



A Sysmex Group Company



Lietošanas instrukcija

ATS.: CE-LPH 039-S / CE-LPH 039

CKS1B/CDKN2C (P18) Amplification/Deletion Probe



TIKAI PROFESIONĀLAM LIETOJUMAM



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

Paredzētais lietošanas mērķis

Zonde CytoCell® CKS1B/CDKN2C (P18) Amplification/Deletion Probe ir kvalitatīvs, neautomatizēts luminiscētās *in situ* hibridizācijas (fluorescence in situ hybridisation — FISH) tests, kas paredzēts hromosomālo pieaugumu un delēciju noteikšanai 1. hromosomas reģionos 1p32.3 un 1q21. Kamuā šķīdumā (3:1 metanols/etiķskābe) fiksētās hematoloģiski iegūtās šūnu suspensijās no pacientiem, kuriem ir konstatēta multiplā mieloma (MM) vai pastāv aizdomas par tās esamību.

Lietošanas indikācijas

Šis ierīce ir paredzēta kā citu klīnisko un histopatoloģisko testu papildinājums atzītās diagnostikas un klīniskās aprūpes metodēs, kad informācija par CKS1B vai CDKN2C (P18) statusu ir svarīga klīniskajai pārvaldībai.

Ierobežojumi

Šī ierīce ir paredzēta genomisko pieaugumu vai zudumu noteikšanai, kuru lielums pārsniedz reģionu, ko nosedz sarkanie uz zaļie kloni zonžu komplektā, kurā ietilpst reģioni CKS1B un CDKN2C (P18). Izmantojot šo ierīci, var netikt noteikti genomiskie pieaugumi vai zudumi ārpus šiem reģioniem vai daļēji šo reģionu pieaugumi vai zudumi.

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

Šī ierīce nav validēta paraugu tiptiem, slimību tiptiem 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. Neievērojot attiecīgo protokolu, var tikt ietekmēta veikspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi vai kļūdaini negatīvi rezultāti.

Testa principi

Luminiscētā *in situ* hibridizācija (fluorescence in situ hybridisation — FISH) ir metode, kas ļauj noteikt DNS sekvenču metafāzu hromosomās vai interfāzes kodolos fiksētiem citoģenētiskiem paraugiem. Šajā metodē tiek izmantotas DNS zondes, kas hibridizējas ar veselām hromosomām vai atsevišķām unikālām sekvencēm un kalpo kā efektīvs G joslu citoģenētiskās 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, luminiscējošu marķētu DNS zondi, kurai ir papildu sekvenču. Pēc hibridizācijas nesaistītā un nespecifiski saistītā DNS zonde tiek aizvākta un DNS tiek kontrastēta

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

Informācija par zondi

CKS1B (CDC28 proteīnkināzes regulācijas apakšvienības 1B) gēna atrašanās vieta ir 1q21, savukārt CDKN2C (ciklīnkarīgās kināzes inhibitora 2C) gēna atrašanās vieta ir 1p32.3.

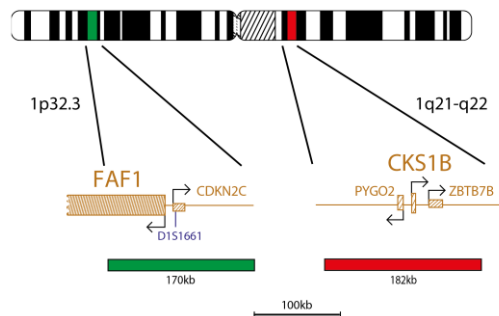
Tā reģiona 1q21 pieaugums, kurā ietilpst CKS1B, ir viena no visbiežāk konstatētajām hromosomālajām aberācijām multiplās mielomas gadījumos¹. CKS1B gēna pāreksprejsija augšupregulē šūnu cikla progresiju, līdz ar to slimība ir proliferatīvāka². Tas ir saistīts ar multiplās mielomas attīstīto fenotipu un līdz ar to var būt saistīts ar nelabvēlīga iznākuma prognozi un slimības progresiju^{1,2,3}. 1q21 pieaugums ir saistīts ar zemu izdzīvošanas koeficientu un turpmāka amplifikācija ir konstatējama slimības recidīvā. 1. hromosomas garā pleca pilnīgi pieaugumi arī ir bieži konstatējami multiplās mielomas gadījumos un var rasties kā izohromosomas, dublikāti vai lēciantroslokācijas un bieži ir saistītas ar slimības progresiju⁴.

CDKN2C ir antionkogēns, kas atbild par šūnu apoptozes inducēšanu un DNS fragmentāciju⁵. To augšupregulē citokīna IL-6 ekspresija multiplajā mielomā, un gēna homozigota delēcija ir saistīta ar proliferatīvāku slimību⁵. Lai arī CDKN2C delēcijas ļaundabīgos cilvēka jaunveidojumos ir konstatējamā reti, citoģenētiskās analīzes rezultāti norāda, ka 1p32-36 anormalitātes rodas aptuveni 16% cilvēka multiplās mielomas gadījumu un ir saistītas ar mazāku vispārīgo izdzīvojamību^{2,3,5,6}.

Citoģenētiskās anormalitātes tiek noteiktas aptuveni vienā trešdaļā multiplās mielomas gadījumu, izmantojot konvencionālās citoģenētiskās metodes, bet FISH palielina noteikto hromosomālo anormalitāšu īpatnību līdz > 90%⁷.

Zondes specifika

CKS1B, 1q21-q22, sarkana
CDKN2C (P18), 1p32.3, zaļa



CKS1B/CDKN2C produktā ietilpst 182 kb zonde, kas marķēta sarkanā krāsā un nosedz visu CKS1B gēnu un tam piegulošos reģionus, tostarp PYGO2 un ZBTB7B gēnus, un zaļa zonde, kas nosedz 170 kb reģionu, tostarp visu CDKN2C gēnu, D1S1661 marķieri un FAF1 gēna centromērisko galu.

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

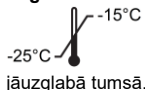
1. Lietošanai *in vitro* diagnostikā. Tikai profesionālam lietojumam laboratorijā.
2. Zondes maisījumos ietilpst formamīds, kas ir teratogēns, tādēļ nedrīkst pieļaut to izgarojumu ieelpošanu un nonākšanu saskarē ar ādu. Rīkojieties ar to piesardzīgi; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku.
3. Rīkojieties ar DAPI piesardzīgi; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku.
4. Nelietot, ja flakons(-i) ir bojāts(-i) vai flakona saturs jebkādā 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 jebkādas citus piesārņotus vienreizlietojamus materiālus, ievērojot procedūras attiecībā uz infekcioziem vai potenciāli infekcioziem atkritumiem. Katra laboratorija ir atbildīga par rīcību ar citajiem 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 priekšdenaturēšanas 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 apiešanās

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



FISH zonde, DAPI Antifade ES kontrastviela un hibridizācijas šķīdums paliek stabili visos sasaldēšanas-atkausēšanas ciklos parastas 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 necaurļaidīgā konteinerā. Komponenti, kas izmantoti un uzglabāti apstākļos, kas nav norādīti marķējumā, var nedarboties, kā paredzēts, un tie var negatīvi ietekmēt analīzes rezultātus. Ir jāveic viss iespējama, 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 dažāda 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. Luminiscences mikroskops (sk. sadaļu Uz luminiscences mikroskopu attiecināmie ieteikumi)
6. Fāžu 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. Luminiscencei 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 sālsskābe (HCl)
6. Attīrīts ūdens

Uz luminiscences mikroskopu attiecināmie ieteikumi

Lai nodrošinātu optimālu vizualizāciju, izmantojiet 100 W dzīvsudraba spuldzi vai sarkano fluoroforu vienlaicīgu vizualizāciju, izmantojiet trīsoslu DAPI/zaļā spektra/sarkanā spektra filtru vai divjoslu zaļā spektra/sarkanā spektra filtru.

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

Nodrošiniet, lai mikroskops būtu aprīkots ar iepriekš norādītajiem viļņa garumiem atbilstošiem ierosmes un izstarošanas filtriem. Lai nodrošinātu optimālu zaļo un sarkano fluoroforu vienlaicīgu vizualizāciju, izmantojiet trīsoslu DAPI/zaļā spektra/sarkanā spektra filtru vai divjoslu zaļā spektra/sarkanā spektra filtru.

Pirms lietošanas pārbaudiet luminiscences mikroskopu, lai pārliecinātos, vai tas darbojas pareizi. Izmantojiet iegremdēšanas eļļu, kas piemērota luminiscences mikroskopijai un nodrošina zemu autoluminiscences 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 (3:1 metanols/etiķskābe) šķīdumā un ir sagatavotas atbilstoši laboratorijā vai iestādē spēkā esošajām vadlīnijām. Sagatavojiet gaisā nožāvētus paraugus uz mikroskopa priekšmetstikliņiem atbilstoši standarta citoģenētiskajam procedūram. AGT *citoģenētiskas laboratorijas rokasgrāmata* ir ietverti ieteikumi par paraugu ņemšanu, kultūrēšanu, ievākšanu un priekšmetstikliņu sagatavošanu⁸.

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

Glābājiet 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.

Luminiscētās in situ hibridizācijas protokols (FISH)

(Piezīme. Nodrošiniet, lai zonde un kontrasta krāsvielu 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 uz 2 minūtēm, neveicot maisīšanu.
3. Veiciet dehidrēšanas etanolā sērijas (70%, 85% un 100%), katru 2 minūtes istabas temperatūrā.
4. Ļaujiet nožūt.

Priekšdenaturēšana

5. Izņemiet zondi no saldētavas un ļaujiet tai sasilt līdz istabas temperatūrai. Pirms mēģeņu lietošanas brīdī tās centrifūgējiet.
6. Izmantojot pipeti, pārliecinieties, 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 minūtes.
9. Uzlieciet 10 µl zondes maisījuma uz šūnu parauga un rūpīgi 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 minūtes.

Hibridizācija

11. Ievietojiet priekšmetstikliņu gaismu necaurļaidīgā 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 uz 2 minūtēm nemaisot.
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 DAPI luminiscences uzturēšanas līdzekli.
17. Uzlieciet segstikliņu, likvidējiet burbuļus un ļaujiet krāsai tumsā attīstīties 10 minūtes.
18. Skatiet luminiscences mikroskopā (sk. Uz luminiscences mikroskopu attiecināmie ieteikumi).

Ieteikumi attiecībā uz procedūru

1. Priekšmetstikliņu karsēšana vai novecošana var samazināt signāla luminiscenci.

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 pārāk lielas pielaišanas gadījumā iespējama nespecifiska sasaiste, savukārt pārāk mazas pielaišanas gadījumā iespējama signāla nepietiekamība.
5. Nepilnīga denaturēšana var izraisīt signāla nepietiekamību, savukārt pārmērīga denaturēšana arī var izraisīt nespecifisku sasaisti.
6. Pārmērīgas 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

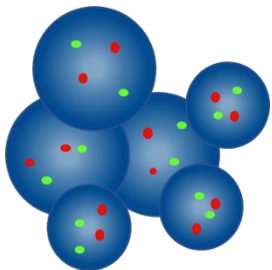
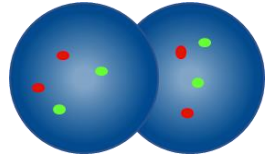
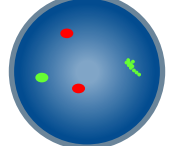
Sagatavotā priekšmetstikliņa ar paraugu kvalitātes novērtēšana

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/pārkļājošos šūnu, kas traucē veikt analīzi.
- >50% šūnu nav hibridizētas.
- Starp šūnām atrodas pārāk daudz luminiscējošo daļiņu un/vai luminiscējošs aizmiglojums, 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 vadlinijas

- 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 jāsak 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 pārkļājošie kodoli, sablīvējušies kodoli vai kodoli, kurus sedz citoplazmatiskās atliekas vai augsta līmeņa autoluminiscence.
- 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 divkrāsū sadalīšanās zondes, ja attālums starp sarkano un zaļo signālu nepārsniedz 2 signāla platumus, signāls ir uzskatāms par nepārkārtotu/saplūdušu signālu.
- Analizējot trīskrāsū 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.

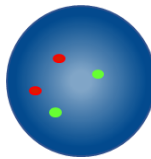
Uz analīzi attiecināmās vadlinijas	
	Neskaitīt — kodoli atrodas pārāk tuvu viens otram, lai varētu noteikt to robežas
	Neskaitīt pārkļājošos kodolus — nav redzamas visas abu kodolu zonas
	Skaitīt kā divus kontrolsignālus — viens no abiem zaļajiem signāliem ir difūzs



Skaitīt kā divus kontrolsignālus — atstarpe vienā zaļajā signālā ir mazāka nekā divi signāla platumi

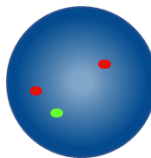
Paredzamie rezultāti

Paredzamais normālu signālu modelis

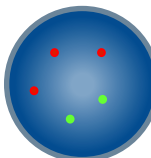


Normālā šūnā ir paredzami divi sarkani un divi zaļi signāli (2S2Z).

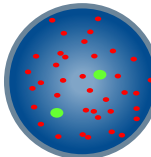
Paredzami anomālo signālu modeļi



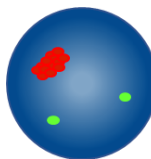
Šūnā ar 1p32.3 delēciju paredzamais signālu modelis ir divi sarkani un viens zaļš signāls (2S1Z).



Šūnā ar 1q21 lokusa pieaugumu ir paredzami divi zaļi un trīs vai vairāk sarkanie signāli (3+S2Z).



Šūnā, kur 1q21 lokusa amplifikācija, tas novērojams kā liels daudzums mazu sarkanu signālu, kas izkliedēti citoplazmā kopā ar diviem zaļiem kontrolsignāliem (ampS2Z).



Šūnā, kur 1q21 lokusa amplifikācijas rezultātā rodas homogēna reģiona iekrāsošanās, ir konstatējams liels daudzums sarkanu signālu attiecībā uz pagarināto paplašināto hromosomālo segmentu kopā ar diviem zaļiem kontrolsignāliem (ampS2Z).

Citi signālu modeļi ir iespējami aneiploīdos/nelīdzsvarotos paraugos.

Zināmie būtiskie traucējumi/traucējošās vielas

Nav zināmu būtisku traucējumu/traucējošu vielu.

Zināmā krusteniskā reakcija

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@ogt.com

ES valstu kompetentajām iestādēm kontaktpersonu medicīnas ierīču kontroles

jautājumus 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 20 metafāzes šūnām no pieciem paraugiem tika analizēti četri hromosomu lokusi, dodot 400 datu punktus. Katras hibridizētās zondes atrašanās vieta ir kartēta, un ir ierakstīts metafāzes hromosomu luminiscētās in situ hibridizācijas (Fluorescence in situ hybridisation — FISH) signālu skaits, kas hibridizējas uz pareizo lokusu.

Katras komplekta zondes analītiskais specifiskums tika aprēķināts kā metafāzes hromosomu FISH signālu skaits, kas hibridizējas 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 Analītiskais specifiskums zondei CKS1B/CDKN2C (P18) Amplification/Deletion Probe

Mērķis	Hibridizēto metafāzes hromosomu skaits	Pareizi hibridizēto lokusu skaits	Analītiskais specifiskums	95% ticamības intervāls
1q21	200	200	100%	98,12%–100%
1p32.3	200	200	100%	98,12%–100%

Analītiskais jutīgums

Analītiskais jutīgums tiek izteikts kā novērtējama interfāzes šūnu ar paredzamu normālo signālu modeli procentuālā vērtība. Katrai no 25 fiksētām kaula smadzeņu šūnu suspensijām un 25 fiksētām šūnu suspensijām ar CD138+ plazmas šūnām, kas tika uzskatītas par negatīvām attiecībā uz CKS1B pieaugumu/amplifikāciju vai CDKN2C delēciju, tika analizētas vismaz 100 starpfāzes šūnas, rezultātā sniedzot vismaz 2500 kodolus katram parauga tipam. Jutīguma dati tika analizēti, pamatojoties uz šūnu procentuālo vērtību, kas parāda parastu paredzamo signālu modeli un tiek izteikti kā procentuālā vērtība ar 95% ticamības intervālu.

2. tabula Zondes CKS1B/CDKN2C (P18) Amplification/Deletion Probe analītiskais jutīgums

Parauga tips	Jutīguma kritēriji	Jutīguma rezultāts
Kaula smadzenes	>95%	98,68% (97,87%–99,49%)
CD138+	>95%	95,95% (94,96%–96,94%)

Normalitātes robežvērtību raksturojums

Normalitātes robežvērtība tiek definēta kā to šūnu procentuālā vērtība, kas uzrāda aplami pozitīvu signālu modeli, kurā indivīds tiktu uzskatīts par normalitāti un neatbilstošs klīniskajai diagnozei. Katrai no 25 fiksētām kaula smadzeņu šūnu suspensijām un 25 fiksētām šūnu suspensijām ar CD138+ šūnām, kas tika uzskatītas par negatīvām attiecībā uz CKS1B pieaugumu/amplifikāciju vai CDKN2C delēciju, tika analizētas vismaz 100 starpfāzes šūnas, rezultātā sniedzot vismaz 2500 kodolus katram parauga tipam.

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

3. tabula Normalitātes robežvērtību raksturojums zondei CKS1B/CDKN2C (P18) Amplification/Deletion Probe

Parauga tips	Robežvērtības rezultāts 3S2Z	Robežvērtības rezultāts 2S1Z
Kaula smadzenes	5,93%	5,71%
CD138+	9,24%	10,21%

Laboratorijām jāveic robežvērtību verifikācija, izmantojot savus datus.^{9,10}

Precizitāte

Šī izstrādājuma precizitāte ir izmērīta dienas precizitātes (no parauga uz paraugu), starpdienu precizitātes (no dienas uz dienu) un vienas vietas starppartiju precizitātes (no partijas uz partiju) izteiksmē.

Lai novērtētu šā produkta precizitāti, tika izmantoti trīs (3) paraugi: 1 normāls CD138+ paraugs, 1 CD138+ nedaudz pozitīvs attiecībā uz 2S1Z (-CDKN2C) un 1 CD138+ nedaudz pozitīvs attiecībā uz 3S2Z (+CKS1B). Vāji pozitīvie CD138+ paraugi tika iegūti, izmantojot negatīvu CD138+ paraugu proporciju un pievienojot tiem pārbaudīti pozitīvus CD138+ paraugus, ar mērķi izgatavot nedaudz pozitīvus paraugus 2–4x produkta robežvērtības diapazonā, lai pārbaudītu noteikto robežvērtību.

Lai noteiktu starpdienu un dienas precizitāti, paraugi tika izvērtēti 10 neseicīgu dienu laikā, un, lai noteiktu precizitāti no partijas uz partiju, 3 produkta partijas tika novērtētas ar vienu un tā paša parauga 3 atkārtojumiem. Rezultāti tika pasniegti kā vispārēja konverģence ar prognozētu negatīvo klasi (negatīviem paraugiem).

4. tabula Zondes CKS1B/CDKN2C (P18) Amplification/Deletion Probe reproducējamība un precizitāte

Mainīgais	Parauga tips	Konverģence
Dienas un starpdienu precizitāte	Normalitāte CD138+ (negatīva)	100%
	CD138+ nedaudz pozitīvs 2S1Z (-CDKN2C)	100%
	CD138+ nedaudz pozitīvs 3S2Z (+CKS1B)	100%
Precizitāte no partijas uz partiju	Normalitāte CD138+ (negatīva)	100%
	CD138+ nedaudz pozitīvs 2S1Z (-CDKN2C)	100%
	CD138+ nedaudz pozitīvs 3S2Z (+CKS1B)	100%

Klīniskā veikspēja

Lai nodrošinātu to, ka produkts konstatē paredzētos pārkārtojumus, klīniskā veikspēja tika noteikta 1 pētījumā par produkta paredzētās populācijas reprezentējošiem paraugiem: atlikušais metanolā/etiķskābē fiksētais materiāls no hematoloģiski iegūtiem paraugiem. Pētījumā izmantoto paraugu apjoms bija 23 paraugi, ar mērķa populāciju 10 pozitīvi paraugi vai nu CKS1B, vai CDKN2C delēcijai, vai abām, un 13 negatīvi paraugi gan CKS1B amplifikācijai, gan CDKN2C delēcijai. Visi paraugi tika padarīti neidentificējami un tika sajaukti, lai novērstu analīzes neobjektivitāti. Rezultāti tika salīdzināti ar zināmo parauga statusu. Zonde pareizi noteica paraugu statusu visās instancēs.

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 CKS1B/CDKN2C (P18) Amplification/Deletion Probe klīniskā veikspēja, amplifikācijas CKS1B rezultāti

Mainīgais	Rezultāts
Klīniskais jutīgums (pareizi pozitīvo rezultātu rādītājs (true positive rate — TPR))	98,71%
Klīniskais specifiskums (pareizi negatīvo rezultātu rādītājs (true negative rate — TNR))	99,75%
Kļūdaini pozitīvo rezultātu rādītājs (false positive rate — FPR) = 1 – specifiskums	0,25%

6. tabula Zondes CKS1B/CDKN2C (P18) Amplification/Deletion Probe klīniskā veikspēja, delēcijas CDKN2C rezultāti

Mainīgais	Rezultāts
Klīniskais jutīgums (pareizi pozitīvo rezultātu rādītājs (true positive rate — TPR))	100%
Klīniskais specifiskums (pareizi negatīvo rezultātu rādītājs (true negative rate — TNR))	100%
Kļūdaini pozitīvo rezultātu rādītājs (false positive rate — FPR) = 1 – specifiskums	0%

Drošuma un veikspējas 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: 50558449LPH039JS

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-pasts: techsupport@cytoCELL.com

Timeklis: www.ogt.com

Atsauces

- Hanamura I, Blood 2006;108(5):1724-32
- Fonseca *et al.*, Leukemia 2009;23(12):2210-2221
- Sawyer, Cancer Genetics 2011;204(1):3-12
- Fonseca *et al.*, Leukemia 2006;20(11):2034-40
- Leone *et al.*, Clin Cancer Res 2008;14(19):6033-41
- Kulkarni *et al.*, Leukemia 2002;16:127-34
- Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
- Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- 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.
- 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.

Simbolu glosārijs

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: Sargāt no saules gaismas	5.3.2
	Iv: Temperatūras ierobežojums	5.3.7
	Iv: Skatīt lietošanas instrukciju	5.4.3
	Iv: Skatīt elektronisko lietošanas instrukciju	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: Sastāvs (vai saturs)	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-pasts: probes@cytoCell.com
Tīmeklī: www.ogt.com



Sysmex Europe SE
Bornbarch 1
22848 Norderstedt
VĀCIJA

Tālr.: +49 40 527260
Tīmeklī: www.sysmex-europe.com

Lietošanas instrukcijas variantu vēsture

V001.00 2023-01-11: Jauna lietošanas instrukcija atbilstoši Regulai (ES) 2017/746.