



A Sysmex Group Company



Lietošanas instrukcijas

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

Zonde EVI1 (MECOM) Breakapart Probe



TIKAI PROFESIONĀLAM LIETOJUMAM



Papildinformācija un informācija citās valodās ir pieejama vietnē ogt.com/IFU

Paredzētais lietošanas mērķis

Zonde CytoCell® EVI1 (MECOM) Breakapart Probe ir kvalitatīvs, neautomatizēts fluorescences *in situ* hibridizācijas (fluorescence in situ hybridisation, FISH) tests, kas paredzēts hromosomālo pārkārtojumu, kas ietver 3. hromosomas reģionu 3q26.2, noteikšanai Karnuā šķīdumā (3:1 metanols/etiķskābe) fiksētās hematoloģiski iegūtās šūnu suspensijās no pacientiem, kuriem ir konstatēta akūta mieloleikoze ar MECOM pārkārtojumu (AML), mielodisplastiskās neoplazmas (MDS) vai arī pastāv aizdomas par to esamību.

Lietošanas indikācijas

Šī ierīce ir paredzēta kā citu klīnisko un histopatoloģisko testu papildinājums atzītās diagnostikas un klīniskās aprūpes metodēs, kad informācija par MECOM pārkārtojuma statusu ir svarīga klīniskajai pārvaldībai.

Ierobežojumi

Šī ierīce ir paredzēta pārkārtojumu ar pārtraukumpunktiem noteikšanai reģionā, ko ietver sarkanie, zilie un zīļie kloni šajā zonu komplektā, kurā ietilpst MECOM reģions (zaļā zonde), reģions telomēri MECOM gēnam (sarkanā zonde) un reģions centromēri MECOM gēnam (zilā zonde). Izmantojot šo ierīci, var netikt noteikti pārtraukumpunkti ārpus šiem reģioniem vai pārkārtojumu varianti, kas pilnībā ietilpst šajā reģionā.

Šī ierīce nav paredzēta: izmantošanai autonoma diagnostikas līdzekļa statusā, papildu diagnostikas nolūkā, prenatalai testēšanai, konkrētu populāciju skrīningam, testēšanai ārpus laboratorijas un paštēšanai.

Šī ierīce nav validēta paraugu veidiem, slimību tipiem vai mērķiem, kas neatbilst paredzētajam lietošanas mērķim.

Tā ir paredzēta kā citu diagnostisko laboratorijas testu palīg līdzeklis, un lēmumus par terapiju nedrīkst pieņemt, vadoties tikai pēc FISH testa rezultātiem.

Ziņošana par FISH testa rezultātiem un to interpretēšana ir jāveic atbilstoši kvalificētam personālam saskaņā ar profesionālajiem prakses standartiem, un ir jāņem vērā citu testu rezultāti, klīniskā un diagnostikas informācija.

Šī ierīce ir paredzēta tikai profesionālam lietojumam laboratorijā. Protokola neievērošana var ietekmēt veikspēju, un var tikt iegūti kļūdaini pozitīvi vai kļūdaini negatīvi rezultāti.

Testa principi

Fluorescences *in situ* hibridizācija (fluorescence in situ hybridisation, FISH) ir metode, kas ļauj noteikt DNS sekvenču metafāzu hromosomās vai starpfāzes kodolos fiksētiem citogēnētiskiem paraugiem. Šajā metodē tiek izmantotas DNS sondes, kas hibridizējas ar veselām hromosomām vai atsevišķām unikālām sekvencēm un kalpo kā efektīvs G joslu citogēnētiskās analīzes palīg līdzeklis. Šo metodi tagad var lietot kā būtisku izmeklēšanas instrumentu prenatalajā, hematoloģiskajā un solidu audzēju hromosomālajā analīzē. Mērķa DNS pēc fiksācijas un denaturēšanas ir pieejama hibridizācijai ar līdzīgi denaturētu DNS zondi ar fluorescentu marķējumu, kurai ir papildu sekvenču. Pēc hibridizācijas nesaisītā un nespecifiski saistītā DNS zonde tiek izvilktā un DNS tiek kontrastēta

vizualizācijai. Pēc tam, izmantojot fluorescences mikroskopiju, hibridizēto zondi var vizualizēt mērķa materiālā.

Informācija par zondi

MECOM (MDS1 un EVI1 kompleksā lokusa) onkogēns, kas atrodas 3q26.2, bieži ir pārkārtots mieloidās izcelsmes ļaundabīgos hematoloģiskajos jaunveidojumos, tostarp mielodisplastiskās neoplazmas (MDS) un akūtā mieloleikoze ar MECOM pārkārtojumu (AML). Tā ekspresija neoplastiskajās mieloidajās šūnās pārtrauc mieloido diferenciāciju, šūnu cikla regulēšanu un šūnu signālu ceļus¹.

Šis deregulētās ekspresijas izraisītājs bieži ir hromosomālais pārkārtojums, kurā iesaistīts 3q26.2, un divas visbiežāk sastopamās (~ 40 %) aberācijas ir t(3;3)(q21;q26.2) un inv(3)(q21q26.2)¹. Ir aprakstīti vairāk nekā 30 papildu 3q26.2 pārkārtojumi, lielākā daļa no tiem ir raksturīgi molekulārajā līmenī¹.

Translokāciju un inversiju pārtraukumpunkti ir ļoti atšķirīgi. MECOM pārkārtojumi ir ļoti heterogēni, un to noteikšana var būt apgrūtināta, izmantojot standarta citogēnētiskās metodes, tādēļ FISH ir noderīgs instruments šo pārkārtojumu noteikšanā. Varianta t(3;v)(q26.2;v) pārtraukumpunktu reģioni var sniegties no 3' proksimāli no MECOM līdz 5' distāli no MDS1-EVI1 promotera, ko ietver zaļā zonde. Tāpēc paredzamais signālu modelis šim translokācijām mainās atkarībā no pārtraukumpunkta pozīcijas². MECOM pārkārtojumu testēšanu ir ieteicams veikt gan MDS, gan arī AML³.

AML ar MECOM pārkārtojumu ir agresīva slimība ar mazu izdzīvojamību neatkarīgi no blastu procentuālās vērtības, un nav atšķirības rezultātos gadījumos ar inv(3)/t(3;3) salīdzinājumā ar MECOM pārkārtojumiem ar citiem partneriem¹. MDS riska stratificēšana ietver dažādus mainīgos, piem., vecumu, citopēnijas smaguma pakāpi un citogēnētiskos konstatējumus¹.

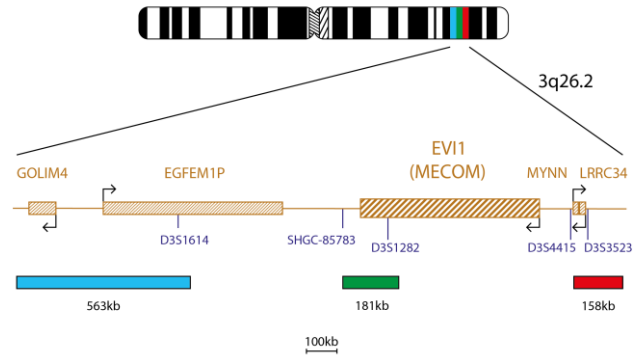
Zondes specifikācija

EVI1, 3q26.2, sarkana

EVI1, 3q26.2, zaļa

EVI1, 3q26.2, zila

CMP-H021 v008.00



EVI1 zonžu maisījuma sarkano komponentu veido 158 kb zonde, kas atrodas telomēriski attiecībā pret D3S4415 marķieri un ietver LRR34 gēnu. Zaļais komponents nosedz 181 kb reģionu, kurā ietilpst EVI1 (MECOM) gēna centromēriskā daļa un kura plešas aiz marķiera D3S1282. Zilais komponents nosedz 563 kb reģionu, kas atrodas centromēriski attiecībā pret EVI1 gēnu un kurā ietilpst marķieris D3S1614.

Nodrošinātie materiāli

Zonde: 50 µL flakonā (5 testi) vai 100 µL flakonā (10 testi)

Zondes tiek nodrošinātas iepriekš sajauktā veidā hibridizācijas šķīdumā (< 65 % formamīds; < 20 mg dekstrāna sulfāts; < 10 % 20x citrāta fizioloģiskais šķīdums (salīne-sodium citrate — SSC)) un ir gatavas lietošanai.

Kontrasta krāsviela: 150 µL flakonā (15 testi)

Kontrasta krāsviela ir DAPI luminiscences uzturēšanas šķīdums ES (0,125 µg/mL DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindols) šķīdumā uz glicerīna bāzes).

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

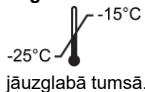
1. Lietošanai *in vitro* diagnostikā. Tikai profesionālam lietojumam laboratorijā.
2. Zondes maisījumos ietilpst formamīds, kas ir teratogēns, tādēļ nedrīkst pieļaut izgarojumu ieelpošanu un nonākšanu saskarē ar ādu. Lietojot ievērojiet piesardzību; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku.
3. Rīkojieties ar DAPI piesardzīgi; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku.
4. Nelietot, ja flakons(-) ir bojāts(-) vai flakona saturs jebkāda veidā ir bojāts.
5. Izpildiet vietējos utilizācijas noteikumus, kā arī drošības datu lapā sniegtos ieteikumus par drošu šī produkta utilizāciju. Tas attiecas arī uz bojātu testa komplekta saturu.
6. Utilizējiet visus izmantotos reaģentus un jebkādus citus piesārņotus vienreizlietojamus materiālus, ievērojot procedūras attiecībā uz infekcioziem vai potenciāli infekcioziem atkritumiem. Katra laboratorija ir atbildīga par rīcību ar cietajiem un šķidrājiem atkritumiem atbilstoši to veidam un bīstamības pakāpei, kā arī par to apstrādi un utilizāciju (līdz šim un turpmāk) saskaņā ar spēkā esošajiem noteikumiem.
7. Operatoriem jāspēj atšķirt sarkano, zilo un zaļo krāsu.
8. Neievērojot norādīto protokolu un norādījumus par reaģentiem, var tikt ietekmēta veikspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi/negatīvi rezultāti.
9. Zondi nedrīkst atšķaidīt vai veidot maisījumus ar citām zondēm.

10. Ja protokola iepriekšējās denaturēšanas fāzes laikā netiek izmantoti 10 µL no zondes, var tikt ietekmēta veikspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi/negatīvi rezultāti.
11. Pirms lietošanas visi produkti ir jāapstiprina.
12. Iekšējās kontroles jāveic, testēšanas paraugos izmantojot neietekmētas šūnu populācijas.

Temperatūras definīcijas

- -20 °C/sasaldēts/saldētavā: No -25 °C līdz -15 °C
- 37 °C: +37 °C ± 1 °C
- 72 °C: +72 °C ± 1 °C
- 75 °C: +75 °C ± 1 °C
- Istabas temperatūra (Room Temperature — RT): No +15 °C līdz +25 °C

Uzglabāšana un lietošana

 Komplekts ir jāglabā saldētavā temperatūrā no -25 °C līdz -15 °C līdz pat derīguma termiņa beigu datumam, kas norādīts uz komplekta etiķetes. Zondes un kontrasta krāsvielas flakoni ir jāuzglabā tumsā.



FISH zonde, DAPI Antifade ES kontrastviela un hibridizācijas šķīdums paliek stabili visos sasaldēšanas-atkausēšanas ciklos parastās lietošanas laikā (kur viens cikls ir flakona izņemšana no saldētavas un ievietošana tajā atpakaļ) — 5 cikli 50 µL (5 testi) FISH zondes flakonam, 10 cikli 100 µL (10 testi) FISH zondes flakonam un 15 cikli 150 µL (15 testi) kontrastvielas flakonam. Pēc iespējas jāsamazina gaismas iedarbība un jāizvairās no tās, kad vien iespējams. Uzglabājiet komponentus nodrošinātājā gaismas necaurīdīgā konteinerā. Komponenti, kas izmantoti un uzglabāti apstākļos, kas nav norādīti marķējumā, var nedarboties, kā paredzēts, un tie var negatīvi ietekmēt analīzes rezultātus. Ir jādarbojas iespējami, lai ierobežotu gaismas un temperatūras svārstību ietekmi.

Aprīkojums un materiāli, kas ir nepieciešami, bet nav iekļauti komplektācijā

Ir jāizmanto kalibrēts aprīkojums:

1. Sildierīce (ar cietu sildvirsmu un precīzu temperatūras regulēšanu līdz pat 80 °C)
2. Kalibrētas mainīga tilpuma mikropipetes un uzgaļi 1–200 µL diapazonā
3. Ūdens vanna ar precīzu temperatūras regulēšanu 37 °C un 72 °C
4. Mikrocentrifūgas mēģenes (0,5 mL)
5. Fluorescences mikroskops (sk. sadaļu "Uz fluorescences mikroskopu attiecināmie ieteikumi")
6. Fažu kontrasta mikroskops
7. Tīri plastmasas, keramikas vai karstumizturīga stikla Koplina trauki
8. Pincete
9. Kalibrēta pH mērierīce (vai pH indikatora strēmeles, ar kurām var veikt mērījumus pH 6,5–8,0 diapazonā)
10. Konteiners ar mitru vidi
11. Fluorescencei atbilstoša mikroskopa objektīva iegremdēšanas eļļa
12. Galda centrifūga
13. Mikroskopa priekšmetstikliņi
14. 24x24 mm segstikliņi
15. Taimeris
16. 37 °C inkubators
17. Gumijas līme
18. Virpuļmaisītājs
19. Mērcilindri
20. Magnētiskais maisītājs
21. Kalibrēts termometrs

Papildaprīkojums, kas nav ietverts komplektācijā

1. Citoģenētiskā žāvēšanas kamera

Nepieciešamie reaģenti, kas nav ietverti komplektācijā

1. 20x citrāta fizioloģiskais šķīdums (saline-sodium citrate — SSC)
2. 100 % etanols
3. Tween-20
4. 1M nātrija hidroksīds (NaOH)
5. 1M sāļsskābe (HCl)
6. Attīrīts ūdens

Uz fluorescences mikroskopu attiecināmie ieteikumi

Lai nodrošinātu optimālu vizualizāciju, izmantojiet 100 W dzīvsudraba spuldzi vai ekvivalentu gaismas avotu un eļļā iegremdējamus 60/63x vai 100x objektīvus. Šajā zonzu komplektā izmantotie fluorofori tiks ierosināti un izstaros tālāk norādītā garuma viļņos.

Fluorofors	Ierosme _{max} [nm]	Izstarošana _{max} [nm]
Zils	418	467
Zaļš	495	521
Sarkans	596	615

Pārlicinieties, vai mikroskops ir aprīkots ar iepriekš norādītajiem viļņa garumiem atbilstošiem ierosmes un izstarošanas filtriem.

Izmantojiet vienjoslas ūdens spektra filtru ūdens spektra optimālai vizualizācijai vai trīsjoslu sarkanā spektra/zaļā spektra/ūdens spektra filtru zaļo, sarkano un ūdens fluoroforu vienlaicīgai vizualizācijai.

Pirms lietošanas pārbaudiet fluorescences mikroskopu, lai pārlicinātos, vai tas darbojas pareizi. Izmantojiet iegremdēšanas eļļu, kas piemērota fluorescences mikroskopijai un nodrošina zemu automatiskās fluorescences līmeni. Izvairieties no DAPI luminiscences uzturēšanas šķīduma sajaukšanās ar mikroskopa iegremdēšanas eļļu, jo pretējā gadījumā radīsies signāla traucējumi. Rīkojieties atbilstoši ražotāja ieteikumiem attiecībā uz lampas un filtru kalpošanas ilgumu.

Paraugu sagatavošana

Šis komplekts ir paredzēts izmantošanai ar hematoloģiski iegūtām šūnu suspensijām, kas fiksētas Karnuā šķīdumā (3:1 metanols/etiķskābe), no pacientiem, kuriem ir konstatēta akūta mieloīda leikēmija (AML) vai mielodisplastiskās neoplazmas (MDS) vai arī pastāv aizdomas par to esamību, un kas ir sagatavotas atbilstoši laboratorijā vai iestādē spēkā esošajām vadlīnijām. Sagatavojiet gaisā nožāvētus paraugus uz mikroskopa priekšmetstikliņiem atbilstoši standartā citoģenētiskajām procedūrām. AGT *citoģenētiskās laboratorijas rokasgrāmata* ir ietverti ieteikumi par paraugu paņemšanu, kultivēšanu, ievākšanu un priekšmetstikliņu sagatavošanu⁴.

Šķīdumu sagatavošana

Etanola šķīdumi

Atšķaidiet 100 % etanolu ar attīrītu ūdeni atbilstoši tālāk norādītajām proporcijām un rūpīgi samaisiet.

- 70 % etanols — 7 daļas 100 % etanola un 3 daļas attīrīta ūdens
- 85 % etanols — 8,5 daļas 100 % etanola un 1,5 daļas attīrīta ūdens

Glabājiet šķīdumus līdz pat 6 mēnešiem istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

2xSSC šķīdums

Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 9 daļām attīrīta ūdens un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 nedēļu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

0,4xSSC šķīdums

Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 49 daļām attīrīta ūdens un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 nedēļu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

2xSSC, 0,05 % Tween-20 šķīdums

Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 9 daļām attīrīta ūdens. Pievienojiet 5 µL Tween-20 uz 10 mL un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 nedēļu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

Fluorescentās in situ hibridizācijas (FISH) protokols

(Piezīme. Nodrošiniet, lai zonde un kontrasta krāsviela pēc iespējas mazāk tiktu pakļauta laboratorijas apgaismojuma iedarbībai.)

Priekšmetstikliņa sagatavošana

1. Novietojiet šūnu paraugu uz mikroskopa priekšmetstikliņa, kas izgatavots no stikla. Ļaujiet nožūt. (**Pēc izvēles, ja izmanto citoģenētisko žāvēšanas kameru:** Lai nodrošinātu optimālu šūnu parauga sagatavošanu, kamera jādarbina, iestatot aptuveni 25 °C temperatūru un 50 % mitruma. Ja citoģenētiskā žāvēšanas kamera nav pieejama, kā alternatīvu var izmantot gāzu nosūcēju).
2. Iegremdējiet priekšmetstikliņu 2xSSC šķīdumā istabas temperatūrā 2 minūšu ilgumā, bez maisīšanas.
3. Veiciet dehidrēšanas etanolā sērijas (70 %, 85 % un 100 %), katru 2 minūtes istabas temperatūrā.
4. Ļaujiet nožūt.

Iepriekšēja denaturēšana

5. Izņemiet zondi no saldētavas un ļaujiet tai sasilt līdz istabas temperatūrai. Pirms mēģeņu lietošanas brīdī tās centrifugējiet.
6. Izmantojot pipeti, pārlicinieties, vai zondes šķīdums ir viendabīgi samaisīts.
7. Paņemiet 10 µL zondes šķīduma katram testam un pārnesiet to uz mikrocentrifūgas mēģeni. Atlikušo zondes šķīdumu nekavējoties ievietojiet atpakaļ saldētavā.
8. Novietojiet zondi un parauga priekšmetstikliņu uz sildierīces un veiciet priekšsildīšanu 37 °C (+/- 1 °C) temperatūrā 5 minūšu ilgumā.
9. Uzplīniet 10 µL zondes maisījuma uz šūnu parauga un uzmanīgi uzlieciet segstikliņu. Hermetizējiet ar gumijas līmi un ļaujiet līmei pilnībā nožūt.

Denaturēšana

10. Veiciet parauga un zondes vienlaicīgu denaturēšanu, sildot priekšmetstikliņu uz sildierīces 75 °C (+/- 1 °C) temperatūrā 2 minūšu ilgumā.

Hibridizācija

11. Ievietojiet priekšmetstikliņu gaismu necaurīdīgā konteinerā ar mitru vidi un atstājiet to 37 °C (+/- 1 °C) temperatūrā līdz nākamajai dienai.

Skalošana pēc hibridizācijas

12. Izņemiet DAPI no saldētavas un ļaujiet tam sasilt līdz istabas temperatūrai.
13. Noņemiet segstikliņu un rūpīgi notīriet visas līmes atliekas.
14. Iegremdējiet priekšmetstikliņu 0,4xSSC (pH 7,0) 72 °C (+/- 1 °C) temperatūrā 2 minūšu ilgumā, bez maisīšanas.
15. Noteciniet šķīdumu no priekšmetstikliņa un iegremdējiet to 2xSSC, 0,05 % Tween-20 šķīdumā istabas temperatūrā (pH 7,0) uz 30 sekundēm nemaisot.
16. Noteciniet šķīdumu no priekšmetstikliņa un katram paraugam pievienojiet 10 µL fluorescences uzturēšanas līdzekli ar DAPI.
17. Uzlieciet segstikliņu, izvadiet burbulus un ļaujiet krāsai tumsā attīstīties 10 minūtes.

18. Skatiet fluorescences mikroskopā (sk. **Uz fluorescences mikroskopu attiecināmie ieteikumi**).

Ieteikumi attiecībā uz procedūru

1. Priekšmetstikliņu karsēšana vai novecošana var samazināt signāla fluorescenci.
2. Tādu reaģentu izmantošana, kas nav uzņēmuma Cytocell Ltd. nodrošinātie vai ieteiktie reaģenti, var nelabvēlīgi ietekmēt hibridizācijas apstākļus.
3. Šķīdumu, ūdens vannu un inkubatoru temperatūras mērīšanai jāizmanto kalibrēts termometrs, jo norādītās temperatūras ievērošana ir kritiski svarīga produkta optimālas veiktspējas nodrošināšanai.
4. Skalošanas šķīdumu koncentrācijas, pH vērtības un temperatūras vērtības ir svarīgas, jo zemas pielaišanas gadījumā iespējama nespecifiska sasaiste, savukārt pārāk augsta pielaišanas gadījumā iespējama signāla nepietiekamība.
5. Nepilnīga denaturēšana var izraisīt signāla nepietiekamību, savukārt pārmērīga denaturēšana arī var izraisīt nespecifisku sasaisti.
6. Pārmērīga hibridizācijas dēļ iespējami papildu vai neparedzēti signāli.
7. Pirms testa izmantošanas diagnostikas nolūkiem lietotājiem ir jāveic protokola optimizācija atbilstoši saviem paraugiem.
8. Ja apstākļi nav pietiekami optimāli, iespējama nespecifiska sasaiste, kas var tikt nepareizi interpretēta kā zondes signāls.

Rezultātu interpretēšana

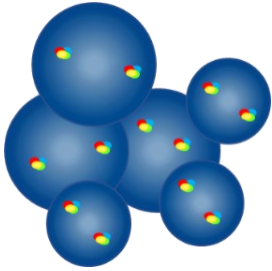
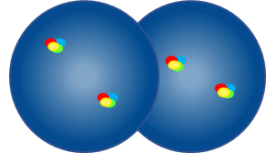
Sagatavotā priekšmetstikliņa ar paraugu kvalitātes novērtēšana

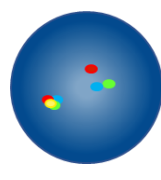
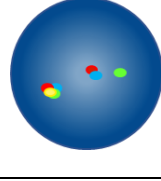
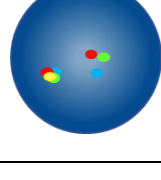
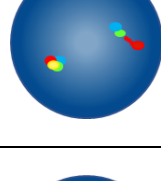
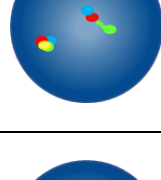

Paraugu nedrīkst analizēt tālāk norādītajos gadījumos.

- Signāli ir pārāk vāji analizēšanai atsevišķos filtros — lai veiktu analīzi, signāliem jābūt spilgtiem, labi izšķiramiem un viegli novērtējamiem
- Ir daudz salīpušu/pārklājošos šūnu, kas traucē veikt analīzi
- > 50 % šūnu nav hibridizētas
- Starp šūnām atrodas pārāk daudz fluorescences daļiņu un/vai fluorescences dūmakas, kas rada signāla traucējumus, — optimālā priekšmetstikliņā ar paraugu fonam jābūt tumšam vai melnam un tīram
- Šūnu kodolu robežas nav izšķiramas un nav veselas

Uz analīzi attiecināmās vadlīnijas

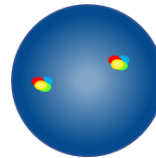
- Katra parauga analīzi un interpretēšanu ir jāveic diviem laboratorijas speciālistiem. Visas neatbilstības ir jānovērš, novērtēšanu veicot trešajam laboratorijas speciālistam
- Katram laboratorijas speciālistam jābūt attiecīgi kvalificētam atbilstoši spēkā esošajiem valsts līmeņa standartiem
- Katram laboratorijas speciālistam neatkarīgi jāveic novērtēšana 100 kodoliem no katra parauga. Pirmajam laboratorijas speciālistam jāskatās analīze no priekšmetstikliņa kreisās puses, savukārt otram laboratorijas speciālistam — no priekšmetstikliņa labās puses
- Katram laboratorijas speciālistam jādokumentē savi rezultāti atsevišķās lapās
- Ir jāanalizē tikai veseli kodoli, nevis pārklājošies kodoli, sablīvējušies kodoli vai kodoli, kurus sedz citoplazmatiskās atliekas vai augsta līmeņa automātiskā fluorescences
- Jāizvairās no zonām ar pārmērīgu citoplazmatisko atlieku apjomu vai nespecifisku hibridizāciju
- Signāla intensitāte var būt mainīga, pat vienā kodolā. Šādos gadījumos izmantojiet atsevišķus filtrus un/vai pielāgojiet fokālo plakni
- Ja apstākļi nav pietiekami optimāli, signāli var šķīst izkliedēti. Ja divi vienādas krāsas signāli savstarpēji saskaras vai attālums starp tiem nepārsniedz divus signāla platumus, vai arī abus signālus savieno tikko redzams pavediens, šie signāli ir uzskatāmi par vienu signālu.
- Analizējot trīskrāsu sadalīšanās zondes, ja attālums starp 3 signāliem (sarkanu, zaļu, zilu) nepārsniedz 2 signālu platumu, signāls ir uzskatāms par nepārkārtotu/saplūdušu signālu.
- Ja pastāv šaubas, vai šūna ir analizējama, neveiciet tās analīzi.

Uz analīzi attiecināmās vadlīnijas	
	Neskaitīt — kodoli atrodas pārāk tuvu viens otram, lai varētu noteikt to robežas
	Neskaitīt pārklājošos kodolus — nav redzamas visas abu kodolu zonas

	Skaitīt kā 2 fūzijas signālus — atstarpe starp sarkano un zaļo/zilo signālu ir mazāka par diviem zondes platumiem
	Skaitīt kā 2 fūzijas signālus — atstarpe starp zaļo un sarkano/zilo signālu ir mazāka par diviem zondes platumiem
	Skaitīt kā 2 fūzijas signālus — atstarpe starp zilo un sarkano/zaļo signālu ir mazāka par diviem zondes platumiem
	Skaitīt kā 2 fūzijas signālus — virs labās fūzijas sarkanais signāls ir difūzs
	Skaitīt kā 2 fūzijas signālus — virs labās fūzijas zaļais signāls ir difūzs
	Skaitīt kā 2 fūzijas signālus — virs labās fūzijas zilais signāls ir difūzs

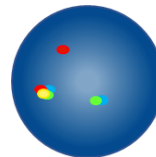
Paredzamie rezultāti

Paredzamais normālu signālu modelis

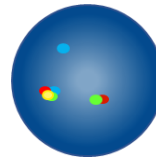


Normālā šūnā ir paredzami divi sarkani/zaļi/zili fūzijas signāli (2S2aZi).

Paredzamie anormālo signālu modeļi



Šūnā ar t(3;3)(q21;26.2) vai t(3;v)(q26.2;v), ar pārtraukuma punktiem distāli no zaļās zondes paredzamais signāla modelis būs viens sarkans/zaļš/zils fūzijas signāls, viens zaļš/zils fūzijas un viens sarkans signāls (1S2aZi1ZaZi1S).



Šūnā ar inv(3)(q21q26.2) vai t(3;v)(q26.2:v), ar pārtraukuma punktiem proksimāli sarkanajai zondei paredzamais signāla modelis būs viens sarkans/zaļš/zils fūzijas signāls, viens sarkans/zaļš fūzijas un viens zils signāls (1SZaZ1SZaZ1Zi).

Citi signālu modeļi ir iespējami aneiploidos/nelīdzsvarotos paraugos.

Zināmie būtiskie traucējumi/traucējošās vielas

Nav zināmu būtisku traucējumu/traucējošu vielu.

Nav zināmas krusteniskās reakcijas.

Ziņošana par nopietniem negadījumiem

Pacientam/lietotājam/trešajai personai Eiropas Savienībā un valstīs ar identisku tiesisko regulējumu (Regula (ES) 2017/746 par *In vitro* diagnostikas medicīniskām ierīcēm); ja šīs ierīces lietošanas laikā vai tās lietošanas rezultātā ir noticis nopietns negadījums, lūdz, ziņojiet par to ražotājam un valsts atbildīgajai iestādei.

Attiecībā uz nopietniem negadījumiem citās valstīs, lūdz, ziņojiet par to ražotājam un, ja paredzēts, savas valsts atbildīgajai iestādei.

Ražotāja uzraudzības kontaktinformācija: vigilance@oqt.com

ES valstu kompetentajām iestādēm kontaktpersonu medicīnas ierīču kontroles jautājumos saraksts ir atrodams šajā vietnē:

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

Specifiskās veikspējas raksturlielumi

Analītiskais specifiskums

Analītiskais specifiskums tiek definēts kā to signālu procentuālā vērtība, kas hibridizējas uz pareizo lokusu un nekādu citu vietu. Katrā no divdesmit metafāzes šūnām no pieciem paraugiem tika analizēti divi hromosomu lokusi, dodot 200 datu punktus vienam komponentam. Katras hibridizētās zondes atrašanās vieta ir kartēta, un ir ierakstīts metafāzes hromosomu luminiscentās in situ hibridizācijas (Fluorescence in situ hybridisation — FISH) signālu skaits, kas hibridizējās uz pareizo lokusu.

Katras komplekta zondes analītiskais specifiskums tika aprēķināts kā metafāzes hromosomu FISH signālu skaits, kas hibridizējās uz pareizo lokusu, dalīts ar kopējo metafāzes hromosomu FISH signālu kopējo skaitu, šis rezultāts tika sareizināts ar 100, izteikts kā procentuālā vērtība un dots ar 95 % ticamības intervālu.

1. tabula. Zondes EVI1 (MECOM) Breakapart Probe analītiskais specifiskums

Mērķis	Hibridizēto metafāzes hromosomu skaits	Pareizi hibridizēto lokusu skaits	Analītiskais specifiskums	95 % ticamības intervāls
3q26.2	200	200	100 %	98,12 %–100 %
3q26.2	200	200	100 %	98,12 %–100 %
3q26.2	200	200	100 %	98,12 %–100 %

Analītiskais jutīgums

Analītiskais jutīgums tiek izteikts kā novērtējamo starpfāzes šūnu ar paredzamu normālu signālu modeli procentuālā vērtība. Katrai no 25 fiksētām kaulu smadzeņu šūnu suspensijām, kas tika uzskatītas par negatīvām attiecībā uz MECOM pārkarājumu, tika analizētas vismaz 200 starpfāzes šūnas, rezultātā sniedzot vismaz 5000 kodolus katram parauga veidam. Jutīguma dati tika analizēti, pamatojoties uz šūnu procentuālo vērtību, kas parāda normālu paredzamo signālu modeli un tiek izteikti kā procentuālā vērtība ar 95 % ticamības intervālu.

2. tabula. Zondes EVI1 (MECOM) Breakapart Probe analītiskais jutīgums

Parauga veids	Jutīguma kritēriji	Jutīguma rezultāts
Kaulu smadzenes	> 95 %	99,14 % (98,89–99,39 %)

Normai atbilstošu robežvērtību raksturojums

Normai atbilstoša robežvērtība tiek definēta kā to šūnu procentuālā vērtība, kas uzrāda kļūdaini pozitīvu signālu modeli, kurā indivīds tiktu uzskatīts par normalitāti un neatbilstošs klīniskajai diagnozei. Katram no 25 kaulu smadzeņu paraugiem, kas tika atzīti par negatīviem attiecībā uz MECOM pārkarājumu, tika analizētas vismaz 200 starpfāzes šūnas, iegūstot vismaz 5000 kodolus katram parauga veidam.

Robežvērtība tika noteikta, programmā MS Excel izmantojot β inversijas (BETAINV) funkciju. Tā tika aprēķināta kā starpfāžu šūnu procentuālā vērtība, kas uzrāda kļūdaini pozitīvu signālu modeli, izmantojot binomiālās izplatības vienkusejās 95 % ticamības intervāla augšējo robežu normālā pacienta paraugā.

3. tabula. Zondes EVI1 (MECOM) Breakapart Probe normai atbilstošu robežvērtību raksturojums

Parauga veids	Robežvērtības rezultāts
Kaulu smadzenes	4 %

Laboratorijām jāveic robežvērtību verifikācija, izmantojot savus datus^{5,6}.

Reproducējamība

Reproducējamības pētījumi tika veikti, lai noteiktu:

- Reproducējamība vienā dienā 3 laboratorijās (paraugu līmenis)

- Reproducējamība starp testēšanas dienām 3 laboratorijās (dienas līmenis)
- 3 laboratoriju reproducējamību starp laboratorijām (laboratorijas līmeņa)
- Dažādu partiju reproducējamība vienā laboratorijā (partijas līmeņa)

Reproducējamība tika noteikta 3 atsevišķās laboratorijās, kurās tika testēti kopā 12 kodēti paraugi, 6 uz katru signāla modeli (2 negatīvi attiecībā uz pārkarājumu, 2 nedaudz pozitīvi paraugi, kas 1–3 reizes pārsniedza robežvērtību, un 2 augsta līmeņa pozitīvi paraugi, kuros vairāk nekā 45 % šūnu bija pozitīvas attiecībā uz pārkarājumu). Analīze tika veikta, izmantojot 2 katra parauga replikātus 5 neseicīgu dienu laikā.

Visās 3 laboratorijās veica testēšanu vienā dienā, starp testēšanas dienām un starp laboratorijām, izmantojot vienu zonu partiju, kā arī vienā no laboratorijām tika testēta dažādu partiju reproducējamība, izmantojot 3 dažādas zonu partijas.

Rezultāti tika pasniegti kā vispārēja konverģence ar prognozētu negatīvo klasi (negatīviem paraugiem) un prognozētu pozitīvu klasi (pozitīviem paraugiem).

4a. tabula Zondes EVI1 (MECOM) Breakapart Probe reproducējamība un precizitāte — inversijas signālu modelis

Mainīgais	Parauga veids	Konverģence
Reproducējamība vienā dienā (paraugu līmenis), starp testēšanas dienām (dienas līmenis) un starp laboratorijām (laboratorijas līmenis)	Kaulu smadzenes, negatīvs	100 %
	Kaulu smadzenes, zema līmeņa pozitīvi paraugi	63 %
	Kaulu smadzenes, augsta līmeņa pozitīvi paraugi	100 %
Dažādu partiju (partijas līmeņa) reproducējamība	Kaulu smadzenes, negatīvs	92 %
	Kaulu smadzenes, zema līmeņa pozitīvi paraugi	67 %
	Kaulu smadzenes, augsta līmeņa pozitīvi paraugi	100 %

4b. tabula Zondes EVI1 (MECOM) Breakapart Probe reproducējamība un precizitāte — translokācijas signālu modelis

Mainīgais	Parauga veids	Konverģence
Reproducējamība vienā dienā (paraugu līmenis), starp testēšanas dienām (dienas līmenis) un starp laboratorijām (laboratorijas līmenis)	Kaulu smadzenes, negatīvs	100 %
	Kaulu smadzenes, zema līmeņa pozitīvi paraugi	98 %
	Kaulu smadzenes, augsta līmeņa pozitīvi paraugi	100 %
Dažādu partiju (partijas līmeņa) reproducējamība	Kaulu smadzenes, negatīvs	100 %
	Kaulu smadzenes, zema līmeņa pozitīvi paraugi	100 %
	Kaulu smadzenes, augsta līmeņa pozitīvi paraugi	100 %

Tika veikts papildu reproducējamības pētījums, lai papildinātu inversijas signālu modeļa zema līmeņa pozitīvos rezultātus, izmantojot 2 paraugus ar atšķirīgiem zema līmeņa pozitīviem rezultātiem (2x un 4x pārsniedz robežvērtību) un 1 negatīvu paraugu tālāk norādīto parametru noteikšanai:

- Reproducējamība vienā dienā vienā laboratorijā (paraugu līmenis)
- Reproducējamība starp testēšanas dienām vienā laboratorijā (dienas līmenis)
- Reproducējamība ar dažādiem operatoriem vienā laboratorijā (operatora līmenis).

Reproducējamība tika noteikta, izmantojot 1 zondes partiju, kas novērtēta ar 2 katram parauga atkarīgiem, kurus 5 neseicīgas dienas testēja 2 dažādi operatori.

Rezultāti tika pasniegti kā vispārēja konverģence ar prognozētu pozitīvu klasi (pozitīviem paraugiem).

4c. tabula Papildu pamatojuma dati par zondes EVI1 (MECOM) Breakapart Probe reproducējamību un precizitāti — inversijas signālu modelis

Mainīgais	Parauga veids	Konverģence
Reproducējamība vienā dienā (paraugu līmenis), starp testēšanas dienām (dienas līmenis) un dažādiem operatoriem (operatora līmenis)	Kaulu smadzenes, zema līmeņa pozitīvi paraugi (2x pārsniedz robežvērtību)	100 %
	Kaulu smadzenes, zema līmeņa pozitīvi paraugi (4x pārsniedz robežvērtību)	100 %

Klīniskā veikspēja

Lai nodrošinātu to, ka produkts konstatē paredzētos pārkarājumus, klīniskā veikspēja tika noteikta 3 pētījumos produktam paredzētās populācijas reprezentējošiem paraugiem: hematoloģiski iegūtas šūnu suspensijas, kas fiksētas Karnuā šķīdumā (3:1 metanols/etiķskābe), no pacientiem, kuriem ir konstatēta akūta mieloida leikēmija (AML) vai mielodisplastiskās neoplazmas (MDS) vai arī pastāv aizdomas par to esamību. Pētījumu kopējais paraugu apjoms bija simt

astotņpadsmit (118) paraugi, un mērķa populācija bija septiņi (7) translokācijas pozitīvi un simts vienpadsmit (111) translokācijas negatīvi paraugi; kopējais paraugu apjoms bija simt deviņpadsmit (119) paraugi, no kuriem simts vienpadsmit (111) bija inversijas negatīvi un astoņi (8) inversijas pozitīvi paraugi. Rezultāti tika salīdzināti ar zināmo parauga statusu. Tika konstatēts, ka rezultātu atbilstība/neatbilstība atbilst šā pētījuma akceptēšanas kritērijiem.

Šo testu rezultāti tika analizēti, lai nodrošinātu klīnisku jutīgumu, klīnisku specifiskumu un kļūdaini pozitīvo rezultātu rādītāja (false positive rate — FPR) vērtības pozitīviem signāliem, izmantojot viendimensijas pieeju.

5. tabula. Zondes EVI1 (MECOM) Breakapart Probe klīniskā veiktspēja — translokācija

Mainīgais	Rezultāts
Klīniskais jutīgums (pareizi pozitīvo rezultātu rādītājs (true positive rate — TPR))	99,94 %
Klīniskais specifiskums (pareizi negatīvo rezultātu rādītājs (true negative rate — TNR))	99,97 %
Kļūdaini pozitīvo rezultātu rādītājs (false positive rate — FPR) = 1 – specifiskums	0,03 %

6. tabula. Zondes EVI1 (MECOM) Breakapart Probe klīniskā veiktspēja — inversija

Mainīgais	Rezultāts
Klīniskais jutīgums (pareizi pozitīvo rezultātu rādītājs (true positive rate — TPR))	96,26 %
Klīniskais specifiskums (pareizi negatīvo rezultātu rādītājs (true negative rate — TNR))	99,28 %
Kļūdaini pozitīvo rezultātu rādītājs (false positive rate — FPR) = 1 – specifiskums	0,72 %

Drošuma un veiktspējas kopsavilkums (Summary of Safety and Performance — SSP)

SSP jābūt publiski pieejamam, izmantojot Eiropas medicīnisko ierīču datubāzi (Eudamed), kur tas ir saistīts ar pamata UDI-DI.

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

Pamata UDI-DI: 50558449LPH036JL

Ja Eudamed nedarbojas pilnībā, SSP ir publiski pieejams pēc pieprasījuma pa e-pastu SSP@ogt.com.

Papildinformācija

Lai saņemtu papildinformāciju par produktu, sazinieties ar CytoCell tehniskā atbalsta nodaļu.

Tālr.: +44 (0)1223 294048

E-pasta adrese: techsupport@cytozell.com

Tīmekļa vietne: www.ogt.com

Atsauces

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 H.J. (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.

Simbolu vārdnīca

EN ISO 15223-1:2021 — “Medicīniskās ierīces — simboli, kas jāizmanto kopā ar ražotāja nodrošināto informāciju. 1. daļa. VISPĀRĪGAS PRASĪBAS” (© International Organization for Standardization)		
Simbols	Nosaukums	Atsauces numurs(-i)
	Iv: Ražotājs	5.1.1.
	Iv: Pilnvarotais pārstāvis Eiropas Kopienā/Eiropas Savienībā	5.1.2.
	Iv: Derīguma termiņš	5.1.4.
	Iv: Partijas kods	5.1.5.
	Iv: Kataloga numurs	5.1.6.
	Iv: Sargājiet no tiešiem saules stariem	5.3.2.
	Iv: Temperatūras ierobežojums	5.3.7.
	Iv: Skatīt lietošanas instrukciju	5.4.3.
	Iv: Skatīt elektronisko lietošanas instrukciju ogt.com/IFU	5.4.3.
	Iv: Uzmanību!	5.4.4.
	Iv: <i>In vitro</i> diagnostikas medicīniskā ierīce	5.5.1.
	Iv: Saturs ir pietiekams <n> testiem	5.5.5.
	Iv: Unikālais ierīces identifikators	5.7.10.
EDMA simboli IVD reaģentiem un komponentiem, 2009. gada oktobra redakcija		
Simbols	Nosaukums	Atsauces numurs(-i)
	Iv: Saturs (vai sastāvs)	N/p

Patenti un preču zīmes

CytoCell ir reģistrēta CytoCell Limited preču zīme.



CytoCell Limited

Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
APVIENOTĀ KARALISTE

Tālr.: +44 (0)1223 294048

Fakss: +44 (0)1223 294986

E-pasta adrese: probes@cytozell.com

Tīmekļa vietne: www.ogt.com



Sysmex Europe SE

Bornbarch 1
22848 Norderstedt
VĀCIJA

Tālr.: +49 40 527260

Tīmekļa vietne: www.sysmex-europe.com

Lietošanas instrukcijas variantu vēsture

V001 2024-02-05: Jauna lietošanas instrukcija atbilstoši Regulai (ES) 2017/746