



A Sysmex Group Company



Lietošanas instrukcija

ATS.: CE-LPH 013-S / CE-LPH 013

MLL (KMT2A) Breakapart Probe



TIKAI PROFESIONĀLAM LIETOJUMAM



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

Paredzētais lietošanas mērķis

Zonde CytoCell® MLL (KMT2A) Breakapart Probe ir kvalitatīvs, neautomatizēts luminiscents *in situ* hibridizācijas (fluorescence in situ hybridisation — FISH) tests, kas paredzēts hromosomālo pārkārtojumu noteikšanai 11. hromosomas reģionā 11q23.3 Karnuā šķīdumā (3:1 metanols/etiķskābe) fiksētās hematoloģiski iegūtās šūnu suspensijās no pacientiem, kuriem ir konstatēta akūta mieloleikoze (AML), mielodisplastiskie sindromi (MDS), vai akūta limfoblastiskā leikēmija (ALL) vai arī 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 *MLL* (*KMT2A*) pārkārtojuma statusu ir svarīga klīniskajai pārvaldībai.

Ierobežojumi

Šī ierīce ir paredzēta pārkārtojumu ar pārtraukumpunktiem noteikšanai reģionā, ko ietver sarkanie un zaļie kloni šajā zonžu komplektā, kurā ietilpst *MLL* (*KMT2A*) gēns. Izmantot šo ierīci, var netikt noteikti pārtraukumpunkti ārpus šī reģiona vai pārkārtojumu varianti, kas pilnībā ietilpst šajā reģionā.

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

Šī ierīce nav validēta paraugu tiptiem, slimību tiptiem vai mērķiem, kas neatbilst paredzētajai lietošanai.

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

Luminiscents *in situ* hibridizācija (fluorescence in situ hybridisation — FISH) ir metode, kas ļauj noteikt DNS sekvenču metafāžu hromosomās vai interfāzes kodolos fiksētiem citogēniskiem paraugiem. Šajā metodē tiek izmantotas DNS zondes, kas hibridizējas ar veselām hromosomām vai atsevišķām unikālām sekvencēm un kalpo kā efektīvs G joslu citogēniskās 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 nesaisītā un nespecifiski saistītā DNS zonde tiek aizvākta un DNS tiek kontrastēta

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

Informācija par zondi

KMT2A (lizīna metiltransferāze 2A) gēns, kas atrodas 11q23.3, parasti ir pārkārtots akūtas leikēmijas, it īpaši zīdaiņa vecumā, kā arī sekundārās leikēmijas gadījumos pēc DNS topoizomerāzes II inhibitoru terapijas¹.

KMT2A gēnam ir izteikta homoloģija ar drozofilas tritoraksa gēnu un tas kodē histonu metiltransferāzi, kas darbojas kā epigenētisks transkripcijas regulators. *KMT2A* translokācijas izraisa himēriska proteīna veidošanos, kurā notiek *KMT2A* aminoterminālās daļas fūzija ar fūzijas partnera gēna karboksiterminālo daļu. Funkcionālajam proteīnam ir kritiski svarīga loma embrija attīstībā un hematopoēzē^{1,2,3,4}.

KMT2A pārkārtojumu var konstatēt aptuveni 80% zīdaiņa vecumposma pacientu, kas cieš no akūtas limfoblastiskās leikēmijas (ALL), un 5–10% pediatriko un pieaugušo pacientu, kas cieš no ALL^{3,4}. Tie arī ir konstatējami 60% akūtas mieloidās leikēmijas (AML) gadījumu pacientiem zīdaiņa vecumposmā, kā arī 3% de novo un 10% ar terapiju saistītos pieaugušo pacientu AML gadījumos^{3,5}. Pašlaik ir identificēti vairāk nekā 70 partneri, un visbiežāk sastopamās translokācijas ir *MLL::AFF1*; t(4;11)(q21;q23.3), *MLL::MLLT4*; t(6;11)(q27;q23.3), *MLL::MLLT3*; t(9;11)(p22;q23.3) un *MLL::MLLT1*; t(11;19)(q23.3;p13.3)¹.

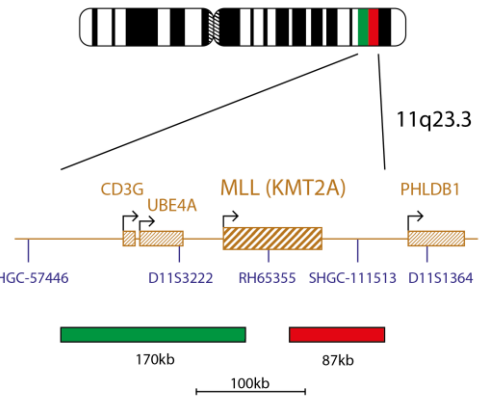
KMT2A pārkārtojumi vēsturiski tika saistīti ar nelabvēlīgu iznākumu, bet jaunāko pētījumu rezultāti liecina, ka prognoze ļoti lielā mērā ir atkarīga no fūzijas partnera un var būt atšķirīga pieaugušajiem un pediatrijas pacientiem¹.

Zondes specifika

MLL, 11q23.3, sarkana

MLL, 11q23.3, zaļa

CMP-H036 v006.00



MLL produktā ietilpst 87 kb zonde, kas marķēta sarkanā krāsā un nosedz reģionu, kas atrodas telomēriski *MLL* (*KMT2A*) gēnam, tostarp marķieri SHGC-111513, un zaļā krāsā marķēta zonde, kas nosedz 170 kb reģionu centromēriski *MLL* gēnam un ietver *CD3G* un *UBE4A* gēnus.

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

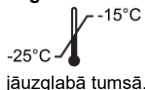
1. Lietošanai *in vitro* diagnostikā. Tikai profesionālam lietojumam laboratorijā.
2. Zondes maisījumos ietilpst formamīds, kas ir teratogēns, tādēļ nedrīkst pieļaut to izgarojumu ieelpošanu un nonākšanu saskarē ar ādu. Rīkojieties ar to piesardzīgi; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku.
3. Rīkojieties ar DAPI piesardzīgi; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku.
4. Nelietot, ja flakons(-i) ir bojāts(-i) vai flakona saturs jebkāda veida 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 jebkādos 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 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/saldēts/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 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 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 iespējamais, lai ierobežotu gaismas un temperatūras svārstību ietekmi.

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

Ir jāizmanto kalibrēts aprīkojums.

- Sildierīce (ar cietu sildvirsmu un precīzu temperatūras regulēšanu līdz pat 80 °C)
- Kalibrētas dažāda tilpuma mikropipetes un uzgaļi 1–200 µl diapazonā.
- Ūdens vanna ar precīzu temperatūras regulēšanu 37 °C un 72 °C
- Mikrocentrifugas mēģenes (0,5 ml)
- Luminiscences mikroskops (sk. sadaļu Uz luminiscences mikroskopu attiecināmie ieteikumi)
- Fāžu kontrasta mikroskops
- Tīri plastmasas, keramikas vai karstumizturīga stikla Koplina trauki
- Pincete
- Kalibrēta pH mērierīce (vai pH indikatora strēmeles, ar kurām var veikt mērījumus pH 6,5–8,0 diapazonā)
- Konteiners ar mitru vidi
- Luminiscencei atbilstoša mikroskopa objektīva iegremdēšanas eļļa
- Galda centrifūga
- Mikroskopa priekšmetstikliņi
- 24x24 mm segstikliņi
- Taimeris
- 37 °C inkubators
- Gumijas līme
- Virpuļmaisītājs
- Mērcilindri
- Magnētiskais maisītājs
- Kalibrēts termometrs

Papildaprīkojums, kas nav ietverts komplektācijā

- Citoģenētiskā žāvēšanas kamera

Nepieciešamie reaģenti, kas nav ietverti komplektācijā

- 20x citrāta fizioloģiskais šķīdums (saline-sodium citrate — SSC)
- 100% etanols
- Tween-20
- 1M nātrija hidroksīds (NaOH)
- 1M sālsskābe (HCl)
- Attīrīts ūdens

Uz luminiscences 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 zonžu komplektā izmantotie fluorofori tiks ierosināti un izstaros tālāk norādītā garuma viļņos.

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 trīsjoslu DAPI/zaļā spektra/sarkana spektra filtru vai divjoslu zaļā spektra/sarkana 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 šķīdumā (3:1 metanols/etiķskābe), no pacientiem, kuriem ir konstatēta akūta mieloleikoze (AML), mielodisplastiskie sindromi (MDS), akūta limfoblastiskā leikēmija (ALL) vai arī pastāv aizdomas par tās esamību, un ir sagatavotas atbilstoši laboratorijā vai iestādē spēkā esošajām vadlīnijām. Sagatavojiet gaisā nožāvētus paraugus uz mikroskopa priekšmetstikliņiem atbilstoši standarta citoģenētiskajām procedūrām. AGT *citoģenētikas laboratorijas rokasgrāmātā* ir ietverti ieteikumi par paraugu ņemšanu, kultūrēšanu, ievākšanu un priekšmetstikliņu sagatavošanu⁶.

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.

Luminiscentās in situ hibridizācijas protokols (FISH)

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

Priekšmetstikliņa sagatavošana

- 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).
- Iegremdējiet priekšmetstikliņu 2xSSC šķīdumā istabas temperatūrā uz 2 minūtēm, neveicot maisīšanu.
- Veiciet dehidrēšanas etanolā sērijas (70%, 85% un 100%), katru 2 minūtes istabas temperatūrā.
- Ļaujiet nožūt.

Priekšdenaturēšana

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

Denaturēšana

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

Hibridizācija

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

Skalošana pēc hibridizācijas

- Izņemiet DAPI no saldētavas un ļaujiet tam sasilt līdz istabas temperatūrai.
- Noņemiet segstikliņu un rūpīgi notīriet visas līmes atliekas.
- Iegremdējiet priekšmetstikliņu 0,4xSSC (pH 7,0) 72 °C (+/- 1 °C) temperatūrā uz 2 minūtēm netaisot.
- Noteciniet šķīdumu no priekšmetstikliņa un iegremdējiet to 2xSSC, 0,05% Tween-20 šķīdumā istabas temperatūrā (pH 7,0) uz 30 sekundēm netaisot.
- Noteciniet šķīdumu no priekšmetstikliņa un katram paraugam pievienojiet 10 µl DAPI luminiscences uzturēšanas līdzekli.
- Uzlieciet segstikliņu, likvidējiet burbuļus un ļaujiet krāsai attīstīties 10 minūtes.
- Skatiet luminiscences mikroskopā (sk. **Uz luminiscences mikroskopu attiecināmie ieteikumi**).

Ieteikumi attiecībā uz procedūru

- Priekšmetstikliņu karsēšana vai novecošana var samazināt signāla luminiscenci.

- Tādu reaģentu izmantošana, kas nav uzņēmuma Cytozell Ltd. nodrošinātie vai ieteiktie reaģenti, var nelabvēlīgi ietekmēt hibridizācijas apstākļus.
- Šķīdumu, ūdens vannu un inkubatoru temperatūras mērīšanai jāizmanto kalibrēts termometrs, jo norādītās temperatūras ievērošana ir kritiski svarīga produkta optimālas veiktspējas nodrošināšanai.
- 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.
- Nepilnīga denaturēšana var izraisīt signāla nepietiekamību, savukārt pārmērīga denaturēšana arī var izraisīt nespecifisku sasaisti.
- Pārmērīga hibridizācijas dēļ iespējami papildu vai neparedzēti signāli.
- Pirms testa izmantošanas diagnostikas nolūkiem lietotājiem ir jāveic protokola optimizācija atbilstoši saviem paraugiem.
- Ja apstākļi nav pietiekami optimāli, iespējama nespecifiska sasaiste, kas var tikt nepareizi interpretēta kā zondes signāls.

Rezultātu interpretēšana

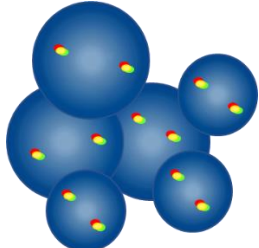
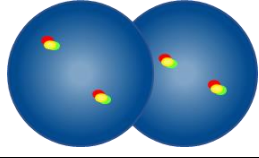
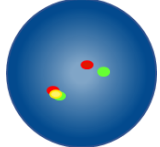
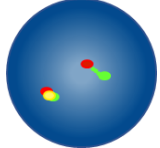
Sagatavotā priekšmetstikliņa ar paraugu kvalitātes novērtēšana

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 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.

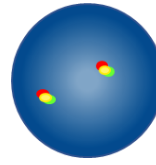
Uz analīzi attiecināmās vadlīnijas

- 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 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 pārklājošies 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 attālumus starp tiem nepārsniedz divus signāla platumus, vai arī abus signālus savieno tikko redzams pavediens, šie signāli ir uzskatāmi par vienu signālu.
- Analizējot divkrāsu sadalīšanās zondes, ja attālumus starp sarkano un zaļo signālu nepārsniedz 2 signāla platumus, 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 divus fūzijas signālus — atstarpe starp sarkano un zaļo signālu ir mazāka nekā divi signāla platumi
	Skaitīt kā divus fūzijas signālus — viens fūzijas signāls ir difūzs

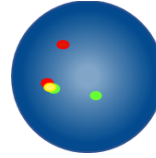
Paredzami rezultāti

Paredzamais normālu signālu modelis



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

Paredzamais anormālo signālu modelis



Šūnā ar līdzsvarotu *MLL (KMT2A)* pārkārtojumu paredzamais signālu modelis ir viens sarkans, viens zaļš un viens sarkans/zaļš fūzijas signāls (1F1S1Z).

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 jautājumos saraksts ir atrodams šajā vietnē:

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

Specifiskās veiktspējas raksturlielumi

Anālītiskais specifiskums

Anālītiskais specifiskums tiek izteikts kā to signālu procentuālā vērtība, kas hibridizējas ar pareizo lokusu un nekādu citu vietu. Anālītiskais specifiskums tika noteikts, veicot 200 mērķa lokusu analīzi. Katrā no 20 metafāzes šūnām no 5 paraugiem tika analizēti 2 hromosomu lokusi, dodot 200 datu punktus. Anālītiskais specifiskums tika noteikts, luminiscētās in situ hibridizācijas (FISH) signālu, kas hibridizējās ar pareizo lokusu, skaitu izdalot ar hibridizēto luminiscētās in situ hibridizācijas signālu kopskaitu.

Katras komplekta zondes anālītiskais 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 *MLL (KMT2A) Breakapart Probe* anālītiskais specifiskums

Zonde	Mērķis	Hibridizēto metafāzes hromosomu skaits	Pareizi hibridizēto lokusu skaits	Anālītiskais specifiskums (%)	95% ticamības intervāls (%)
<i>MLL</i> distāli, sarkana	11q23.3	200	200	100	98,12–100
<i>MLL</i> proksimāli, zaļa	11q23.3	200	200	100	98,12–100

Anālītiskais jutīgums

Anālītiskais jutīgums tiek izteikts kā novērtējama interfāzes šūnu ar paredzamu normālo signālu modeli procentuālā vērtība. Katrai no 25 Karnuā šķīdumā fiksētām kariotipiski normālu kaula smadzeņu suspensijām tika analizētas vismaz 200 starpāzes šūnas, rezultātā sniedzot vismaz 5000 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 *MLL (KMT2A) Breakapart Probe* anālītiskais jutīgums

Šūnu ar paredzamiem signālu modeļiem skaits	Kopējais šūnu ar novērtējamajiem signāliem skaits	Anālītiskais jutīgums (%)	95% ticamības intervāls (%)
4965	5000	99,3	99,08–99,52

Normalitātes robežvērtību raksturojums

Uz luminiscentās in situ hibridizācijas (FISH) zondēm attiecināmā normalitātes robežvērtība ir novērtējama interfāzes šūnu ar specifisku anormālo signālu modeli, ar kādu paraugs ir uzskatāms par normālu attiecībā uz šādu signālu modeli, maksimālā procentuālā vērtība.

Normalitātes robežvērtība tika noteikta, izmantojot paraugus, kuri ir negatīvi attiecībā uz pārkārtojumu, kura noteikšanai ir paredzēta šī zonde, un beta inversijas funkciju. Katram paraugam tika reģistrēti 100 interfāzes kodolu signālu modeļi, kuru reģistrēšanu veica divi neatkarīgi laboratorijas speciālisti, kopumā reģistrējot 200 signālu modeļus katram paraugam.

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

3. tabula Zondes MLL (KMT2A) Breakapart Probe normalitātes robežvērtību raksturojums

Anomālu signālu modelis	Robežvērtības ģenerēšanai analizēto paraugu skaits	Novērtēto kodolu skaits katrā paraugā	Maksimālais kļūdaini pozitīvo signālu modeļu skaits	Normalitātes robežvērtība (%)
1S1Z1F	1600	200	3	3,8

Laboratorijām jāveic robežvērtību verifikācija, izmantojot savus datus.^{7,8}

Reproducējamība

Reproducējamības pētījumi tika veikti, lai noteiktu:

- 3 laboratoriju dienas reproducējamību (paraugu līmeņa)
- 3 laboratoriju starpdienu reproducējamību (dienas līmeņa)
- 3 laboratoriju starplaboratoriju reproducējamību (laboratorijas līmeņa)
- Laboratorijas starppartiju reproducējamību (partijas līmeņa)

Reproducējamība tika noteikta trīs atsevišķās laboratorijās, kurās tika testēti seši kodēti paraugi (divi negatīvi attiecībā uz pārkārtojumu, divi nedaudz pozitīvi paraugi, kas 1–3 reizes pārsniedza robežvērtību, un divi augsta līmeņa pozitīvi paraugi, kuros vairāk nekā 45% šūnu bija pozitīvas attiecībā uz pārkārtojumu). Analīze tika veikta, izmantojot divus katra parauga replikātus piecu nesečīgu dienu laikā.

Visās trīs norises vietās tika veikta testēšana dienas, starpdienu un starplaboratoriju režīmā, izmantojot vienu zonu partiju, kā arī vienā no norises vietām tika testēta stappartiju reproducējamība, izmantojot trīs atšķirīgas zonu partijas. Reproducējamība tika aprēķināta, izmantojot katra testa ietvaros pētīto mainīgo lielumu konverģenci.

4. tabula Zondes MLL (KMT2A) Breakapart Probe reproducējamība

Reproducējamības pētījums	Paraugi	Konverģence (%)
Dienas/starpdienu/starplaboratoriju	90% konverģences negatīvā klase	100%
	95% konverģences izteikti pozitīvā klase	100%
Starppartiju	90% konverģences negatīvā klase	100%
	95% konverģences izteikti pozitīvā klase	100%

Klīniskā veiktspēja

Lai nodrošinātu, ka produkts atklāj paredzēto pārkārtošanos, klīniskā veiktspēja tika noteikta trīs sekojošu pētījumu laikā, kas tika veikti ārējās testēšanas laboratorijās. Pētījumu kopējais paraugu apjoms bija četršimt astoņdesmit astoņi (488), no kuriem astoņpadsmit (18) bija pozitīvi un četršimt septiņdesmit (470) negatīvi paraugi visās laboratorijās kopā. Katra parauga pozitīvo statusu apstiprināja, izmantojot salīdzinājuma komerciālo zondi, ko tirgo konkurējošs uzņēmums un kas konstatē tādas pašas novirzes kā novērtējamās zondes, vai izmantojot salīdzinājumu ar G bandžas kariotipu.

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 MLL (KMT2A) Breakapart Probe klīniskā veiktspēja

Mainīgais	Rezultāts
Klīniskais jutīgums (pareizi pozitīvo rezultātu rādītājs (true positive rate — TPR))	99,93%
Klīniskais specifiskums (pareizi negatīvo rezultātu rādītājs (true negative rate — TNR))	99,97%
Kļūdaini pozitīvo rezultātu rādītājs (false positive rate — FPR) = 1 – specifiskums	0,03%

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: 50558449LPH013J8

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

Papildinformācija

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

Tālr.: +44 (0)1223 294048

E-pasts: techsupport@cytozell.com

Tīmekļi: www.oqt.com

Atsauces

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, MJ. 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.

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)

CONT	Iv: Sastāvs (vai satur)	N/p
------	-------------------------	-----

Patenti un preču zīmes

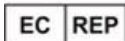
CytoCell ir reģistrēta CytoCell Limited preču zīme.



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
Tīmeklis: www.oqt.com



Sysmex Europe SE

Bornbarch 1
22848 Norderstedt
VĀCIJA

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

Lietošanas instrukcijas variantu vēsture

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