A Sysmex Group Company

CytoCell

Instrukcja użytkowania (IFU)

REF: CE-LPH 011-S / CE-LPH 011

ATM Deletion Probe

CE IVD
2797

WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO

ogt.com/IFU

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

Przeznaczenie
Produkt CytoCell® ATM Deletion Probe to jakościowy, niezautomatyzowany test wykonywany metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) przeznaczony do detekcji chromosomowych delecji w regionie 11q22.3 chromosomu 11. w utrwalonych w roztworze Carnoya (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1) zawiesinach komórek pochodzenia hematologicznego pobranych od pacjentów z rozpoznaniem lub podejrzeniem przewlekłej białaczki limfocytowej (Chronic Lymphocytic Leukaemia, CLL).

Wskazanie 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 delecji genu *ATM* w istotny sposób wpływałaby na postępowanie kliniczne.

Ograniczenia
Ten wyrób jest przeznaczony do wykrywania ubytków genomowych większych niż region obejmowany przez czerwony klon zawarty w tym zestawie sond, a który obejmuje region genu *ATM*. Wyrób ten może nie umożliwić wykrycia ubytków genomowych, do których doszło poza tym regionem, lub częściowych ubytków, do których doszło 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.

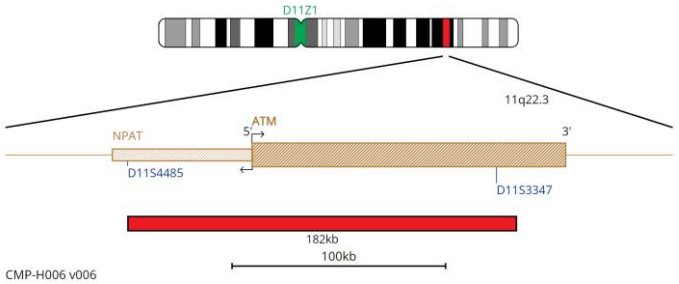
Zasady działania testu
Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydyzują 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 zhybrydyzowane do materiału docelowego można następnie obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Informacje o sondzie
Gen *ATM* kodujący kinazę białkową (*ATM serine/threonine kinase*), zlokalizowany w regionie 11q22.3, często ulega delecji u osób z przewlekłą białaczką limfocytową (CLL) z komórek B. Gen *ATM* koduje ważne białko stanowiące punkt kontrolny, które jest zaangażowane w zarządzanie uszkodzeniami komórki. Jego funkcją jest ocena poziomu uszkodzeń DNA w komórce i próba ich naprawy poprzez fosforylację kluczowych substratów zaangażowanych w szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA[1].

B-CLL to typ białaczki najczęściej występujący u dorosłych; jej przebieg może być różny — od bardzo powolnego do gwałtownie postępującego. Ze względu na niską aktywność mitotyczną komórek białaczkowych w warunkach *in vitro* konwencjonalne metody cytogenetyczne z wykorzystaniem mitogenów dla komórek B umożliwiają wykrycie klonalnych nieprawidłowości chromosomowych w 40–50%[2] przypadków B-CLL, natomiast analiza FISH umożliwia identyfikację aberracji chromosomowych w około 80% przypadków B-CLL[2]. Badania przesiewowe w kierunku delecji genu *ATM* i/lub genu *TP53* mają kluczowe znaczenie dla decyzji dotyczących doboru terapii u pacjentów z B-CLL, ponieważ delecje genów *TP53* i *ATM* powiązano z gorszym rokowaniem tej choroby[4]. Z uwagi na to technika FISH okazała się istotnym narzędziem do diagnozowania i prowadzenia leczenia pacjentów z B-CLL[2,3,4].

Analiza interakcji genów *ATM/TP53* w B-CLL potwierdziła, że geny *TP53* i *ATM* odgrywają ważną rolę w proliferacji raka limfoidalnego[1]. Wykazano, że gen *ATM* nasila fosforylację białka kodowanego przez gen *TP53*, jeżeli uszkodzenia są tak duże, że komórka wymaga zniszczenia na drodze apoptozy (w której pośredniczy białko kodowane przez gen *TP53*). Delecja genu *ATM* powoduje zanik tej aktywności stanowiącej punkt kontrolny, a co za tym idzie nie dochodzi do aktywacji białka kodowanego przez gen *TP53*. W związku z tym, pomimo obecności białka kodowanego przez gen *TP53*, nie są podejmowane próby naprawy uszkodzeń ani inicjacji apoptozy uszkodzonych komórek. W przypadku braku genu *ATM* uszkodzone komórki mogą dalej ulegać proliferacji[5].

Specyfikacja sondy
ATM, 11q22.3, kolor czerwony
D11Z1, 11p11.11-q11, kolor zielony



Sonda ATM o długości 182 kz jest wyznakowana czerwonym fluoroforem i obejmuje telomeryczny koniec genu *NPAT* i centromeryczny koniec genu *ATM*, zaraz za markerem D11S3347. Mieszanina sond zawiera również sondę kontrolną dla centromeru chromosomu 11. (D11Z1) wyznakowaną zielonym fluoroforem.

Dostarczone materiały
Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)
Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydyzacyjnym (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-fenyloindol) w środku do zamykania na bazie glicerolu).

Ostrzeżenia i środki ostrożności
1. Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego w laboratorium.
2. Mieszaniny 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.
3. Zachować ostrożność podczas pracy z barwnikiem DAPI; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny.
4. Nie używać produktu, jeśli fiolka jest uszkodzona lub jej zawartość została w jakikolwiek sposób naruszona.
5. W celu bezpiecznego usuwania tego produktu należy postępować zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi usuwania odpadów oraz zaleceniami 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 zlecanie ich przetwarzania i usuwania) zgodnie z wszelkimi obowiązującymi przepisami.
7. Operatorzy muszą być w stanie rozróżniać 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 -25ºC do -15ºC 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 hybrydyzacyjny 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 ograniczać 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 80ºC)
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 37ºC i 72ºC
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 obiektywów mikroskopowych klasy fluorescencyjnej
12. Wirówka laboratoryjna
13. Szkiełka mikroskopowe
14. Szkiełka nakrywkowe o wymiarach 24x24 mm
15. Stoper
16. Inkubator nastawiony na temperaturę 37ºC
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 próbki

Zestaw jest przeznaczony do stosowania na utrwalonych w roztworze Carnoya (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1) zawiesinach komórek pochodzenia hematologicznego. 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 preparatów[6].

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

Denaturacja

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

Hybrydyzacja

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

Płukania po hybrydyzacji

12. Wyjąć barwnik DAPI z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej.
13. Ostrożnie zdjąć szkiełko nakrywkowe i usunąć wszelkie pozostałości kleju.
14. Zanurzyć szkiełko w 0,4x stężonym roztworze SSC (pH 7,0) w temperaturze 72ºC (+/-1ºC) na 2 minuty; nie wstrząsać.
15. 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.
16. Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie nanieść 10 µl barwnika DAPI antifade na każdą próbkę.
17. Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić rozwój barw.
18. Obejrzeć pod mikroskopem fluorescencyjnym (patrz **Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego**).

Zalecenia dotyczące procedury

1. Wypiekanie lub postarzanie preparatów może zmniejszyć fluorescencję sygnału.
2. Stosowanie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę Cytocell Ltd może mieć negatywny wpływ na warunki hybrydyzacji.
3. Do pomiaru temperatury roztworów, łaźni wodnych i inkubatorów należy używać skalibrowanego termometru, ponieważ temperatury te są kluczowe dla optymalnego działania produktu.
4. 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.
5. Niecałkowita denaturacja może spowodować brak sygnału, a nadmierna denaturacja może również doprowadzić do nieswoistego wiązania.
6. Nadmierna hybrydyzacja może spowodować otrzymanie dodatkowych lub nieoczekiwanych sygnałów.
7. Przed użyciem testu do celów diagnostycznych użytkownicy powinni zoptymalizować protokół dla własnych próbek.
8. Suboptymalne warunki mogą prowadzić do nieswoistego wiązana sond, które może zostać błędnie zinterpretowane jako sygnał sondy.

Interpretacja wyników

Ocena jakości preparatów

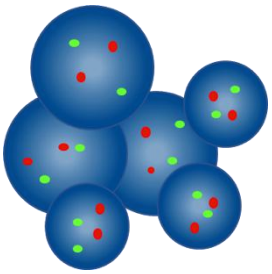
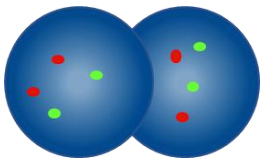
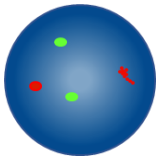
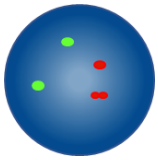
Preparatu nie należy oceniać w następujących przypadkach:

- 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

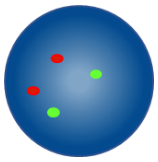
- Każda próbka powinna być analizowana i interpretowana przez dwóch analityków. Wszelkie rozbieżności powinny zostać rozwiązane w wyniku oceny dokonanej przez trzeciego analityka.
- Każdy analityk powinien posiadać odpowiednie kwalifikacje zgodne z normami krajowymi.
- Każdy analityk powinien dokonać 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.
- Dotyczy analizy wyników uzyskanych za pomocą trzykolorowych sond wykrywających miejsca złamań: jeśli pomiędzy którymikolwiek z 3 sygnałów (czerwonym, zielonym, niebieskim) 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 czerwone i dwa sygnały zielone — jeden z dwóch sygnałów czerwonych jest rozlany
	Zliczyć jako dwa sygnały czerwone i dwa sygnały zielone — przerwa widoczna w jednym czerwonym sygnale jest mniejsza niż dwie szerokości sygnału

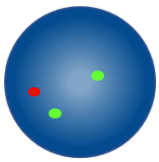
Wyniki oczekiwane

Oczekiwany wzorzec sygnału wskazujący na stan prawidłowy



Oczekiwany wzorzec sygnału w komórce prawidłowej to dwa sygnały czerwone i dwa sygnały zielone (2C2Z).

Oczekiwany wzorzec sygnału wskazujący na stan nieprawidłowy



Oczekiwany wzorzec sygnału w komórce z delecją genu ATM to jeden sygnał czerwony i dwa sygnały zielone (1C2Z).

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

Zielona sonda D11Z1 może wykazywać hybrydyzację krzyżową względem regionów 1c, Xc i 17c.

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@ogt.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 jest definiowana jako odsetek sygnałów, które hybrydyzują

do właściwego locus i nie hybrydyzują do żadnej innej lokalizacji. Analizie poddano cztery loci chromosomowe w każdej z dwudziestu komórek metafazowych w pięciu próbkach, uzyskując łącznie 400 punktów danych. Zmapowano lokalizację każdej zhybrydyzowanej sondy i zarejestrowano liczbę sygnałów FISH chromosomu metafazowego, które hybrydyzowały do właściwego locus.

Swoistość analityczną każdej sondy zawartej w zestawie obliczono jako liczbę sygnałów FISH chromosomu metafazowego zhybrydyzowanych do prawidłowego locus podzieloną przez całkowitą liczbę zhybrydyzowanych 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 ATM Deletion Probe

Locus docelowe	Liczba chromosomów metafazowych, w których doszło do hybrydyzacji	Liczba loci, w których doszło do prawidłowej hybrydyzacji	Swoistość analityczna	95-procentowy przedział ufności
11q22.3	200	200	100%	98,12–100%
11p11.11-11q11	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 zawiesin komórek szpiku kostnego i każdej z 25 utrwalonych zawiesin komórek krwi obwodowej analizowano co najmniej 100 komórek interfazowych, uzyskując łącznie co najmniej 2500 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 ATM Deletion Probe

Typ próbki	Kryterium czułości	Wynik czułości
Szpik kostny	>95%	97,48% (96,58–98,38%)
Krew obwodowa	>95%	96,88% (95,60–98,16%)

Charakterystyka wartości odcięcia dla stanu prawidłowego
Wartość odcięcia dla stanu prawidłowego jest definiowana jako odsetek komórek wykazujących fałszywie dodatni wzorzec sygnału, przy którym stan osoby należy uznać za prawidłowy i niezgodny z rozpoznaniem klinicznym. Dla każdej z 25 utrwalonych zawiesin komórek szpiku kostnego i każdej z 25 utrwalonych zawiesin komórek krwi obwodowej analizowano co najmniej 100 komórek interfazowych, uzyskując łącznie co najmniej 2500 jąder komórkowych poddanych ocenie dla każdego typu próbki.

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 ATM Deletion Probe

Typ próbki	Wartość odcięcia
Szpik kostny	9,77%
Krew obwodowa	10,58%

Laboratoria muszą zweryfikować wartości odcięcia w oparciu o własne dane[7,8].

Precyzja
Precyzję tego produktu zmierzono w kategoriach precyzji w ramach dnia (między próbkami), precyzji między dniami oraz precyzji między seriami w jednym ośrodku.

Do oceny precyzji tego produktu wykorzystano dwie próbki: jedna próbkę ujemnych komórek szpiku kostnego oraz jedną utworzoną sztucznie próbkę nisko dodatnich komórek szpiku kostnego, którą wykorzystano do oceny działania produktu przy poziomie zbliżonym do ustalonej wartości odcięcia produktu.

W celu ustalenia precyzji między dniami i w ramach dnia próbki poddawano ocenie w 10 nienastępujących po sobie dniach, a w celu ustalenia precyzji między seriami trzy serie produktu poddawano ocenie poprzez wykonanie trzech powtórzeń dla tej samej próbki. Wyniki przedstawiono jako zgodność ogółem z przewidywaną klasą ujemną (dla próbek ujemnych).

Tabela 4. Odtwarzalność i precyzja dla produktu ATM Deletion Probe

Zmienna	Typ próbki	Zgodność
Odtwarzalność w ramach dnia (między próbkami) i między dniami	Ujemne komórki szpiku kostnego	100%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego	100%
Odtwarzalność między seriami	Ujemne komórki szpiku kostnego	100%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego	100%

Skuteczność kliniczna
W celu zapewnienia, że produkt wykrywa rearanżacje, do których oceny jest przeznaczony, ustalono skuteczność kliniczną produktu w oparciu o trzy badania wykonane na reprezentatywnych próbkach docelowej populacji pacjentów, czyli próbkach pochodzenia hematologicznego utrwalonych za pomocą roztworu metanol/kwas octowy w stosunku 3:1. Wielkość próby tego badania wynosiła 27 próbek, przy czym populacja docelowa liczyła 13 próbek dodatnich i 14 próbek ujemnych, w tym 11 próbek ujemnych komórek szpiku kostnego, 3 próbki ujemnych komórek krwi obwodowej, 10 próbek dodatnich komórek szpiku kostnego i 3 próbki dodatnich komórek krwi obwodowej. Produkt zawierający sondy umożliwił prawidłową identyfikację statusu próbek we wszystkich przypadkach.

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 ATM Deletion Probe

Zmienna	Wynik
Czułość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie dodatnich (True Positive Rate, TPR))	100,00%
Swoistość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie ujemnych (True Negative Rate, TNR))	100,00%
Odsetek wyników fałszywie dodatnich (False Positive Rate, FPR) = 1 – swoistość	0,00%

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: 50558449LPH011J4

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@cytocell.com
Strona WWW: www.ogt.com

Piśmiennictwo

1. Stankovic, *et al*. Blood. 2004;103(1):291-300.
2. Dohner, *et al*. N Eng J Med. 2000;343:1910-1916.
3. Zent, *et al*. Blood. 2010;115(21):4154-4155.
4. Rossi, *et al*. Blood. 2013;121(8):1403-1412.
5. Khanna, *et al*. Nature Genetics. 1998;20(4):398-400.
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.

Glosariusz symboli

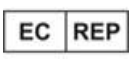
EN ISO 15223-1:2021 — „Wyroby medyczne — Symbole do stosowania wraz z informacjami dostarczanymi przez producenta — Część 1: Wymagania ogólne” (© International Organization for Standardization)		
Symbol	**Tytuł**	**Numery referencyjne**
	**pl:** Wytwórca	5.1.1
	**pl:** Autoryzowany przedstawiciel we 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:** Zajrzyj do instrukcji używania	5.4.3
 ogt.com/IFU	**pl:** Zajrzyj do elektronicznej instrukcji używania	5.4.3
	**pl:** Ostrzeżenie	5.4.4
	**pl:** Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*	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
E-mail: probes@cytocell.com
Strona WWW: www.ogt.com



Sysmex Europe SE
Deelböge 19 D
22297 Hamburg
NIEMCY

Strona WWW: www.sysmex-europe.com

Historia wersji dokumentu IFU
V001 2026-10-29: Nowy dokument IFU zgodny z Rozporządzeniem (UE) 2017/746