskich (nr produktu: 30-805011, nr kat. 07J21-011). Dopuszczalny zakres odsetka jąder XY/XX podany jest w ulotce ze specyfikacjami, dołączonej do szkiełek.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Wyniki zliczania 500 jąder interfazowych są podawane jako liczba i odsetek jąder interfazowych z sygnałem XX, sygnałem XY oraz „innymi” sygnałami. „Inne” sygnały to: XXY, XYY, XXX, XXXX, XXYY, X oraz Y; podstawowymi zmiennymi będącymi przedmiotem zainteresowania są odsetek komórek z sygnałami XX oraz odsetek komórek z sygnałami XY. O ile klasyczna cytogenetyka oraz badanie FISH z użyciem sondy CEP X/Y w próbkach pobranych przed przeszczepem szpiku kostnego (BMT) nie wykazują obecności „innych” sygnałów u dawcy lub biorcy, suma odsetka komórek z XX oraz XY powinna być większa niż 95%. Próbkę szpiku kostnego biorców po BMT od dawcy płci przeciwnej o zawartości komórek dawcy > 0,6% są uznawane za dodatnie pod względem obecności komórek dawcy. Próbkę szpiku kostnego biorców po BMT od dawcy płci przeciwnej o zawartości komórek dawcy ≤ 0,6% są uznawane za ujemne, choć obecność komórek dawcy nie może być całkowicie wykluczona.

Wyniki zliczania 20 do 30 metafaz są podawane jako liczba i odsetek płytek metafazowych z sygnałami XX oraz XY. Interpretacja wyników podlega tym samym zasadom, jak w klasycznym badaniu cytogenetycznym. Zgodnie z tymi zasadami próbka jest negatywna pod względem obecności komórek dawcy, jeśli w 20 do 30 metafazach nie wykrywa się metafaz pochodzących od dawcy. W przypadku wykrycia co najmniej jednej metafazy pochodzącej od dawcy próbkę uważa się za dodatnią po względem obecności komórek dawcy.

Stosunek komórek XX do komórek XY może być przydatny w ocenie przyjęcia się przeszczepionego szpiku kostnego od dawcy płci przeciwnej. W analizie metafaz nie przypisuje się znaczenia klinicznego wykryciu tylko jednej komórki biorcy. Choć analiza FISH jąder interfazowych pozwala na wykrycie zaledwie 1% komórek biorcy (lub dawcy), nie ma danych na temat klinicznego znaczenia 1% komórek biorcy w porównaniu z 5% tych komórek. Choć znacząca zmiana w proporcji komórek biorcy do komórek dawcy może mieć znaczenie kliniczne, test nie posiada walidacji na monitorowanie przyjęcia się przeszczepu.

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 jednego lub kilku z tych wyników, różnice w czułości/swoistości analitycznej pomiędzy metodami, rzeczywiste różnice w statusie chromosomu X/Y w różnych populacjach komórek badanych z użyciem różnych metod (np. cykliczne procesy komórek metafazowych względem niecyklicznych procesów komórek interfazowych), itp. Gdy wartość odsetka jąder interfazowych XX lub XY znajduje się blisko punktu odcięcia (< 5%),^{15,16} wyniki powinny być ostrożnie interpretowane i może być wymagana dalsza ocena badanej próbki. 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 X/Y DNA Probe Kit został zoptymalizowany wyłącznie do identyfikacji chromosomów w jądrach interfazowych lub płytkach metafazowych pochodzących z próbek szpiku kostnego.
2. Test określa jedynie stosunek komórek dawcy do komórek biorcy w próbkach szpiku kostnego pobranych od biorców szpiku po przeszczepie od dawcy płci przeciwnej. Nie pozwala on na rozróżnienie komórek nowotworowych od komórek zdrowych. Nie został on opracowany do wykrywania nieprawidłowości strukturalnych lub innych nieprawidłowości chromosomowych w klonach komórek nowotworowych, co możliwe jest w przypadku klasycznej cytogenetyki.
3. Czasami dochodzi do utraty chromosomu Y w komórkach szpiku kostnego pochodzących od starszych mężczyzn, bez względu na to, czy próbka pochodzi od dawcy, biorcy czy pacjenta w okresie potransplantacyjnym po przeszczepie szpiku.⁸
4. Ważne jest dysponowanie wynikami badań cytogenetycznych przeprowadzonych przed przeszczepem zarówno dawcy, jak i biorcy, z uwagi na: (1) Sporadycznie obserwuje się przypadki mężczyzn z nietypowym chromosomem Y (z brakującym obszarem heterochromatyny Yq), których nie da się wykryć w teście CEP X/Y. (2) Niektóre osoby mogą posiadać sekwencje docelowe w innych lokalizacjach chromosomowych, które hybrydują do sond CEP X lub Y. Zjawisko to nie zostało przebadane w przypadku CEP X, jednakże polimorfizmy chromosomowe, które hybrydują do sondy

Y, występują raz na 2000 przypadków.⁹ Mogą one być wykryte w analizie metafaz CEP X/Y, a czasami też w klasycznym badaniu cytogenetycznym. (3) Konstytucyjna aneuploidia chromosomów płci, w tym mozaicyzm, obecna u dawcy lub biorcy, może skomplikować zliczanie sygnałów oraz interpretację testu.

5. U dawcy lub biorcy płci męskiej z kariotypem 46, XY, -Y, +X pewien procent komórek z sygnałami XX będzie wykryty przez sondy CEP X/Y.
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. Rozcieńczenie szpiku kostnego krwią może bowiem zaburzyć stosunek komórek dawcy do komórek biorcy.
7. Test CEP X/Y został zwalidowany wyłącznie do stosowania z niestymulowanymi, hodowlanymi próbkami szpiku kostnego pobranymi od biorców po BMT od dawcy płci przeciwnej. Nie jest on przeznaczony do liczenia kopii chromosomu X i Y w komórkach pochodzących z innych populacji pacjentów lub do badania innego materiału biologicznego, takiego jak amniocyty, kosmki kosmówki, fibroblasty, komórki nowotworowe, długoterminowe hodowle komórek i inne.
8. Wyniki uzyskane za pomocą metody FISH mogą mieć charakter nieinformatywny w przypadku nieodpowiedniej jakości badanego materiału i/lub przygotowania preparatu z badanym materiałem.
9. Test nie jest przeznaczony do stosowania u osób po przeszczepie szpiku od dawcy tej samej płci lub jako test diagnostyczny lub przesiewowy w kierunku konstytucyjnych aneuploidii chromosomu X i Y.
10. Potencjalnie w komórkach dawcy lub biorcy mogą znajdować się pozostałości komórek płodowych, jednakże prawdopodobny ich poziom znajduje się poniżej granicy wykrywalności zarówno w klasycznej cytogenetyce, jak i badaniu FISH.
11. Test CEP X/Y nie został zwalidowany do monitorowania statusu przyjęcia się przeszczepu.
12. Znaczenie kliniczne oraz interpretacja wyników badania FISH powinny być rozpatrywane w połączeniu z odpowiednimi kontrolami, klasycznym badaniem cytogenetycznym, a także w kontekście historii choroby pacjenta oraz innych objawów klinicznych.

WARTOŚCI OCZEKIWANE

Zliczanie sygnałów interfazowych w badaniu FISH zostało przeprowadzone na próbkach szpiku kostnego pobranych od osób zdrowych oraz od osób po przeszczepie szpiku od dawcy płci przeciwnej w celu oceny oczekiwanego odsetka komórek z sygnałami XY i XX dla tych dwóch grup badanych oraz w celu wyznaczenia wartości odcięcia dla określenia obecności lub braku komórek XX u mężczyzn oraz komórek XY u kobiet. W każdej próbce zliczono odsetek komórek z sygnałami XX, XY oraz „innymi” sygnałami (np. X0, XXY, XXYY, itp.) w każdej komórce.

Wartości dla próbek pochodzących od osób zdrowych

Analizę FISH jąder interfazowych przeprowadzono z użyciem próbek szpiku kostnego pobranych od 57 zdrowych kobiet i 71 zdrowych mężczyzn. Rozkład sygnałów dla tej grupy badanej przedstawiono w Tabeli 4. i 5.

Tabela 4. Procentowy rozkład odsetka komórek z sygnałami X i Y w 71 próbkach szpiku kostnego pobranych od zdrowych mężczyzn

	Odsetek komórek z							
	XX	XY	X0	XXX	OY	XXY	XXYY	XXXX
Średnia	0,04	98,51	1,03	0,00	0,21	0,10	0,02	0,06
SD	0,10	1,86	1,38	0,00	0,40	0,17	0,06	0,00

Tabela 5. Procentowy rozkład odsetka komórek z sygnałami X i Y w 57 próbkach szpiku kostnego pobranych od zdrowych kobiet

	Odsetek komórek z							
	XX	XY	X0	XXX	OY	XXY	XXYY	XXXX
Średnia	97,38	0,01	2,33	0,14	0,004	0,00	0,00	0,07
SD	1,81	0,05	1,66	0,20	0,026	0,00	0,00	0,17

W cytogenetycznie prawidłowych komórkach szpiku kostnego procent komórek z jądrami XY u mężczyzn oraz jądrami XX u kobiet oraz procent komórek z jądrami XX u mężczyzn oraz jądrami XY u kobiet to 2 zasadnicze kategorie do wyznaczenia wartości oczekiwanych. Średni (±SD) odsetek komórek z jądrami XY i XX w przypadku zdrowych

mężczyzn wyniósł odpowiednio 98,51% ($\pm 1,86\%$) oraz 0,04% ($\pm 0,10\%$). Średni (\pm SD) odsetek komórek z jądrami XX i XY w przypadku zdrowych kobiet wyniósł odpowiednio 97,38% ($\pm 1,81\%$) oraz 0,01% ($\pm 0,05\%$). A zatem, jeśli zalecane wytyczne dotyczące liczenia sygnałów są przestrzegane i stosowane, odsetek komórek z jądrami XY w szpiku kostnym zdrowych mężczyzn powinien mieścić się w zakresie od 94,9% do 100% (95% przedział ufności), zaś odsetek komórek z jądrami XX w szpiku kostnym zdrowych kobiet powinien mieścić się w zakresie od 93,8% do 100% (95% przedział ufności). Odsetek komórek z jądrami XX w szpiku kostnym zdrowych mężczyzn powinien mieścić się w zakresie od 0% do 0,24% (95% przedział ufności), zaś odsetek komórek z jądrami XY w szpiku kostnym zdrowych kobiet powinien mieścić się w zakresie od 0% do 0,20% (95% przedział ufności).

Wartości w grupie pacjentów po przeszczepie szpiku kostnego od dawców płci przeciwnej

Przeprowadzono badanie w celu oceny rozkładu sygnałów interfazowych FISH w 143 próbkach pobranych od pacjentów po BMT od dawcy płci przeciwnej. Rozkład sygnałów dla tych 143 biorców (71 kobiet i 72 mężczyzn) zestawiono w Tabeli 6. i 7.

Tabela 6. Procentowy rozkład odsetka komórek z sygnałami X i Y w próbkach szpiku kostnego pobranych od 71 biorczyń szpiku kostnego od dawców płci przeciwnej

	Odsetek komórek z								
	XX	XY	X0	XXX	OY	XXY	YYY	XXYY	XXXX
Średnia	5,88	92,99	0,008	0,025	0,14	0,001	0,011	0,073	0,014
SD	19,3	19,35	0,010	0,112	0,29	0,002	0,046	0,214	0,098

Tabela 7. Procentowy rozkład odsetka komórek z sygnałami X i Y w próbkach szpiku kostnego pobranych od 72 biorców szpiku kostnego od dawców płci przeciwnej

	Odsetek komórek z								
	XX	XY	X0	XXX	OY	XXY	YYY	XXYY	XXXX
Średnia	92,72	5,64	0,015	0,067	0,011	0,0002	0,006	0,003	0,067
SD	16,91	16,8	0,013	0,157	0,094	0,0011	0,033	0,024	0,174

W przypadku próbek szpiku kostnego pochodzących od biorców po BMT od dawcy płci przeciwnej podstawową kategorią jest odsetek jąder XX u mężczyzn oraz jąder XY u kobiet.

Punkt odcięcia dla stwierdzenia obecności komórek dawcy po BMT od dawcy płci przeciwnej

Inną zasadniczą kategorią w prawidłowych komórkach szpiku kostnego jest odsetek komórek z sygnałami XX w przypadku zdrowych mężczyzn i odsetek komórek z sygnałami XY u zdrowych kobiet. Te wartości odsetkowe zostały użyte do wyznaczenia punktu odcięcia dla określenia obecności lub braku szpiku kostnego dawcy płci przeciwnej. Odsetek komórek z sygnałami XX u mężczyzn oraz odsetek komórek z sygnałami XY u kobiet został wyliczony dla każdej z 128 osób (57 kobiet i 71 mężczyzn) badanych w badaniu kluczowym. W celu określenia zakresu referencyjnego normy wyliczono (jednostronny) 95% przedział ufności z użyciem rozkładu dwumianowego dla stosunku komórek interfazowych z XX lub XY. Górna wartość graniczna wynosiła 0,6%. W celu wyznaczenia punktu odcięcia sporządzono poniższą tabelę (Tabela 8.) w oparciu o zastosowaną metodę dla wyliczenia proporcji dla poziomów ufności.¹⁰

Tabela 8. Punkt odcięcia dla klasyfikacji obecności komórek dawcy w oparciu o liczbę komórek XX u zdrowych mężczyzn oraz komórek XY u zdrowych kobiet

Wykryta liczba komórek płci przeciwnej	500 zliczonych komórek
0	0,6%
1	1,0%
2	1,2%
3	1,6%
4	1,8%
5	2,1%

W oparciu o powyższe dane punkt odcięcia wynoszący 0,6% został ustalony dla określenia obecności komórek dawcy w przypadku BMT od dawcy płci przeciwnej.

Przed klinicznym zastosowaniem zestawu CEP X/Y laboratorium powinno zweryfikować wartość odcięcia poprzez przebadanie i zliczenie co najmniej 10 próbek szpiku kostnego mężczyzn oraz 10 próbek szpiku

kostnego kobiet, zgodnie z wytycznymi podanymi w niniejszej instrukcji używania w rozdziale dotyczącym zliczania sygnałów. Odsetek jąder XX w próbkach pochodzących od zdrowych mężczyzn oraz odsetek jąder XY w próbkach pochodzących od zdrowych kobiet powinny znajdować się poniżej punktu odcięcia wynoszącego 0,6%. Jeśli ta wartość odcięcia nie jest odpowiednia dla danej placówki, użytkownik może ponownie ją wyznaczyć, przeprowadzając opisane powyżej procedury statystyczne. Należy pamiętać, że dysponowanie 20 próbkami (10 próbek od mężczyzn i 10 próbek od kobiet) nie jest wystarczające do wyznaczenia nowej wartości odcięcia.

SZCZEGÓŁOWA CHARAKTERYSTYKA TESTU

Czułość i swoistość analityczna

Wydajność hybrydyzacji

W badaniu kluczowym z użyciem 143 próbek szpiku kostnego średni odsetek komórek wyłącznie z jednym sygnałem hybrydyzacyjnym wyniósł 0,012% (SD = 0,15%). A zatem, <2% komórek z tylko jednym sygnałem stanowi realistyczną normę.

Czułość analityczna

Czułość analityczną sondy CEP X/Y przetestowano w opisanym poniżej badaniu odtwarzalności. W tym badaniu próbki z 0% XY określono w oparciu o średnią (\pm SD) wynoszącą 0,00% ($\pm 0,00\%$) jąder XY oraz próbki z 1% XY - 0,94% ($\pm 0,32\%$). Probki z 0% XX określono w oparciu o średnią (\pm SD) wynoszącą 0,00% ($\pm 0,00\%$) jąder XX oraz próbki z 1% XX - 0,95% ($\pm 0,34\%$). W przypadku próbek 0% oraz 1% niektóre wartości pokrywały się. Dolna wartość graniczna 95% przedziału ufności dla próbek z 1% XY wyniosła 0,31%, zaś dla próbek z 1% XX wyniosła 0,28%. Granicę wykrywalności dla sondy CEP X/Y oszacowano na 1,0%.

Swoistość analityczna

Badania swoistości dla poszczególnych *locus* przeprowadzono w oparciu o płytki metafazowe zgodnie ze standardowymi protokołami kontroli jakości (QC) firmy Abbott Molecular. Przebadano kolejno 65 płytek metafazowych wybarwionych metodą „G-banding” w celu identyfikacji chromosomów X i Y, a następnie przeprowadzono oznaczenie metodą FISH. W żadnej z 65 badanych próbek nie zaobserwowano hybrydyzacji krzyżowej do *loci* na innych chromosomach. Hybrydyzacja ograniczyła się do centromeru chromosomu X oraz regionu Yq12 chromosomu Y.

Odtwarzalność

Na potrzeby oceny odtwarzalności analizy jąder interfazowych z użyciem CEP X/Y w oparciu o odsetek komórek z sygnałami XX oraz XY przygotowano próbki szpiku kostnego w proporcji XY/XX wynoszącej około 0%/100%, 1%/99%, 5%/95%, 95%/5% oraz około 99%/1% i 100%/0%. W kluczowym badaniu oceniono odtwarzalność pomiędzy ośrodkami, partiami, dniami oraz badaczami dla 2 z tych mieszanin próbek szpiku kostnego (około 99%/1% oraz 100%/0% XY/XX) oraz dla 2 mieszanin komórek ludzkich pochodzących z badań hematologicznych ze stosunkiem XY/XX wynoszącym około 0%/100% oraz 1%/99%. Odsetek komórek z sygnałami XX oraz XY oceniono zgodnie z wytycznymi dotyczącymi zliczania sygnałów w niniejszej instrukcji używania. W oparciu o analizę ANOVA zaobserwowano znaczącą zmienność wartości pomiędzy ośrodkami oraz pomiędzy badaczami, co odzwierciedlało subiektywność wzrokowego liczenia sygnałów. Oprócz kluczowego badania w jednym ośrodku przygotowano i przeanalizowano 4 próbki szpiku kostnego ze stosunkiem XY/XX około 0%/100%, 1%/99%, 5%/95% oraz 95%/5%. Wartość średnia, odchylenie standardowe oraz procentowy współczynnik zmienności (CV) obserwowanego odsetka jąder XX oraz XY dla próbek wykorzystanych w badaniu kluczowym oraz ww. dodatkowych próbek szpiku kostnego pokazano w Tabelach 9. do 13.

Tabela 9. Precyzja obserwowanego odsetka wykrytych jąder z sygnałem XY/XX

			Wartość średnia (%)		Odchylenie standardowe (%)		Współczynnik zmienności (%)	
Poziom XY/XX w próbkach:			N		XY		XX	
0%	100%	10	0,00	97,4	0,00	1,18	—	1,21
1%	99%	20	0,88	97,2	0,48	2,00	54,8	2,06
5%	95%	20	4,90	94,9	0,99	0,99	20,2	1,04
95%	5%	10	95,0	4,96	1,60	1,60	1,68	32,3
99%	1%	24	98,3	0,95	0,41	0,34	0,41	36,3
100%	0%	24	99,0	0,00	0,47	0,00	0,48	—

Tabela 10. Zestawienie danych statystycznych dotyczących odsetka jąder XY/XX wg ośrodka badawczego

Poziom		Statys-tyka	Ośrodek nr 1		Ośrodek nr 2		Ośrodek nr 3	
XX	XY		XX	XY	XX	XY	XX	XY
100%	0%	Średnia	97,40	0,00				
		SD	1,18	0,00				
		CV (%)	1,21	—				
		n=10						
99%	1%	Średnia	97,20	0,88				
		SD	2,00	0,48				
		CV (%)	2,06	54,8				
		n=20						
95%	5%	Średnia	94,9	4,90				
		SD	0,99	0,99				
		CV (%)	1,04	20,2				
		n=20						
5%	95%	Średnia	4,96	95,0				
		SD	1,60	1,60				
		CV (%)	32,3	1,68				
		n=10						
1%	99%	Średnia	0,90	97,80	0,88	98,90	0,65	99,23
		SD	0,36	0,84	0,21	0,21	0,30	0,29
		CV (%)	39,40	0,86	24,24	0,22	45,79	0,29
		n=8						
0%	100%	Średnia	0,00	98,93	0,00	99,75	0,00	99,73
		SD	0,00	0,48	0,00	0,28	0,00	0,18
		CV (%)	—	0,48	—	0,28	—	0,18
		n=8						

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

Tabela 11. Zestawienie danych statystycznych dotyczących odsetka jąder XY/XX wg partii sondy

Poziom		Statys-tyka	Partia nr 1		Partia nr 2		Partia nr 3		Partia nr 4	
XX	XY		XX	XY	XX	XY	XX	XY	XX	XY
100%	0%	Średnia	97,40	0,00						
		SD	1,18	0,00						
		CV (%)	1,21	—						
		n=10								
99%	1%	Średnia	97,20	0,88						
		SD	2,00	0,48						
		CV (%)	2,06	54,8						
		n=20								
95%	5%	Średnia	94,9	4,90						
		SD	0,99	0,99						
		CV (%)	1,04	20,2						
		n=20								
5%	95%	Średnia	4,96	95,0						
		SD	1,60	1,60						
		CV (%)	32,3	1,68						
		n=10								
1%	99%	Średnia	0,83	98,70	0,87	98,60	0,60	98,87	0,93	98,40
		SD	0,20	0,69	0,21	0,77	0,36	0,80	0,37	1,06
		CV (%)	23,60	0,70	24,14	0,78	59,63	0,81	39,90	1,08
		n=6								
0%	100%	Średnia	0,00	99,50	0,00	99,43	0,00	99,43	0,00	99,50
		SD	0,00	0,52	0,00	0,57	0,00	0,63	0,00	
		CV (%)	—	0,52	—	0,58	—	0,63	—	0,44
		n=6								

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

Tabela 12. Zestawienie danych statystycznych dotyczących odsetka jąder XY/XX wg dnia badania

Poziom		Statys-tyka	Dzień nr 1		Dzień nr 2		Dzień nr 3		Dzień nr 4	
XX	XY		XX	XY	XX	XY	XX	XY	XX	XY
100%	0%	Średnia	97,40	0,00						
		SD	1,18	0,00						
		CV (%)	1,21	—						
		n=10								
99%	1%	Średnia	97,20	0,88						
		SD	2,00	0,48						
		CV (%)	2,06	54,8						
		n=20								
95%	5%	Średnia	94,9	4,90						
		SD	0,99	0,99						
		CV (%)	1,04	20,2						
		n=20								
5%	95%	Średnia	4,96	95,0						
		SD	1,60	1,60						
		CV (%)	32,3	1,68						
		n=10								
1%	99%	Średnia	0,83	98,70	0,93	98,40	0,77	98,63	0,70	98,83
		SD	0,20	0,69	0,37	1,06	0,15	0,77	0,43	0,80
		CV (%)	23,60	0,70	39,90	1,08	19,64	0,79	61,94	0,81
		n=6								
0%	100%	Średnia	0,00	99,50	0,00	99,43	0,00	99,40	0,00	99,53
		SD	0,00	0,56	0,00	0,63	0,00	0,51	0,00	0,45
		CV (%)	—	0,57	—	0,63	—	0,51	—	0,45
		n=6								

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

Tabela 13. Zestawienie danych statystycznych dotyczących odsetka jąder XY/XX wg badacza

Poziom		Statys-tyka	Badacz nr 1		Badacz nr 2	
XX	XY		XX	XY	XX	XY
100%	0%	Średnia	98,00	0,00	96,80	0,00
		SD	0,71	0,00	1,31	0,00
		CV (%)	0,73	—	1,35	—
		n=5				
99%	1%	Średnia	95,4	0,80	99,00	0,96
		SD	0,93	0,53	0,45	0,48
		CV (%)	0,97	66,1	0,45	50,0
		n=10				
95%	5%	Średnia	95,2	4,48	94,56	5,32
		SD	0,65	0,53	1,19	1,18
		CV (%)	0,68	11,8	1,26	22,2
		n=10				
5%	95%	Średnia	5,16	94,84	4,76	95,20
		SD	2,36	2,36	0,61	0,61
		CV (%)	45,73	2,49	12,8	0,64
		n=5				
1%	99%	Średnia	0,80	98,50	0,82	98,78
		SD	0,33	1,04	0,29	0,46
		CV (%)	41,29	1,06	35,35	0,47
		n=12				
0%	100%	Średnia	0,00	99,45	0,07	99,58
		SD	0,00	0,65	0,23	0,42
		CV (%)	—	0,65	—	—
		n=12				

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

Porównanie metod; próbki kliniczne

Przeprowadzono wielośrodkowe, zaślepione, kontrolowane, porównawcze badanie dla scharakteryzowania działania zestawu sond CEP X/Y DNA Probe Kit w identyfikacji stosunku komórek XX do komórek XY w porównaniu z klasycznym badaniem cytogenetycznym u biorców po BMT od dawcy płci przeciwnej. Archiwalne próbki szpiku kostnego, które uprzednio zostały przebadane klasyczną metodą cytogenetyczną, zostały wyselekcjonowane spośród 143 pacjentów (72 mężczyzn i 71 kobiet) po BMT od dawcy płci przeciwnej. Kolejne próbki wyselekcjonowano i oceniono w 3 ośrodkach. Ośrodek nr 1 dostarczył i przebadał 40 próbek; ośrodek nr 2 - 52 próbki, zaś ośrodek nr 3 - 51 próbek. Probki te pochodziły od pacjentów, u których zdiagnozowano jedną z poniższych chorób:

1. przewlekła białaczka szpikowa (CML): 69 próbek
2. ostra białaczka szpikowa (AML) lub ostra białaczka nielinfocytowa (ANLL): 30 próbek
3. zespół mielodysplastyczny (MDS): 7 próbek
4. ostra białaczka limfocytowa (ALL): 21 próbek
5. choroba układu krwiotwórczego niesklasyfikowana gdzie indziej, ale w przypadku której zwyczajowo przeprowadza się badanie cytogenetyczne (HDNOS): 16 próbek

Do klasycznego badania cytogenetycznego oraz analizy FISH wszystkie ośrodki wykorzystywały niestymulowane próbki pochodzące z hodowli. Każdy ośrodek przestrzegał własnych wewnętrznych zasad postępowania w przypadku klasycznego badania cytogenetycznego. Badania FISH przeprowadzono zgodnie z zaleceniami opisanymi w instrukcji używania zestawu sond CEP X/Y DNA Probe Kit. Komórki dawcy i biorcy zostały zliczone metodą FISH w co najmniej 20 komórkach metafazowych i 500 komórkach interfazowych. Zgodnie z założeniem dotyczącym próbek z podejrzanym chimerizmem chromosomów płci pochodzących od pacjentów po BMT od dawcy płci przeciwnej, komórki dawcy zostały wykryte w każdej ze 143 próbek w klasycznym badaniu cytogenetycznym. Badanie interfazy metodą FISH wskazało 143/143 próbki jako dodatnie pod względem obecności komórek dawcy (100% czułość względna). Analiza metafazy metodą FISH wykryła komórki dawcy w 141/141 próbkach (100% czułość względna). Rozkład komórek dawcy pokazany jest w Tabeli 14. według ośrodka i metody badania.

UWAGA: Dwie próbki nie zawierały płytek metafazowych do badania FISH, w związku z czym całkowita liczba wyniosła 141, a nie 143.

Tabela 14. Rozkład sygnałów pochodzących z komórek dawcy wg ośrodka dla każdej metody

Metoda	Rozkład komórek dawców		
	Ośrodek nr 1	Ośrodek nr 2	Ośrodek nr 3
Cytogenetyka standardowa	2,5% do 100%	10,0% do 100%	30,0% do 100%
Badanie metafazy metodą FISH	3,2% do 100%	30,0% do 100%	25% do 100%
Badanie interfazy metodą FISH	10,4% do 98,8%	29,4% do 100%	21,3% do 100%

Oprócz oceny działania metody FISH w populacji docelowej pacjentów po BMT od dawcy płci przeciwnej, zdolność badania interfazy i metafazy metodą FISH do poprawnego wskazywania jako ujemne próbek od pacjentów po BMT od dawcy tej samej płci została oceniona u 153 pacjentów po BMT od dawcy tej samej płci. Rozkład diagnoz w tej grupie pacjentów był podobny do rozkładu diagnoz u pacjentów po BMT od dawcy płci przeciwnej. Badanie interfazy metodą FISH prawidłowo wykryło 149/153 (97,4%) próbek jako ujemne. Wszystkie 4 przypadki fałszywie dodatnie miały miejsce w przypadku biorców płci męskiej po BMT od dawcy tej samej płci. Jeden przypadek wykazywał kariotyp 46, XY, -Y, +X, co w badaniu FISH skutkowało wynikiem 37,4% komórek z sygnałami XX; wyniki badania FISH dla pozostałych 3 przypadków wskazywały na niższe poziomy komórek XX (4,6%, 1,6% oraz 0,8%). Badanie metafazy metodą FISH wykryło 151/153 (98,7%) próbki jako ujemne. Obydwa wyniki fałszywie dodatnie uzyskano w przypadku tych samych pacjentów, u których wyniki badania interfazy metodą FISH były rozbieżne. Jeden przypadek wykazywał kariotyp 46, XY, -Y, +X, co w badaniu FISH skutkowało wynikiem 20% komórek z sygnałami XX; wyniki badania FISH dla drugiego przypadku wyniosły 7,1% komórek XX. Błędne zaklasyfikowanie biorcy po BMT od dawcy tej samej płci z nieprawidłowym kariotypem wskazuje na potrzebę przeprowadzania badania cytogenetycznego przed BMT w połączeniu z badaniem FISH. Pozostałe 3 „fałszywie dodatnie” przypadki w badaniu FISH wykazywały niskie poziomy komórek XX; zarówno biorca, jak i dawca

charakteryzował kariotyp 46,XY. Choć przypadki błędnej klasyfikacji w badaniu FISH nie dotyczyły kobiet po BMT od dawcy tej samej płci, niskie poziomy komórek dawcy/biorcy w badaniu FISH należy interpretować z zachowaniem ostrożności. Wszystkie wyniki FISH należy interpretować w połączeniu z wynikami konwencjonalnej cytogenetyki oraz w kontekście innych istotnych danych klinicznych.

PIŚMIENICTWO

1. Haas OA, Hinterberger W, Schmidmeier W, et al. Cytogenetic studies in bone marrow transplant recipients. *Blut.* 1986;53:29-38.
2. Walker H, Singer CRJ, Patterson J, et al. The significance of host haemopoietic cells detected by cytogenetic analysis of bone marrow from recipients of bone marrow transplants. *Br J Haematol.* 1986;62:385-391.
3. Lawler SD, Baker MC, Harris H, et al. Cytogenetic studies on recipients of allogeneic bone marrow using the sex chromosomes as markers of cellular origin. *Br J Haematol.* 1984;56:431-443.
4. Schattenberg A, DeWitte T, Salden M, et al. Mixed hematopoietic chimerism after transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *Blood.* 1989;73:1367-72.
5. Hook E. Exclusion of chromosomal mosaicism: Tables of 90%, 95%, and 99% confidence limits and comments on use. *American Journal of Human Genetics.* 1977;29:94-97.
6. U.S. Centers for Disease Control. *Morbidity and Mortality Weekly Review.* 1987;36(suppl. 2S):2S-18S.
7. Barch MJ, ed. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual.* 3rd ed. New York, NY: Raven Press, Ltd;1997.
8. Przeciorka D, Thomas ED, Durnam DM, et al. Use of a probe to repeat sequence of the Y chromosome for detection of host cells in peripheral blood of bone marrow transplant recipients. *Am J Clin Pathol.* 1991;95:201-206.
9. Alitalo T, Tihonen J, Hakola P, et al. Molecular characterization of a Y;15 translocation segregating in a family. *Hum Genet.* 1988;79:29-35.
10. Beyer WH. *CRC Handbook of Tables for Probability and Statistics*, Second Edition. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA, 1968:219.
11. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009. [Dostępne także online. Wpisz > www.cdc.gov, wyszukaj > BMBL5 > sprawdź rozdziały III oraz IV].
12. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens.*
13. 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.
14. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual.* 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2004.
15. Erlecke J, Hartmann I, Hoffmann M, et al. Automated detection of residual cells after sex-mismatched stem-cell transplantation - evidence for presence of disease-marker negative residual cells. *Mol Cytogenet.* 2009;2:12.
16. Antin JH, Childs R, Filipovich AH, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2001;7(9):473-485.

POMOC TECHNICZNA

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

CEP oraz Vysis są zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Vysis, Inc. SpectrumOrange oraz ProbeChek są znakami towarowymi firmy Vysis, Inc.

* Amerykański patent nr 5 447 841 należący na zasadzie wyłącznej licencji udzielonej firmie Vysis przez Uniwersytet kalifornijski (*University of California*) obejmuje metodę FISH wykorzystującą blokujące DNA oraz sondy unikalnych sekwencji, takie jak sondy LSI firmy Vysis.

Bezpośrednio znakowane sondy fluorescencyjne Vysis LSI, CEP oraz WCP są chronione amerykańskim patentem nr 5 491 224.



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



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

© 2006, 2020 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

kwiecień 2020