



A Sysmex Group Company



Návod k použití (IFU)

REF: CE-LPH 036-S / CE-LPH 036

EV11 (MECOM) Breakapart Probe



POUZE K PROFESIONÁLNÍMU POUŽITÍ



Další informace a více jazyků je k dispozici na internetové adrese
ogt.com/IFU

Zamýšlený účel

Sonda CytoCell® EV11 (MECOM) Breakapart Probe je kvalitativní, neautomatizovaný, fluorescenční *in situ* hybridizační test (FISH) používaný k detekci chromozomálních přeskupení v oblasti 3q26.2 na chromozomu 3 v hematologicky získaných buněčných suspenzích fixovaných v Carnoyově roztoku (metanol a kyselina octová v poměru 3 : 1) od pacientů s potvrzenou nebo suspektní akutní myeloidní leukémií (AML) s přeskupením MECOM nebo myelodysplastickým syndromem (MDS).

Indikace k použití

Tento prostředek byl vytvořen jako doplněk k dalším klinickým a histopatologickým testům v rámci uznávaných diagnostických postupů a postupů klinické péče v případech, kdy by znalost stavu přeskupení MECOM byla důležitá pro klinickou léčbu.

Omezení

Tento prostředek je určen k detekci přestavb s body zlomu v oblasti ohraničené červenými, zelenými a aqua klony v této sadě sond, která zahrnuje oblast MECOM (zelená sonda), telomerickou oblast genu MECOM (červená sonda) a centromerickou oblast genu MECOM (aqua sonda). Body zlomu mimo tyto oblasti nebo variantní přeskupení, plně obsažené v této oblasti, nemusí být tímto prostředkem detekovány.

Tento prostředek není určen k použití v rámci samostatné diagnostiky, doprovodné diagnostiky, k prenatalnímu testování, skrínungu populace, testování přímo u pacientů ani k provádění sebetestování.

Tento prostředek nebyl validován pro typy vzorků, chorob nebo účely jiné, než ty, které jsou uvedeny v zamýšleném účelu.

Je koncipován jako doplněk dalších diagnostických laboratorních testů. Terapeutické postupy nesmí být zahajovány pouze na základě výsledků testů FISH.

Hlášení a interpretace výsledků FISH musejí být prováděny kvalifikovanými pracovníky v souladu s profesionálními standardy praxe a měly by zohledňovat další relevantní výsledky testů a také klinické a diagnostické informace.

Tento prostředek je určen výhradně k laboratornímu profesionálnímu použití.

Nedodržení protokolu může ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům.

Principy testu

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika umožňující detekovat sekvence DNA na metafázových chromozomech nebo v interfázních jádrech z fixovaných cytogenetických vzorků. Tato technika využívá DNA sondy, které hybridizují na celé chromozomy nebo na jednotlivé jedinečné sekvence a které slouží jako důležitý doplněk cytogenetické analýzy pomocí G-pruhování. Tuto techniku lze nyní aplikovat jako základní vyšetřovací nástroj při prenatalní a hematologické vyšetření a při chromozomální analýze solidních tumorů. Po fixování a denaturaci je cílová DNA k dispozici pro reasociaci na podobně denaturovanou, fluorescenčně označenou sondu DNA, která má komplementární

sekvenci. Po hybridizaci se nevázaná a nespecificky vázaná DNA sonda odstraní a DNA se barevně označí za účelem vizualizace. Fluorescenční mikroskopie potom umožňuje vizualizaci hybridizované sondy na cílovém materiálu.

Informace o sondě

Onkogen MECOM (komplexní lokus MDS1 a EV11) na 3q26.2 je u hematologických malignit myeloidního původu, včetně myelodysplastických neoplazií (MDS) a akutní myeloidní leukémie s přeskupením MECOM (AML), často přeskupen. Jeho exprese v neoplastických myeloidních buňkách narušuje myeloidní diferenciaci, regulaci buněčného cyklu a buněčné signální dráhy.¹

Tato deregulovaná exprese je často způsobena chromozomálními přeskupeními zahrnujícím oblast 3q26.2, přičemž dvěma nejčastějšími (~40 %) aberacemi jsou t(3;3)(q21;q26.2) a inv(3)(q21q26.2).¹ Bylo popsáno více než 30 dalších přeskupení 3q26.2, z nichž většina byla charakterizována na molekulární úrovni.¹

Body zlomu pro translokace a inverze se významně liší. Přeskupení MECOM jsou velmi heterogenní a pomocí konvenční cytogenetiky může být obtížné je odhalit, čímž se metoda FISH stává užitečným nástrojem jejich detekce. Variantní oblasti bodu zlomu t(3;v)(q26.2;v) mohou sahát od 3' proximálně od MECOM až po 5' distálně od promotoru MDS1-EV11, což pokrývá zelená sonda. Proto se očekávaný vzor signálu u těchto translokací liší v závislosti na poloze bodu zlomu.² Testování přeskupení MECOM se doporučuje jak u MDS, tak u AML.³

AML s přeskupením MECOM je agresivní onemocnění s krátkou dobou přežití bez ohledu na procento blastů, bez rozdílu ve výsledcích mezi případy s inv(3)/t(3;3) ve srovnání s přeskupeními MECOM s jinými partnery.¹ Stratifikace rizik MDS zahrnuje proměnné, jako je věk, závažnost cytopenií a cytogenetické nálezy.¹

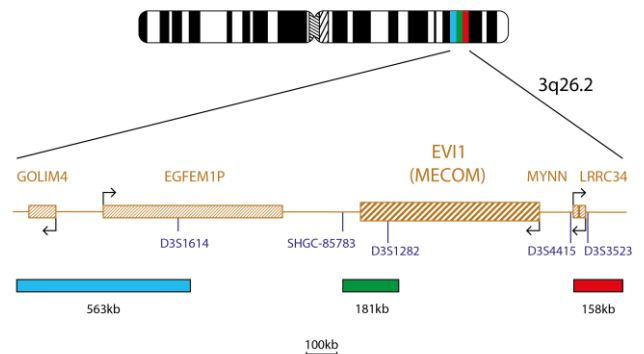
Parametry sondy

EV11, 3q26.2, červená

EV11, 3q26.2, zelená

EV11, 3q26.2, aqua

CMP-H021 v008.00



Červená složka směsi sond EV11 se skládá ze sondy o délce 158 kb, telomerické k markeru D3S4415, a zahrnuje gen LRRC34. Zelená složka pokrývá oblast o délce 181 kb, která zahrnuje centromerickou část genu EV11 (MECOM) až za marker D3S1282. Aqua složka pokrývá oblast o délce 563 kb, centromerickou ke genu EV11, což zahrnuje marker D3S1614.

Dodaný materiál

Sonda: 50 µl v jedné lahvičce (5 testů) nebo 100 µl v jedné lahvičce (10 testů)
Sondy se dodávají předem smíchané v hybridizačním roztoku (< 65 % formamidu; < 20 mg dextran sulfátu; < 10 % 20x solného roztoku citrátů sodného (SSC)) a jsou připraveny k použití.

Kontrastní barvivo: 150 µl v jedné lahvičce (15 testů)

Kontrastním barvivem je DAPI Antifade ES (0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenylnindol) v montážním médiu na bázi glycerolu).

Varování a bezpečnostní pokyny

1. K diagnostickému použití *in vitro*. Výhradně k laboratornímu profesionálnímu použití.
2. Směsi v sondách obsahují formamid, což je teratogen; nevdechujte výpary a zamezte kontaktu s pokožkou. Zacházejte s ním opatrně; noste rukavice a laboratorní plášť.
3. S DAPI zacházejte opatrně; noste rukavice a laboratorní plášť.
4. Jsou-li lahvičky poškozeny nebo je obsah lahvičky jakkoli znehodnocen, nepoužívejte je.
5. Při výběru bezpečné likvidace tohoto produktu se řiďte místními předpisy pro likvidaci ve vaší lokalitě spolu s doporučeními uvedenými v bezpečnostním listu. To platí i pro poškozený obsah testovací sady.
6. Všechny použité reagentie a další kontaminované materiály na jedno použití zlikvidujte podle postupů pro infekční nebo potenciálně infekční odpad. Každá laboratoř odpovídá za nakládání s pevným a kapalným odpadem podle jeho povahy a stupně nebezpečnosti a za jeho zpracování a likvidaci (nebo za zajištění jeho zpracování a likvidace) v souladu s platnými předpisy.
7. Pracovníci musí být schopni rozlišit červenou, modrou a zelenou barvu.
8. Nedodržení předepsaného protokolu a reagentie může ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům.
9. Sonda se nesmí fedit ani míchat s jinými sondami.
10. Není-li během kroku pre-denaturace v rámci protokolu použito 10 µl sondy, může to nepříznivě ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům.

- Všechny produkty musí být před použitím validovány.
- Interní kontroly musí být prováděny pomocí nedotčených buněčných populací v testovacích vzorcích.

Definice teploty

- 20 °C / zmražený / v mrazáku: -25 °C až -15 °C
- 37 °C: +37 °C ±1 °C
- 72 °C: +72 °C ±1 °C
- 75 °C: +75 °C ±1 °C
- Pokojevá teplota: +15 °C až +25 °C

Uchování a manipulace



Sadu je třeba uchovávat v mrazáku při teplotách -25 °C až -15 °C až do data expirace uvedeného na štítku sady. Sonda a lahvičky s kontrastními barvivy musí být uloženy v temnu.



Sonda FISH, kontrastní barvivo DAPI Antifade ES a hybridizační roztok zůstávají při běžném používání stabilní po celou dobu cyklů zmrazování a rozmrazování (přičemž jeden cyklus představuje vyjmutí lahvičky z mrazničky a její vložení zpět) – 5 cyklů pro 50µl (5 testů) lahvičku sondy FISH, 10 cyklů pro 100µl (10 testů) lahvičku sondy FISH a 15 cyklů pro 150µl (15 testů) lahvičku kontrastního barviva. Je třeba minimalizovat vystavení světlu, a pokud možno, se mu zcela vyhnout. Složky skladujte v dodané nádobě odolné vůči působení světla. Složky použité a skladované za jiných podmínek, než jaké jsou uvedeny na etiketě, nemusí fungovat podle očekávání a mohou nepříznivě ovlivnit výsledky testu. Je třeba vynaložit veškeré úsilí na omezení expozice světlu a teplotním změnám.

Potřebné vybavení a materiál, které nejsou součástí dodávky

Je nutné používat kalibrovaná zařízení:

- Varná deska (s pevnou plotýnkou a přesným ovládním teploty do 80 °C)
- Kalibrované mikropipety s variabilním objemem a špičkami v rozsahu od 1 µl do 200 µl
- Vodní lázeň s přesným ovládním teploty od 37 °C do 72 °C
- Mikrocentrifugační zkumavky (0,5 ml)
- Fluorescenční mikroskop (viz oddíl Doporučení k fluorescenčnímu mikroskopu)
- Mikroskop s fázovým kontrastem
- Čistě plastové, keramické nebo skleněné (z ohnivzdorného skla) lahvičky typu „Coplin“
- Chirurgické kleště
- Kalibrovaný pH metr (nebo pH indikační proužky schopné měřit pH v rozmezí 6,5–8,0)
- Vlhčená nádoba
- Imerzní olej na objektiv fluorescenčního mikroskopu
- Stolní odštědivka
- Mikroskopická sklíčka
- Krycí sklíčka 24 × 24 mm
- Stopky
- Inkubátor, 37 °C
- Lepidlo na bázi kaučukového roztoku
- Vířivý mixér
- Odměrné válce
- Magnetická míchačka
- Kalibrovaný teploměr

Volitelné vybavení, které není součástí dodávky

- Cytogenetická sušicí komora

Potřebné reagenty, které nejsou součástí dodávky

- 20x solný roztok citrátu sodného (SSC)
- 100% etanol
- Tween-20
- 1M hydroxid sodný (NaOH)
- 1M kyselina chlorovodíková (HCl)
- Demineralizovaná voda

Doporučení k fluorescenčnímu mikroskopu

K optimální vizualizaci použijte 100W nebo podobnou rtuťovou lampu s apochromatické objektivy 60/63x nebo 100x s imerzním olejem. Fluorofory použité v této sadě sondy budou excitovat a emitovat při následujících vlnových délkách:

Fluorofor	Excitace _{max} [nm]	Emise _{max} [nm]
Aqua	418	467
Zelená	495	521
Červená	596	615

Zajistěte, aby byl mikroskop vybaven příslušnými excitačními a emisními filtry, které pokrývají výše uvedené vlnové délky.

Pro optimální vizualizaci aqua spektra použijte jednopásmový aqua filtr, nebo pro simultánní vizualizaci zelených, červených a aqua fluoroforů použijte třípásmový červený/zelený/aqua filtr.

Před použitím zkontrolujte správnou funkci fluorescenčního mikroskopu. Použijte imerzní olej vhodný pro fluorescenční mikroskopy a se speciálním složením pro nízkou autofluorescenci. Dbejte, aby nedošlo ke smíchání barviva DAPI antifade s imerzním olejem do mikroskopu, protože by tak došlo k zastížení signálů. Dodržujte doporučení výrobce týkající se životnosti lampy a stáří filtrů.

Příprava vzorků

Sada je určena k použití u hematologicky získaných buněčných suspenzí fixovaných v Carnoyově fixačním roztoku (směs metanolu a kyseliny octové v poměru 3 : 1) od pacientů s potvrzenou nebo suspektní akutní myeloidní leukémií (AML) nebo myelodysplastickým syndromem (MDS), které jsou připraveny v souladu s pokyny laboratoře nebo zdravotnického zařízení. Na mikroskopická sklíčka naneste vzorky usušené na vzduchu v souladu se standardními cytogenetickými postupy. *Cytogenetics Laboratory Manual AGT* (Příručka pro cytogenetické laboratoře) obsahuje doporučení pro odběr, kultivaci a získávání vzorků a pro přípravu sklíček⁴.

Příprava roztoků

Etanolové roztoky

100% etanol rozřeďte demineralizovanou vodou v následujících poměrech a řádně promíchejte:

- 70 % etanol – 7 dílů 100 % etanolu na 3 díly demineralizované vody
 - 85 % etanol – 8,5 dílů 100 % etanolu na 1,5 dílu demineralizované vody
- Roztoky skladujte až 6 měsíců při pokojové teplotě ve vzduchotěsné nádobě.

Roztok 2xSSC

Zřeďte 1 díl roztoku 20xSSC 9 díly demineralizované vody a řádně promíchejte. Zkontrolujte pH a podle potřeby upravte pomocí NaOH nebo HCl na pH 7,0. Roztok skladujte ve vzduchotěsné nádobě při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů.

Roztok 0,4xSSC

Zřeďte 1 díl roztoku 20xSSC 49 díly demineralizované vody a řádně promíchejte. Zkontrolujte pH a podle potřeby upravte pomocí NaOH nebo HCl na pH 7,0. Roztok skladujte ve vzduchotěsné nádobě při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů.

Roztok 2xSSC, 0,05% roztok Tween-20

Zřeďte 1 díl roztoku 20xSSC 9 díly demineralizované vody. Na 10 ml přidejte 5 µl roztoku Tween-20 a řádně promíchejte. Zkontrolujte pH a podle potřeby upravte pomocí NaOH nebo HCl na pH 7,0. Roztok skladujte ve vzduchotěsné nádobě při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů.

Protokol FISH

(Poznámka: Dbejte, aby vždy byla omezena expozice sondy a kontrastních barviv vůči osvětlení v laboratoři).

Příprava sklíčka

- Naneste buněčný vzorek na mikroskopické podložní sklíčko. Nechte ho zaschnout. **(Volitelně při použití cytogenetické sušicí komory:** K optimálnímu nanesení buněčných vzorků by měla komora pracovat při teplotě přibližně 25 °C a vlhkosti 50 %. Pokud cytogenetická sušicí komora není k dispozici, použijte jako alternativu digestoř).
- Sklíčko ponořte na 2 minuty do roztoku 2xSSC při pokojové teplotě. Neprotřepávejte.
- Dehydratujte pomocí etanolové řady (70 %, 85 % a 100 %), vždy po dobu 2 minut při pokojové teplotě.
- Nechte ho zaschnout.

Pre-denaturace

- Vyjměte sondu z mrazáku a nechte ji zahřát na pokojovou teplotu. Zkumavky před použitím krátce odstředěte.
- Dbejte, aby byl roztok sondy rovnoměrně promíchán pipetou.
- Na každý test odeberte 10 µl sondy a přeneste ji do mikrocentrifugační zkumavky. Zbytek sondy vraťte rychle do mrazáku.
- Sondu a sklíčko se vzorkem umístěte na varnou desku a přehřejte po dobu 5 minut při teplotě 37 °C (±1 °C).
- Kápněte 10 µl směsi sondy na buněčný vzorek a opatrně jej překryjte krycím sklíčkem. Neprodyšně uzavřete pomocí lepidla na bázi kaučukového roztoku a nechte lepidlo úplně zaschnout.

Denaturace

- Zahříváním sklíčka na varné desce po dobu 2 minut při teplotě 75 °C (±1 °C) vzorek a sondu souběžně denaturujte.

Hybridizace

- Sklíčko uložte na noc do vlhké neprůsvitné nádoby při teplotě 37 °C (±1 °C).

Post-hybridizační vymývání

- Vyjměte DAPI z mrazáku a nechte ho ohřát na pokojovou teplotu.
- Opatrně sejměte krycí sklíčko a odstraňte všechny zbytky lepidla.
- Sklíčko ponořte na 2 minuty do roztoku 0,4xSSC (pH 7,0) při teplotě 72 °C (±1 °C). Neprotřepávejte.
- Sklíčko osušte a na 30 sekund ponořte do roztoku 2xSSC, 0,05% Tween-20 při pokojové teplotě (pH 7,0). Neprotřepávejte.
- Sklíčko osušte a na každý vzorek naneste 10 µl barviva DAPI antifade.
- Přikryjte krycím sklíčkem, odstraňte veškeré bubliny, uložte do temna a po dobu 10 minut nechte vyvíjet barvu.
- Zkontrolujte fluorescenčním mikroskopem (viz **Doporučení k fluorescenčnímu mikroskopu**).

Doporučení pro zpracování

- Vypalování nebo stárnutí sklíček může redukovat fluorescenční signál.
- Podmínky hybridizace mohou být nepříznivě ovlivněny použitím reagentů, které nejsou dodány nebo doporučeny společností Cytocell Ltd.
- K měření teplot roztoků, vodních lázní a inkubátorů používejte kalibrovaný teploměr, protože tyto teploty jsou velmi důležité k zajištění optimální funkce produktu.

- Koncentrace promývacího roztoku, pH a teploty jsou důležité, protože nedostatečná důslednost může vést k nespecifickému navázání sondy a přílišná důslednost naopak k absenci signálu.
- Neúplná denaturace může vést k nedostatečnému signálu a příliš dlouhá denaturace může rovněž způsobit nespecifické vázání.
- Nadměrná hybridizace může způsobit dodatečné nebo neočekávané signály.
- Před použitím testu k diagnostickým účelům musí uživatelé optimalizovat protokol pro své vlastní vzorky.
- Neoptimální podmínky mohou vést k nespecifickému vázání, které může být nesprávně interpretováno jako signál sondy.

Interpretace výsledků

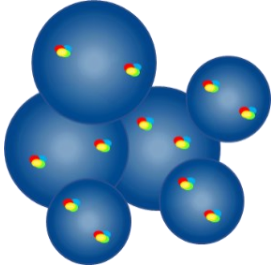
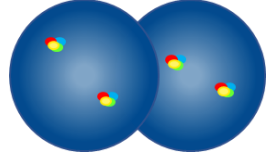
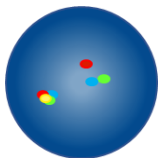
Vyhodnocení kvality sklíčka

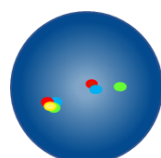
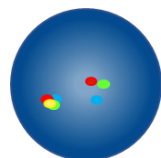
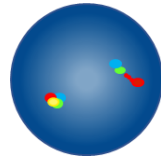
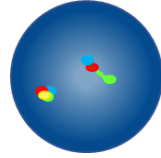
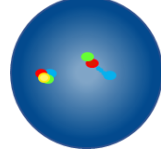
Sklíčko by se nemělo analyzovat, jestliže:

- jsou signály příliš slabé a nelze je proto analyzovat jednoduchými filtry – pro pokračování v analýze musí být signály jasné, výrazné a snadno hodnotitelné;
- analýze brání velký počet shluků buněk nebo překrývajících se buněk;
- nebylo hybridizováno > 50 % buněk;
- mezi buňkami se nachází příliš mnoho fluorescenčních částic a/nebo fluorescenčního zákalu, který ruší signály – u optimálních sklíček by mělo být pozadí tmavé nebo černé a čisté;
- není možné rozlišit hranice buněčných jader a hranice nejsou nepoškozené.

Pokyny pro analýzu

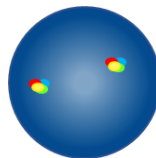
- Každý vzorek musí analyzovat a vyhodnotit dva analytici. Jakékoliv nesrovnalosti se musí vyřešit hodnocením třetího analytika
- Všichni analytici musí mít odpovídající kvalifikaci v souladu s uznávanými národními standardy
- Všichni analytici musí provést nezávislé hodnocení 100 jader každého vzorku. První analytik musí začít provádět analýzu z levé strany sklíčka a druhý analytik z pravé strany
- Každý analytik musí zdokumentovat své výsledky na samostatných listech
- Analyzujte pouze nepoškozená jádra, nikoli překrývající se nebo nahromaděná jádra ani jádra překrytá cytoplazmatickým odpadem či jádra s vysokým stupněm autofluorescence
- Vyhnete se místům, kde je příliš mnoho cytoplazmatického odpadu nebo kde se vyskytuje nespecifická hybridizace
- Intenzita signálu se může lišit, dokonce i v rámci jediného jádra. V takových případech použijte jednoduché filtry a/nebo upravte ohniskovou rovinu
- Za neoptimálních podmínek se mohou signály jevit jako rozptýlené. Jestliže se dva signály stejné barvy vzájemně dotýkají nebo je mezi nimi vzdálenost menší než dvě šířky signálu, případně pokud dva signály spojuje slabý pruh, počítejte je jako jeden signál
- Pokud není při analýze třibarevných zlomových sond mezi kterýmkoli ze 3 signálů (červený, zelený, aqua) mezera větší než 2 signály na šířku, počítejte to jako nepřeskupený/fúzní signál.
- Pokud si nejste jisti, zda lze buňku analyzovat, či nikoli, analýzu neprovádějte

Pokyny pro analýzu	
	Nepočítejte – jádra jsou příliš těsně u sebe, takže není možno určit hranice
	Nepočítejte překrývající se jádra – nejsou viditelné všechny oblasti obou jader
	Počítejte jako 2 fúzní signály – mezera mezi červeným a zeleným/aqua signálem je menší než dvě šířky signálu.

	Počítejte jako 2 fúzní signály – mezera mezi zeleným a červeným/aqua signálem je menší než dvě šířky signálu.
	Počítejte jako 2 fúzní signály – mezera mezi aqua a červeným/zeleným signálem je menší než dvě šířky signálu.
	Počítejte jako 2 fúzní signály – červený signál je vpravo nahoře difúzní.
	Počítejte jako 2 fúzní signály – zelený signál je vpravo nahoře difúzní.
	Počítejte jako 2 fúzní signály – aqua signál je vpravo nahoře difúzní.

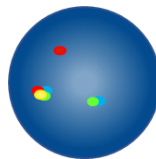
Předpokládané výsledky

Předpokládaný normální vzor signálu

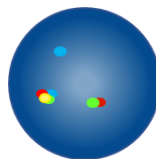


U normální buňky se předpokládají dva červené/zelené/aqua fúzní signály (2ČZA).

Předpokládané abnormální vzory signálu



V buňce s $t(3;3)(q21;q26.2)$ nebo $t(3;v)(q26.2;v)$, s body zlomu distálně od zelené sondy, bude očekávaný vzor signálu jeden červený/zelený/aqua fúzní signál, jeden zelený/aqua fúzní signál a jeden červený signál (1ČZA1ZA1Č).



V buňce s $inv(3)(q21q26.2)$ nebo $t(3;v)(q26.2;v)$, s body zlomu proximálně od zelené sondy, bude očekávaný vzor signálu jeden červený/zelený/aqua fúzní signál, jeden červený/zelený fúzní signál a jeden aqua signál (1ČZA1ČZA1A).

U aneuploidních/nevyvážených vzorků jsou možné jiné vzory signálu.

Známé relevantní interference / interferující látky

Nejsou známy žádné relevantní interference / interferující látky.

Zkřížená reaktivita není známa.

Hlášení závažných událostí

Pro pacienta / uživatele / třetí stranu v Evropské unii a v zemích se shodným regulačním režimem (nařízení (EU) 2017/746 o diagnostických zdravotnických prostředcích *in vitro*). Pokud během používání tohoto prostředku nebo v důsledku jeho používání došlo k závažné události, nahláste ji výrobci a svému příslušnému národnímu orgánu.

Pokud došlo k závažným událostem v jiných zemích, nahláste je výrobci a případně svému příslušnému národnímu orgánu.

Kontaktní osoba pro vigilanci výrobce: vigilance@oqt.com

Pro příslušné národní orgány v EU je seznam kontaktních míst pro vigilanci k dispozici na adrese:

https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

Specifické funkční charakteristiky

Analytická specifická

Analytická specifická je definována jako procento signálů, které hybridizují do správného loku a na žádné jiné místo. Byly analyzovány dva chromozomální lokusy v každé z dvaceti metafázových buněk z pěti vzorků, což znamená celkem 200 datových bodů na složku. Bylo zmapováno umístění všech hybridizovaných sond a byl zaznamenán počet FISH signálů metafázových chromozomů hybridizovaných na správný lokus.

Analytická specifická jednotlivých sond v sadě byla vypočtena jako počet signálů FISH metafázového chromozomu hybridizovaných na správný lokus vydělený celkovým počtem hybridizovaných FISH signálů metafázového chromozomu, tento výsledek byl vynásoben číslem 100 a vyjádřen jako procento s 95% intervalem spolehlivosti.

Tabulka 1. Analytická specifická sondy EV11 (MECOM) Breakapart Probe

Cíl	Počet hybridizovaných metafázových chromozomů	Počet správně hybridizovaných lokusů	Analytická specifická	Interval spolehlivosti 95 %
3q26.2	200	200	100 %	98,12 % – 100 %
3q26.2	200	200	100 %	98,12 % – 100 %
3q26.2	200	200	100 %	98,12 % – 100 %

Analytická citlivost

Analytická citlivost je procento započítatelných interfázových buněk s předpokládaným normálním vzorem signálu. U každé z 25 fixovaných buněčných suspenzí z kostní dřeně, které byly považovány za negativní na přeskupení MECOM, bylo analyzováno minimálně 200 interfázových buněk, což pro každý typ vzorku znamenalo minimálně 5 000 hodnocených jader. Byly analyzovány údaje o citlivosti na základě procenta buněk vykazujících normální předpokládaný vzor signálu, a byly vyjádřeny jako procento s 95% intervalem spolehlivosti.

Tabulka 2. Analytická citlivost sondy EV11 (MECOM) Breakapart Probe

Typ vzorku	Kritéria citlivosti	Výsledek citlivosti
Kostní dřeň	> 95 %	99,14 % (98,89 % – 99,39 %)

Charakteristika normálních mezních hodnot

Normální mezní hodnoty jsou definovány jako procento buněk vykazujících falešně pozitivní vzor signálu, při němž by hodnota u pacienta byla považována za normální a neodpovídala klinické diagnóze. U každé z 25 vzorků kostní dřeně, které byly považovány za negativní na přeskupení MECOM bylo analyzováno minimálně 200 interfázových buněk, což pro každý typ vzorku znamenalo minimálně 5 000 hodnocených jader.

Mezní hodnota byla určena pomocí funkce β -inverse (BETAINV) v aplikaci MS Excel. Byla vypočtena jako procento interfázových buněk vykazujících falešně pozitivní vzor signálu pomocí horní hranice jednostranného 95% intervalu spolehlivosti binomického rozdělení u vzorku normálního pacienta.

Tabulka 3. Charakteristika normálních mezních hodnot sondy EV11 (MECOM) Breakapart Probe

Typ vzorku	Mezní výsledek
Kostní dřeň	4 %

Laboratoře si musejí ověřit mezní hodnoty za použití vlastních dat.^{5,6}

Reprodukovatelnost

Byly provedeny studie reprodukovatelnosti za účelem zjištění:

- Reprodukovatelnosti na 3 pracovištích v rámci jednoho dne (mezi vzorky)
- Reprodukovatelnosti na 3 pracovištích v rámci různých dnů (mezi dny)
- Reprodukovatelnosti na 3 pracovištích v rámci různých pracovišť (mezi pracovišti)
- Reprodukovatelnosti na jednom pracovišti v rámci různých šarží (mezi šaržemi)

Reprodukovatelnost byla stanovena 3 nezávislými laboratořemi, které testovaly celkem 12 zaslepených vzorků, 6 na jeden vzor (2 negativní na přeskupení, 2 vzorky s nízkou pozitivitou, které odpovídaly 1- až 3násobku mezní hodnoty, a 2 vzorky s vysokou pozitivitou, které obsahovaly více než 45 % buněk pozitivních

na přeskupení). Analýza byla provedena pomocí 2 opakovaní jednotlivých vzorků v průběhu 5 dnů, které nenásledovaly po sobě.

Všechny 3 laboratoře prováděly testování v rámci stejného dne, v rámci různých dnů a v rámci různých laboratoří s použitím stejné šarže sondy, přičemž jedna z laboratoří také provedla testování reprodukovatelnosti v různých šaržích, kdy použila 3 různé šarže sondy.

Výsledky byly prezentovány jako všeobecná shoda s předpovídanou negativní klasifikací (u negativních vzorků) a předpovídanou pozitivní klasifikací (u pozitivních vzorků).

Tabulka 4a. Reprodukovatelnost a přesnost pro sondu EV11 (MECOM) Breakapart Probe – vzor inverzního signálu

Proměnná	Typ vzorku	Shoda
Reprodukovatelnost v rámci jednoho dne (mezi vzorky), v rámci různých dnů (mezi dny), v rámci různých pracovišť (mezi pracovišti)	Negativní kostní dřeň	100 %
	Kostní dřeň s nízkou pozitivitou	63 %
	Kostní dřeň s vysokou pozitivitou	100 %
Reprodukovatelnost v různých šaržích (mezi šaržemi)	Negativní kostní dřeň	92 %
	Kostní dřeň s nízkou pozitivitou	67 %
	Kostní dřeň s vysokou pozitivitou	100 %

Tabulka 4b. Reprodukovatelnost a přesnost pro sondu EV11 (MECOM) Breakapart Probe – vzor translokačního signálu

Proměnná	Typ vzorku	Shoda
Reprodukovatelnost v rámci jednoho dne (mezi vzorky), v rámci různých dnů (mezi dny), v rámci různých pracovišť (mezi pracovišti)	Negativní kostní dřeň	100 %
	Kostní dřeň s nízkou pozitivitou	98 %
	Kostní dřeň s vysokou pozitivitou	100 %
Reprodukovatelnost v různých šaržích (mezi šaržemi)	Negativní kostní dřeň	100 %
	Kostní dřeň s nízkou pozitivitou	100 %
	Kostní dřeň s vysokou pozitivitou	100 %

Byla provedena dodatečná studie reprodukovatelnosti za účelem doplnění výsledků s nízkou pozitivitou pro vzor inverzního signálu pomocí 2 vzorků s různými nízkými hladinami positivity (2x a 4x mezní hodnota) a 1 negativního vzorku pro stanovení:

- Reprodukovatelnosti na jednom pracovišti v rámci jednoho dne (mezi vzorky)
- Reprodukovatelnosti na jednom pracovišti v rámci různých dnů (mezi dny)
- Reprodukovatelnost na jednom pracovišti u různých pracovníků (mezi pracovníky)

Reprodukovatelnost byla stanovena pomocí 1 šarže sondy, vyhodnocena na 2 opakování každého vzorku, testována po dobu 5 dnů, které nenásledovaly po sobě, 2 různými pracovníky.

Výsledky byly prezentovány jako celková shoda s předpovídanou pozitivní klasifikací (u pozitivních vzorků).

Tabulka 4c. Další podpůrná data pro reprodukovatelnost a přesnost pro sondu EV11 (MECOM) Breakapart Probe – vzor inverzního signálu

Proměnná	Typ vzorku	Shoda
Reprodukovatelnost v rámci jednoho dne (mezi vzorky), v rámci různých dnů (mezi dny), u různých pracovníků (mezi pracovníky)	Kostní dřeň s nízkou pozitivitou (2x mezní hodnota)	100 %
	Kostní dřeň s nízkou pozitivitou (4x mezní hodnota)	100 %

Klinická funkce

Aby bylo zajištěno, že produkt odhalí záměrná přeskupení, byla pro tento produkt stanovena klinická funkce pomocí 3 studií na reprezentativních vzorcích určené populace: Hematologicky odvozené buněčné suspenze fixované v Carnoyově fixačním roztoku (směs metanolu a kyseliny octové v poměru 3 : 1) od pacientů s potvrzenou nebo suspektní akutní myeloidní leukémií (AML) nebo myelodysplastickým syndromem (MDS). Studie zpracovala kombinovaný vzorek sto osmnácti (118) vzorků, přičemž cizlovou populaci tvořilo sedm (7) translokačně pozitivních a sto jedenáct (111) translokačně negativních vzorků a kombinovaný vzorek sto devatenácti (119) vzorků zahrnující sto jedenáct (111) inverzně negativních a osm (8) inverzně pozitivních vzorků. Výsledky byly porovnány se známým stavem vzorku. Bylo zjištěno, že shoda/neshoda výsledků splňuje kritéria přijatelnosti pro tuto studii.

Výsledky těchto testů byly analyzovány, aby poskytl hodnoty klinické citlivosti, klinické specifické a míru falešné positivity (FPR) pozitivních signálů pomocí jednodimenzního přístupu.

Tabulka 5. Klinická funkce pro sondu EV11 (MECOM) Breakpart Probe – translokace

Proměnná	Výsledek
Klinická senzitivita (míra skutečné pozitivity, TPR)	99,94 %
Klinická specifická (míra skutečné negativity, TNR)	99,97 %
Míra falešné pozitivity (FPR) = 1 – specifická	0,03 %

Tabulka 6. Klinická funkce pro sondu EV11 (MECOM) Breakpart Probe – inverze

Proměnná	Výsledek
Klinická senzitivita (míra skutečné pozitivity, TPR)	96,26 %
Klinická specifická (míra skutečné negativity, TNR)	99,28 %
Míra falešné pozitivity (FPR) = 1 – specifická	0,72 %

Souhrn bezpečnosti a funkce (SSP)

SSP je zpřístupněn veřejnosti prostřednictvím evropské databáze zdravotnických prostředků (Eudamed), kde je propojen se základním UDI-DI.

Eudamed URL: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Základní UDI-DI: 50558449LPH036JL

Pokud není systém Eudamed plně funkční, musí být dokument SSP zpřístupněn veřejnosti na základě žádosti zasláné e-mailem na adresu SSP@ogt.com.

Další informace

Další informace o produktu vám sdělí oddělení technické podpory společnosti CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048








E-mail: techsupport@cytozell.com








W: www.ogt.com

Reference

1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Haematolymphoid tumours* [Internet; beta version ahead of print]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2022 [cited 2023 December 21]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 11). Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
2. Ottema et al. Atypical 3q26/MECOM rearrangements genocopy inv(3)(t(3;3)) in acute myeloid leukemia. *Blood* (2020)136(2):224–234.
3. Rack et al., *Leukemia* (2019) 33:1851–1867
4. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
5. Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. *Genet Med*. 2011;13(7):667-675.
6. Wiktor AE, Dyke DL, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. *Genetics in Medicine*. 2006;8(1):16–23.

Slovníček symbolů

EN ISO 15223-1:2021 – „Zdravotnické prostředky – Značky používané s informacemi poskytovanými výrobcem – Část 1: Obecné požadavky“ (© International Organization for Standardization)		
Symbol	Název	Referenční číslo/čísla
	cs: Výrobce	5.1.1
	cs: Zplnomocněný zástupce v Evropském společenství / Evropské unii	5.1.2
	cs: Datum spotřeby	5.1.4
	cs: Kód šarže	5.1.5
	cs: Katalogové číslo	5.1.6
	cs: Chraňte před slunečním světlem	5.3.2
	cs: Omezení teploty	5.3.7

	cs: Viz návod k použití	5.4.3
 ogt.com/IFU	cs: Viz elektronický návod k použití	5.4.3
	cs: Upozornění	5.4.4
	cs: Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>	5.5.1
	cs: Obsah dostačuje k provedení <n> testů	5.5.5
	cs: Jedinečný identifikátor prostředku	5.7.10
Symbole EDMA pro IVD reagencie a složky, revize říjen 2009		
Symbol	Název	Referenční číslo/čísla
	cs: Obsah (nebo obsahuje)	N/A

Patenty a ochranné známky

CytoCell je registrovaná ochranná známka společnosti CytoCell Limited.



CytoCell Limited

Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
SPOJENÉ KRÁLOVSTVÍ

T: +44 (0)1223 294048

F: +44 (0)1223 294986

E-mail: probes@cytozell.com

W: www.ogt.com



Sysmex Europe SE

Bornbarch 1
22848 Norderstedt
NĚMECKO

T: +49 40 527260

W: www.sysmex-europe.com

Historie verzí IFU

V001 2024-02-05: Nový IFU z důvodu nařízení (EU) 2017/746