



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika (IFU)

REF: CE-LPH 013-S / CE-LPH 013

MLL (KMT2A) Breakapart Probe



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO



Dalsze informacje oraz dokumenty w innych językach są dostępne pod adresem ogt.com/IFU

Przeznaczenie

Produkt CytoCell® MLL (KMT2A) Breakapart Probe to jakościowy, niezautomatyzowany test wykonywany metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) przeznaczony do detekcji chromosomowych rearanżacji w regionie 11q23.3 chromosomu 11. w utrwalonych w roztworze Carnoy (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1) zawiesinach komórek pochodzenia hematologicznego pobranych od pacjentów z rozpoznaniem lub podejrzeniem ostrej białaczki szpikowej (Acute Myeloid Leukaemia, AML), zespołu mielodysplastycznego (Myelodysplastic Syndrome, MDS) lub ostrej białaczki limfoblastycznej (Acute Lymphoblastic Leukaemia, ALL).

Wskazania do stosowania

Ten wyrób zaprojektowano jako produkt uzupełniający inne testy kliniczne i histopatologiczne wykonywane w ramach przyjętych ścieżek diagnostycznych i opieki klinicznej, w przypadku których znajomość statusu rearanżacji genu *MLL* (*KMT2A*) w istotny sposób wpływałaby na postępowanie kliniczne.

Ograniczenia

Ten wyrób jest przeznaczony do wykrywania rearanżacji z miejscami złamań w regionie, do którego widać się czerwone i zielone klony zawarte w tym zestawie sond, a który obejmuje region genu *MLL* (*KMT2A*). Wyrób ten może nie umożliwić wykrycia miejsc złamań, do których doszło poza tym regionem, lub wariantowych rearanżacji całkowicie zawierających się w tym regionie.

Ten wyrób nie jest przeznaczony do użytku jako samodzielny test diagnostyczny, jako towarzyszący test diagnostyczny, do badań prenatalnych, populacyjnych badań przesiewowych, badań przyłóżkowych ani do samotestowania.

Ten wyrób nie został zatwierdzony do stosowania dla typów próbek, chorób ani celów innych niż określone w części dotyczącej przeznaczenia.

Produkt ten należy traktować jako uzupełnienie innych diagnostycznych testów laboratoryjnych. Z tego względu nie należy inicjować żadnych działań terapeutycznych wyłącznie na podstawie wyniku uzyskanego metodą FISH.

Raportowanie i interpretacja wyników metody FISH powinny być przeprowadzane przez personel posiadający odpowiednie kwalifikacje, zgodne z profesjonalnymi standardami praktyki i dokonywane z uwzględnieniem innych istotnych wyników testów, informacji klinicznych i diagnostycznych.

Ten wyrób jest przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego w laboratorium. Nieprzestrzeganie protokołu może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.

Zasady działania testu

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują do całych chromosomów lub pojedynczych unikalnych sekwencji, i

stanowi istotne uzupełnienie cytogenetycznej analizy prążków G. Technika ta może być obecnie wykorzystywana jako kluczowe narzędzie diagnostyczne w chromosomalnych analizach prenatalnych, hematologicznych i guzów litych. Docelowa sekwencja DNA, po utrwaleniu i denaturacji, staje się dostępna do przyłączenia do zdenaturowanej w podobny sposób, fluorescencyjnie wyznakowanej sondy DNA o sekwencji komplementarnej. Po hybrydyzacji niezwiązane i nieswoiście związane sondy DNA są usuwane, a DNA jest barwiony kontrastowo w celu jego uwidocznienia. Sondy zhybrydowane do materiału docelowego można następnie obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Informacje o sondzie

Gen *KMT2A* (lysine methyltransferase 2A) zlokalizowany w regionie 11q23.3 często ulega rearanżacji w ostrych białaczkach, zwłaszcza w białaczce niemowląt oraz w białaczce wtórnej, po leczeniu inhibitorami topoisomazy DNA typu II¹.

Gen *KMT2A* jest wysoce homologiczny względem genu występującego u muszki owocowej (*Drosophila trithorax*) i koduje metylotransferazę histonową, która pełni funkcję epigenetycznego regulatora transkrypcji. Translokacje genu *KMT2A* prowadzą do produkcji białka chimerycznego, w którym znajdujący się na końcu aminowym fragment genu *KMT2A* ulega fuzji ze znajdującym się na końcu karboksylowym fragmentem genu partnera fuzyjnego. Funkcjonalne białko odgrywa krytyczną rolę w rozwoju embrionalnym i procesie krwiotworzenia^{1,2,3,4}.

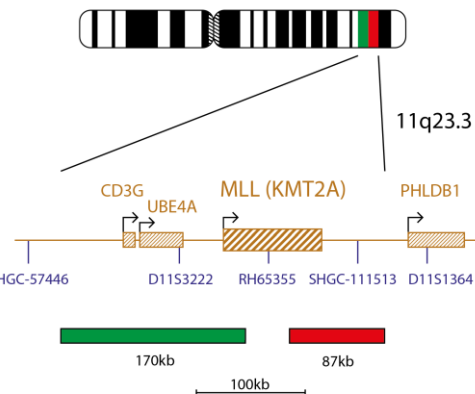
Rearanżacje genu *KMT2A* mogą być wykrywane u około 80% noworodków z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL) i u 5–10% dzieci i dorosłych z ALL^{3,4}. Można je także wykryć w 60% przypadków ostrej białaczki szpikowej (AML) u noworodków oraz w 3% przypadków białaczek AML powstających *de novo* i 10% przypadków zależnej od terapii AML u osób dorosłych^{3,5}. Dotychczas zidentyfikowano ponad 70 partnerów fuzyjnych biorących udział w tych rearanżacjach, przy czym najczęściej występujące translokacje obejmują geny *MLL::AFF1*; t(4;11)(q21;q23.3), geny *MLL::MLLT4*; t(6;11)(q27;q23.3), geny *MLL::MLLT3*; t(9;11)(p22;q23.3) i geny *MLL::MLLT1*; t(11;19)(q23.3;p13.3)¹.

Obecność rearanżacji genu *KMT2A* w ostrej białaczce wiązano kiedyś z gorszym wynikiem leczenia, jednak ostatnie badania wykazały, że rokowanie jest wysoce zależne od partnera fuzyjnego i może różnić się między dziećmi a osobami dorosłymi¹.

Specyfikacja sondy

MLL, 11q23.3, kolor czerwony
MLL, 11q23.3, kolor zielony

CMP-H036 v006.00



Produkt MLL zawiera sondę o długości 87 k, wyznakowaną czerwonym fluoroforem, obejmującą region położony telomerycznie względem genu *MLL* (*KMT2A*), w tym marker SHGC-111513, oraz sondę wyznakowaną zielonym fluoroforem, obejmującą region o długości 170 k położony centromerycznie względem genu *MLL*, rozciągający się na geny *CD3G* i *UBE4A*.

Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów).

Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydacyjnym (formamid <65%; siarczan dekstranu <20 mg; 20x stężony roztwór soli fizjologicznej i cytrynianu sodu (SSC) <10%) i są gotowe do użycia.

Barwnik kontrastowy: 150 µl na fiolkę (15 testów).

Barwnikiem kontrastowym jest odczynnik DAPI Antifade ES (0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol) w środku do zamykania na bazie glicerolu).

Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego w laboratorium.
- Mieszanki sond zawierają formamid, który wykazuje działanie teratogenne; nie wdychać oparów i nie dopuszczać do kontaktu ze skórą. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny.
- Zachować ostrożność podczas pracy z barwnikiem DAPI; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny.
- Nie używać produktu, jeśli fiolka jest uszkodzona lub jej zawartość została w jakikolwiek sposób naruszona.
- W celu bezpiecznego usuwania tego produktu należy postępować zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi usuwania odpadów oraz zaleceniami

DS545/CE-pl v001.00/2023-01-11 (H036 v6)

Strona 1 z 5

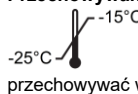
zawartymi w karcie charakterystyki (SDS). Dotyczy to również zawartości uszkodzonego zestawu do testów.

6. Wszystkie zużyte odczynniki oraz wszelkie inne zanieczyszczone materiały jednorazowe należy usuwać zgodnie z procedurami obowiązującymi dla odpadów zakaźnych lub potencjalnie zakaźnych. Każde laboratorium jest odpowiedzialne za postępowanie z odpadami stałymi i płynnymi stosownie do ich właściwości i stopnia zagrożenia oraz przetwarzanie i usuwanie ich (lub zlecenie ich przetwarzania i usuwania) zgodnie z wszelkimi obowiązującymi przepisami.
7. Operatorzy muszą być w stanie rozróżnić czerwony, niebieski i zielony kolor.
8. Nieprzestrzeganie wskazanego protokołu oraz nieużywanie właściwych odczynników może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.
9. Nie należy rozcieńczać sondy ani mieszać jej z innymi sondami.
10. Niezastosowanie 10 µl sondy podczas fazy denaturacji wstępnej wykonywanej w ramach protokołu może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.
11. Przed użyciem produktów należy poddać je walidacji.
12. Kontrole wewnętrzne należy przeprowadzać z wykorzystaniem populacji prawidłowych komórek dostępnych w badanych próbkach.

Definicje temperatur

- -20°C / stan zamrożony / w zamrażarce: od -25°C do -15°C
- 37°C: +37°C ±1°C
- 72°C: +72°C ±1°C
- 75°C: +75°C ±1°C
- Temperatura pokojowa: od +15°C do +25°C

Przechowywanie i postępowanie z produktem

 Zestaw należy przechowywać w zamrażarce w temperaturze od -25°C do -15°C do daty ważności wskazanej na etykiecie zestawu. Fiolki z sondami i barwnikiem kontrastowym należy przechowywać w ciemności.



Sonda do badań techniką FISH, barwnik kontrastowy DAPI Antifade ES oraz roztwór hybrydacyjny zachowują stabilność przez wszystkie cykle zamrażania i rozmrażania wykonywane podczas standardowego użytkowania produktów (jeden cykl jest definiowany jako wyjęcie fiolki z zamrażarki i ponowne umieszczenie jej w zamrażarce) — 5 cykli w przypadku fiolki

zawierającej 50 µl (5 testów) sondy FISH, 10 cykli w przypadku fiolki zawierającej 100 µl (10 testów) sondy FISH i 15 cykli w przypadku fiolki zawierającej 150 µl (15 testów) barwnika kontrastowego. Należy zminimalizować i możliwie ograniczyć ekspozycję produktów na światło. Przechowywać elementy zestawu w dostarczonym pojemniku nieprzepuszczającym światła. Użyte elementy zestawu, które przechowywano w warunkach innych niż wskazane na etykietach, mogą nie działać zgodnie z oczekiwaniami i negatywnie wpłynąć na wyniki oznaczenia. Należy dołożyć wszelkich starań, aby ograniczyć ekspozycję produktów na światło i zmiany temperatury.

Sprzęt i materiały wymagane, ale niedostarczane

Należy używać następującego skalibrowanego sprzętu:

1. Płyta grzewcza (ze stabilną płytą i możliwością dokładnej kontroli temperatury do 80°C)
2. Skalibrowane mikropipety i końcówki umożliwiające przenoszenie różnych objętości cieczy w zakresie 1–200 µl
3. Łaźnia wodna z możliwością dokładnej kontroli temperatury na poziomie 37°C i 72°C
4. Probówki mikrowirówkowe (0,5 ml)
5. Mikroskop fluorescencyjny (patrz część „Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego”)
6. Mikroskop z kontrastem fazowym
7. Czyste barwiacze Coplina z tworzywa sztucznego, ceramiki lub szkła żaroodpornego
8. Szczypczyki
9. Skalibrowany pH-metr (lub papierki wskaźnikowe pH umożliwiające pomiar pH w zakresie 6,5–8,0)
10. Pojemnik zapewniający dużą wilgotność powietrza
11. Olejek imersyjny odpowiedni do obiektów mikroskopowych klasy fluorescencyjnej
12. Wirówka laboratoryjna
13. Szkiełka mikroskopowe
14. Szkiełka nakrywkowe o wymiarach 24x24 mm
15. Stoper
16. Inkubator nastawiony na temperaturę 37°C
17. Klej kauczukowy
18. Wytrząsarka
19. Cylindry miarowe
20. Mieszadło magnetyczne
21. Skalibrowany termometr

Opcjonalny sprzęt niedostarczany

1. Komora do suszenia próbek do badań cytogenetycznych

Odczynniki wymagane, ale niedostarczane

1. Roztwór soli fizjologicznej i cytrynianu sodu (SSC), 20x
2. Etanol, 100%
3. Tween-20
4. Wodorotlenek sodu (NaOH), 1 M
5. Kwas solny (HCl), 1 M
6. Woda oczyszczona

Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego

W celu optymalnej wizualizacji sondy zalecane jest używanie 100-watowej lampy rtęciowej lub równoważnej lampy i obiektywów planapochromatycznych umożliwiających stosowanie olejku imersyjnego przy powiększeniu 60/63x lub 100x. Fluorofory użyte w tym zestawie sond charakteryzują się następującymi długościami fal wzbudzenia i emisji:

Fluorofor	Wzbudzenie _{maks.} [nm]	Emisja _{maks.} [nm]
Zielony	495	521
Czerwony	596	615

Należy upewnić się, że w mikroskopie zamontowane są odpowiednie filtry wzbudzenia i emisji, które obejmują wymienione powyżej długości fal. Do jednoczesnej obserwacji zielonych i czerwonych fluoroforów optymalnie nadaje się potrójny filtr pasmowo-przepustowy dla barwnika DAPI/widma zielonego/widma czerwonego lub podwójny filtr pasmowo-przepustowy dla widma zielonego/widma czerwonego.

Przed użyciem mikroskopu fluorescencyjnego należy sprawdzić, czy działa on prawidłowo. Należy stosować olejek imersyjny odpowiedni do mikroskopii fluorescencyjnej o składzie odpowiednim do niskiej autofluorescencji. Należy unikać mieszania barwnika DAPI antifade z mikroskopowym olejkiem imersyjnym, ponieważ spowoduje to zaciemnienie sygnałów. Należy przestrzegać zaleceń wytwórcy dotyczących okresu żywotności lampy i wieku filtrów.

Przygotowanie próbek

Zestaw jest przeznaczony do stosowania na utrwalonych w roztworze Carnoya (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1) zawiesinach komórek pochodzenia hematologicznego pobranych od pacjentów z rozpoznaniem lub podejrzeniem ostrej białaczki szpikowej (AML), zespołu mielodysplastycznego (MDS) lub ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL). Komórki należy przygotować zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w laboratorium lub placówce. Należy przygotować próbki suszone na powietrzu na szkiełkach mikroskopowych zgodnie ze standardowymi procedurami cytogenetycznymi. Podręcznik AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* zawiera zalecenia dotyczące pobierania próbek, prowadzenia hodowli komórek, zbierania komórek z hodowli oraz przygotowywania preparatów⁶.

Przygotowanie roztworów

Roztwory etanolu

Rozcieńczyć 100-procentowy etanol wodą oczyszczoną w określonych poniżej proporcjach i dokładnie wymieszać:

- 70-procentowy etanol — dodać 7 części 100-procentowego etanolu do 3 części wody oczyszczonej
- 85-procentowy etanol — dodać 8,5 części 100-procentowego etanolu do 1,5 części wody oczyszczonej

Przechowywać roztwory przez maksymalnie 6 miesięcy w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

2x stężony roztwór SSC

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 9 częściami wody oczyszczonej; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

0,4x stężony roztwór SSC

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 49 częściami wody oczyszczonej; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

2x stężony roztwór SSC ze środkiem Tween-20 w stężeniu 0,05%

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 9 częściami wody oczyszczonej. Dodać 5 µl środka Tween-20 na 10 ml roztworu; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

Protokół FISH

(Uwaga: Należy możliwie ograniczać ekspozycję sondy i barwnika kontrastowego na światło w laboratorium).

Przygotowanie szkiełek

1. Wkropić próbkę komórek na szkiełko mikroskopowe. Pozostawić do wyschnięcia. (Opcjonalnie, w przypadku korzystania z komory do suszenia próbek do badań cytogenetycznych: Komora powinna mieć temperaturę około 25°C i zapewnić wilgotność 50%, aby umożliwić optymalne naniesienie próbki komórek. Jeśli komora do suszenia próbek do badań cytogenetycznych nie jest dostępna, należy pozostawić próbki pod wyciągiem).
2. Zanurzyć szkiełko w 2x stężonym roztworze SSC w temperaturze pokojowej na 2 minuty; nie wstrząsać.
3. Odwodnić próbkę, korzystając z szeregu alkoholowego (etanol w stężeniu 70%, 85% i 100%); zanurzać szkiełko w każdym roztworze alkoholu na 2 minuty w temperaturze pokojowej.
4. Pozostawić do wyschnięcia.

Denaturacja wstępna

5. Wyjąć roztwór sond z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej. Przed użyciem roztworu należy krótko odwirować probówki.
6. Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.

- Pobrać 10 µl roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość do próbki mikrowirówkowej. Bezwzględnie włożyć pozostały roztwór sond z powrotem do zamrażarki.
- Umieścić roztwór sond i szkiełko z próbką na płycie grzewczej o temperaturze 37°C (+/-1°C) na 5 minut w celu ich wstępnego ogrzania.
- Wkropić 10 µl mieszaniny sond na próbkę komórek i ostrożnie nanieść szkiełko nakrywkowe. Zakleić szkiełko klejem kauczukowym i poczekać na jego całkowite wyschnięcie.

Denaturacja

- Denaturować jednocześnie próbkę i mieszaninę sond, ogrzewając szkiełko na płycie grzewczej o temperaturze 75°C (+/-1°C) przez 2 minuty.

Hybrydyzacja

- Umieścić szkiełko w wilgotnym, światłoszczelnym pojemniku w temperaturze 37°C (+/-1°C) na noc.

Płukania po hybrydyzacji

- Wyjąć barwnik DAPI z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej.
- Ostrożnie zdjąć szkiełko nakrywkowe i usunąć wszelkie pozostałości kleju.
- Zanurzyć szkiełko w 0,4x stężonym roztworze SSC (pH 7,0) w temperaturze 72°C (+/-1°C) na 2 minuty; nie wstrząsać.
- Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie zanurzyć je w 2x stężonym roztworze SSC ze środkiem Tween-20 w stężeniu 0,05% (pH 7,0) w temperaturze pokojowej na 30 sekund; nie wstrząsać.
- Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie nanieść 10 µl barwnika DAPI antyfade na każdą próbkę.
- Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić rozwój barw.
- Obejrzyć pod mikroskopem fluorescencyjnym (patrz **Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego**).

Zalecenia dotyczące procedury

- Wypiekanie lub postarzenie preparatów może zmniejszyć fluorescencję sygnału.
- Stosowanie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę Cytocell Ltd może mieć negatywny wpływ na warunki hybrydyzacji.
- Do pomiaru temperatury roztworów, łaźni wodnych i inkubatorów należy używać skalibrowanego termometru, ponieważ temperatury te są kluczowe dla optymalnego działania produktu.
- Stężenia, wartości pH i temperatury roztworów wykorzystywanych do płukania są istotne, gdyż mało surowe warunki mogą doprowadzić do nieswoistego wiązania sondy, a zbyt surowe warunki mogą spowodować brak sygnału.
- Niecałkowita denaturacja może spowodować brak sygnału, a nadmierna denaturacja może również doprowadzić do nieswoistego wiązania.
- Nadmierna hybrydyzacja może spowodować otrzymanie dodatkowych lub nieoczekiwanych sygnałów.
- Przed użyciem testu do celów diagnostycznych użytkownicy powinni zoptymalizować protokół dla własnych próbek.
- Suboptymalne warunki mogą prowadzić do nieswoistego wiązania sond, które może zostać błędnie zinterpretowane jako sygnał sondy.

Interpretacja wyników

Ocena jakości preparatów

Preparatu nie należy oceniać w następujących przypadkach:

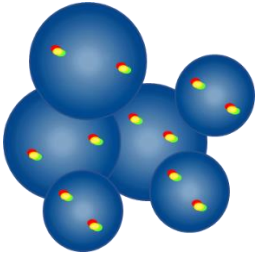
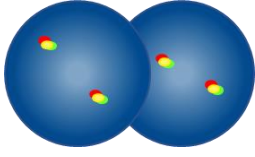
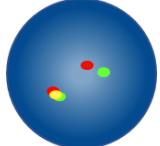
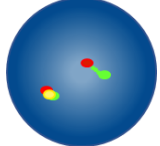
- Sygnały są zbyt słabe, aby można było analizować je w pojedynczych filtrach — do analizy można przystąpić jedynie, jeśli sygnały są jasne, wyraźne i łatwe do oceny.
- Widoczna jest duża liczba zlepionych/nakładających się na siebie komórek, co utrudnia analizę.
- W >50% komórek nie doszło do hybrydyzacji.
- Pomiędzy komórkami znajdują się liczne cząstki fluorescencyjne i/lub widoczne jest „zamglenie” fluorescencyjne, które zakłóca sygnały — w przypadku preparatów optymalnych do oceny tło powinno być ciemne lub czarne i klarowne.
- Nie można rozróżnić granic jądra komórkowego lub są one nieciągłe.

Wytyczne dotyczące analizy

- Każda próbka powinna być analizowana i interpretowana przez dwóch analityków. Wszelkie rozbieżności powinny zostać rozwiązane w wyniku oceny dokonanej przez trzeciego analityka.
- Każdy analityk powinien posiadać odpowiednie kwalifikacje zgodne z normami krajowymi.
- Każdy analityk powinien dokonać niezależnej oceny 100 jąder dla każdej próbki. Pierwszy analityk powinien rozpocząć analizę od lewej strony preparatu, a drugi od prawej strony preparatu.
- Każdy analityk powinien zapisać własne wyniki w odrębnym arkuszu.
- Należy analizować wyłącznie nienaruszone jądra, nie wolno analizować jąder nakładających się na siebie, zlepionych, pokrytych resztkami cytoplazmy ani jąder wykazujących wysoki stopień autofluorescencji.
- Należy unikać obszarów, w których występuje nadmierna ilość resztek cytoplazmy lub nieswoista hybrydyzacja.
- Intensywność sygnału może się różnić nawet w obrębie jednego jądra. W takich przypadkach należy użyć filtrów pojedynczych i/lub wyregulować płaszczyznę ogniskowania.
- W warunkach suboptymalnych sygnały mogą wyglądać na rozlane. Jeśli dwa sygnały o tym samym kolorze stykają się ze sobą, odległość między nimi jest nie większa niż dwie szerokości sygnału lub istnieje cienkie pasmo łączące oba sygnały, należy zliczać je jako jeden sygnał.
- Dotyczy analizy wyników uzyskanych za pomocą dwukolorowych sond wykrywających miejsca złamań: jeśli pomiędzy sygnałem czerwonym a

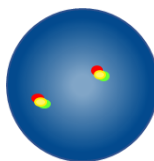
zielonym występuje przerwa nieprzekraczająca 2 szerokości sygnału, sygnał należy zliczyć jako brak rearanżacji/sygnał fuzyjny.

- W przypadku wątpliwości, czy komórka nadaje się do analizy, nie należy jej analizować.

Wytyczne dotyczące analizy	
	Nie zliczać — jądra są za blisko siebie, aby można było określić ich granice
	Nie zliczać jąder nakładających się na siebie — nie są widoczne całe obszary obu jąder
	Zliczyć jako dwa sygnały fuzyjne — przerwa widoczna między czerwonym a zielonym sygnałem jest mniejsza niż dwie szerokości sygnału
	Zliczyć jako dwa sygnały fuzyjne — jeden sygnał fuzyjny jest rozlany

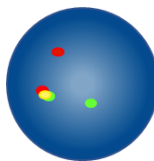
Wyniki oczekiwane

Oczekiwany wzorec sygnału wskazujący na stan prawidłowy



W komórce prawidłowej oczekiwane są dwa fuzyjne sygnały czerwone/zielone (2F).

Oczekiwany wzorec sygnału wskazujący na stan nieprawidłowy



Oczekiwany wzorec sygnału w komórce ze zrównoważoną rearanżacją genu *MLL* (*KMT2A*) to jeden sygnał czerwony, jeden sygnał zielony i jeden fuzyjny sygnał czerwony/zielony (1F1C1Z).

W przypadku próbek aneuploidalnych/z rearanżacją niezrównoważoną mogą wystąpić inne wzorce sygnału.

Znane istotne zakłócenia/substancje zakłócające

Brak znanych istotnych zakłóceń/substancji zakłócających.

Znana reaktywność krzyżowa

Brak znanej reaktywności krzyżowej.

Zgłaszanie poważnych incydentów

Dotyczy pacjentów/użytkowników/podmiotów trzecich w Unii Europejskiej i w krajach o identycznym reżimie regulacyjnym (Rozporządzenie (UE) 2017/746 w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro*): jeśli podczas używania tego wyrobu lub w wyniku jego używania doszło do poważnego incydentu, fakt ten należy zgłosić wytwórcy oraz właściwemu organowi krajowemu.

W przypadku wystąpienia poważnych incydentów w innych krajach fakt ten należy zgłosić wytwórcy oraz, jeśli ma to zastosowanie, właściwemu organowi krajowemu. Adres wytwórcy do kontaktu w sprawach dotyczących nadzoru nad produktami (ang. vigilance): vigilance@oqt.com

Wykaz punktów kontaktowych ds. nadzoru nad produktami (ang. vigilance) dla krajowych właściwych organów w UE jest dostępny na stronie: https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

Specyficzne parametry skuteczności

Swoistość analityczna

Swoistość analityczna to odsetek sygnałów, które hybrydują do właściwego locus i nie hybrydują do żadnej innej lokalizacji. Swoistość analityczną ustalono poprzez analizę łącznie 200 loci docelowych. Analizie poddano 2 loci chromosomowe w każdej z 20 komórek metafazowych w 5 próbkach, uzyskując łącznie 200 punktów danych. Swoistość analityczną obliczano jako liczbę sygnałów FISH zhybryzowanych do prawidłowego locus podzieloną przez całkowitą liczbę zhybryzowanych sygnałów FISH.

Swoistość analityczną każdej sondy zawartej w zestawie obliczono jako liczbę sygnałów FISH chromosomu metafazowego zhybryzowanych do prawidłowego locus podzieloną przez całkowitą liczbę zhybryzowanych sygnałów FISH chromosomu metafazowego, uzyskany wynik pomnożono przez 100, wyrażono jako odsetek i podano z 95-procentowym przedziałem ufności.

Tabela 1. Swoistość analityczna dla produktu MLL (KMT2A) Breakapart Probe

Sonda	Locus docelowe	Liczba chromosomów metafazowych, w których doszło do hybrydizacji	Liczba loci, w których doszło do prawidłowej hybrydizacji	Swoistość analityczna (%)	95-procentowy przedział ufności (%)
Dystalna sonda MLL, kolor czerwony	11q23.3	200	200	100	98,12–100
Proksymal na sonda MLL, kolor zielony	11q23.3	200	200	100	98,12–100

Czułość analityczna

Czułość analityczna to odsetek komórek interfazowych nadających się do oceny z oczekiwanym wzorcem sygnału wskazującym na stan prawidłowy. Dla każdej z 25 utrwalonych w roztworze Carnoya zawieszin kariotypowo prawidłowych komórek szpiku kostnego analizowano co najmniej 200 komórek interfazowych, uzyskując łącznie co najmniej 5000 jąder komórkowych poddanych ocenie dla każdego typu próbki. Dane dotyczące czułości przeanalizowano w oparciu o odsetek komórek wykazujących wzorzec sygnału wskazujący na stan prawidłowy i wyrażono jako odsetek z 95-procentowym przedziałem ufności.

Tabela 2. Czułość analityczna dla produktu MLL (KMT2A) Breakapart Probe

Liczba komórek z oczekiwanym wzorcem sygnału	Łączna liczba komórek z sygnałami nadającymi się do oceny	Czułość analityczna (%)	95-procentowy przedział ufności (%)
4965	5000	99,3	99,08–99,52

Charakterystyka wartości odcięcia dla stanu prawidłowego

Wartość odcięcia dla stanu prawidłowego, określana w odniesieniu do sond FISH, to maksymalny odsetek komórek interfazowych nadających się do oceny, dla których obserwowany jest określony wzorzec sygnału charakterystyczny dla stanu prawidłowego, przy którym próbka jest uznawana za prawidłową pod względem tego wzorca sygnału.

Wartość odcięcia dla stanu prawidłowego ustalono przy użyciu próbek ujemnych pod względem rearanżacji, do której wykrywania przeznaczona jest sonda, oraz funkcji odwrotności beta. Dla każdej próbki dwóch niezależnych analityków rejestrowało wzorce sygnałów 100 jąder interfazowych, co dało łącznie 200 przeanalizowanych jąder na próbce.

Wartość odcięcia ustalono przy użyciu funkcji β -odwrotności (BETAINV) w programie MS Excel. Obliczono ją jako odsetek komórek interfazowych wykazujących fałszywie dodatni wzorzec sygnału przy zastosowaniu górnej granicy jednostronnego 95-procentowego przedziału ufności rozkładu dwumianowego w prawidłowej próbce pacjenta.

Tabela 3. Charakterystyka wartości odcięcia dla stanu prawidłowego dla produktu MLL (KMT2A) Breakapart Probe

Wzorzec sygnału wskazujący na stan nieprawidłowy	Liczba próbek przeanalizowanych w celu ustalenia wartości odcięcia	Liczba jąder ocenianych na próbce	Maks. I. fałszywie dodatnich wzorców sygnału	Wartość odcięcia dla stanu prawidłowego (%)
1C1Z1F	1600	200	3	3,8

Laboratoria muszą zweryfikować wartości odcięcia w oparciu o własne dane^{7,8}.

Odtwarzalność

Przeprowadzono badania odtwarzalności w celu ustalenia następujących parametrów:

- odtwarzalność w ramach dnia (między próbkami) w 3 ośrodkach;
- odtwarzalność między dniami w 3 ośrodkach;
- odtwarzalność między 3 ośrodkami;
- odtwarzalność między seriami w jednym ośrodku.

Odtwarzalność ustalono na podstawie danych otrzymanych z trzech odrębnych laboratoriów, w których wykonywano testy na sześciu zaślepionych próbkach (dwie próbki ujemne względem rearanżacji, dwie próbki nisko dodatnie, dla których odsetek komórek dodatnich był od 1 do 3 razy większy od wartości odcięcia, i dwie próbki wysoko dodatnie, które zawierały ponad 45% komórek dodatnich względem rearanżacji). Analizy prowadzono w ciągu pięciu nienastępujących po sobie dni, wykonując po dwa powtórzenia dla każdej próbki.

We wszystkich trzech ośrodkach przeprowadzono badania odtwarzalności wyników w ramach dnia, między dniami i między ośrodkami przy użyciu tej samej serii sond, a w jednym z ośrodków przeprowadzono również badanie odtwarzalności wyników między seriami z użyciem trzech różnych serii sond. Odtwarzalność obliczono na podstawie zgodności między zmiennymi ocenianymi w każdym z badań.

Tabela 4. Odtwarzalność dla produktu MLL (KMT2A) Breakapart Probe

Badanie odtwarzalności	Próbka	Zgodność (%)
W ramach dnia/między dniami/między ośrodkami	90% zgodności, klasa ujemna	100%
	95% zgodności, klasa wysoko dodatnia	100%
Między seriami	90% zgodności, klasa ujemna	100%
	95% zgodności, klasa wysoko dodatnia	100%

Skuteczność kliniczna

W celu zapewnienia, że produkt wykrywa rearanżacje, do których oceny jest przeznaczony, ustalono skuteczność kliniczną produktu w oparciu o trzy badania retrospektywne prowadzone w ośrodkach zewnętrznych przeprowadzających testy. Łączna wielkość próby dla tych badań we wszystkich ośrodkach wyniosła czterysta osiemdziesiąt osiem (488) próbek, w tym osiemnaście (18) próbek dodatnich i czterysta siedemdziesiąt (470) próbek ujemnych. Status dodatni lub ujemny każdej próbki potwierdzono przy użyciu wprowadzonej na rynek przez konkurencyjnego producenta komercyjnej sondy porównawczej, która wykrywa te same nieprawidłowości co oceniane sondy, lub poprzez analizę porównawczą z wynikami badania kariotypu wykonywanego techniką prążków G.

Uzyskane wyniki testów przeanalizowano w celu obliczenia czułości klinicznej, swoistości klinicznej i odsetka wyników fałszywie dodatnich (False Positive Rate, FPR) dla sygnałów dodatnich, stosując podejście jednowymiarowe.

Tabela 5. Skuteczność kliniczna dla produktu MLL (KMT2A) Breakapart Probe

Zmienna	Wynik
Czułość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie dodatnich (True Positive Rate, TPR))	99,93%
Swoistość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie ujemnych (True Negative Rate, TNR))	99,97%
Odsetek wyników fałszywie dodatnich (False Positive Rate, FPR) = 1 – swoistość	0,03%

Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności (SSP)

Dokument SSP jest udostępniany publicznie za pośrednictwem europejskiej bazy danych o wyrobach medycznych (Eudamed), w której powiązany jest z kodem Basic UDI-DI.

Adres URL bazy danych: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Kod Basic UDI-DI: 50558449LPH013J8

Jeśli baza danych Eudamed nie jest w pełni funkcjonalna, dokument SSP jest udostępniany publicznie na żądanie przesłane na adres e-mail SSP@ogt.com.

Dodatkowe informacje

W celu uzyskania dodatkowych informacji na temat produktu należy skontaktować się z działem wsparcia technicznego firmy CytoCell.

Tel.: +44 (0)1223 294048















E-mail: techsupport@cytozell.com

Strona WWW: www.ogt.com

Piśmiennictwo

1. Tamai, Inokuchi, J Clin Exp Hematopathol 2010;50(2):91-98
2. Wright, Vaughan, Critical Reviews in Oncology/Hematology 2014;91(3):283-291
3. Van der Burg et al., Leukemia 2004;18(5):895-908
4. Tomizawa, Pediatr Int 2015;57(8):811-819
5. Grossman et al., Leukemia 28 March 2013; doi:10.1038/leu.2013.90
6. Arsham, MS., Barch, M.J. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
7. 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.
8. Wiktor AE, Dyke DLV, 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.

Glosariusz symboli

EN ISO 15223-1:2021 — „Wyroby medyczne — Symbole do stosowania wraz z informacjami dostarczanymi przez producenta — Część 1: Wymagania ogólne” (© International Organization for Standardization)		
Symbol	Tytuł	Numery referencyjne
	pl: Wytwórca	5.1.1
	pl: Autoryzowany przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej/Unii Europejskiej	5.1.2
	pl: Użyć do daty	5.1.4
	pl: Kod partii	5.1.5
	pl: Numer katalogowy	5.1.6
	pl: Trzymać z dala od światła słonecznego	5.3.2
	pl: Dopuszczalna temperatura	5.3.7
	pl: Zażrzyj do instrukcji używania	5.4.3
 ogt.com/IFU	pl: Zażrzyj do elektronicznej instrukcji używania	5.4.3
	pl: Ostrzeżenie	5.4.4
	pl: Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>	5.5.1
	pl: Zawartość wystarczająca do <n> testów	5.5.5
	pl: Niepowtarzalny kod identyfikacyjny wyrobu	5.7.10
Symbole EDMA dla odczynników i składników IVD, wersja: październik 2009 r.		
Symbol	Tytuł	Numery referencyjne
	pl: Zawartość (lub „zawiera”)	ND.

Patenty i znaki towarowe

CytoCell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy CytoCell Limited.



CytoCell Limited
Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
WIELKA BRYTANIA

Tel.: +44 (0)1223 294048
Faks: +44 (0)1223 294986
E-mail: probes@cytoCell.com
Strona WWW: www.ogt.com



Sysmex Europe SE
Bornbarch 1
22848 Norderstedt
NIEMCY

Tel.: +49 40 527260
Strona WWW: www.sysmex-europe.com

Historia wersji dokumentu IFU

V001.00 2023-01-11: Nowy dokument IFU zgodny z Rozporządzeniem (UE) 2017/746.