



A Sysmex Group Company



Lietošanas instrukcijas

REF: LPH 036-S/LPH 036

EV11 (MECOM) Breakapart Probe



TIKAI PROFESIONĀLAM LIETOJUMAM



www.cytoCELL.com

Papildinformācija un informācija citās valodās ir pieejama vietnē
www.ogt.com

Ierobežojumi

Šī ierīce ir paredzēta pārkārtojumu ar pārtraukumpunktiem noteikšanai reģionā, ko ietver sarkanie, zaļie un zilie kloni šajā zonžu komplektā, kurā ietilpst reģions *EV11* (*MECOM*). Izmantojot šo produktu, iespējams, ka netiek noteikti pārtraukumpunkti ārpus šī reģiona vai pārkārtojumu varianti, kas pilnībā ietilpst šajā reģionā.

Šo testu nav paredzēts izmantot kā autonomu diagnostikas līdzekli, prenatalai testēšanai, konkrētu populāciju skrīningam, testēšanai ārpus laboratorijas un paštestēšanai. Šis produkts ir paredzēts tikai profesionālai lietošanai laboratorijās; visu rezultātu interpretēšana jāveic atbilstoši kvalificētiem darbiniekiem, ņemot vērā citu attiecināmo testu rezultātus.

Šis produkts nav apstiprināts lietošanai tādu tipu paraugiem vai slimībām, kas nav norādīti informācijā par paredzēto lietojumu.

FISH rezultātu uzrādīšana un interpretēšana ir jāveic atbilstoši profesionālajiem prakses standartiem, ņemot vērā citu klīnisko un diagnostisko informāciju. Šis komplekts ir paredzēts kā citu diagnostisko laboratorijas testu palīg līdzeklis, un lēmumus par terapiju nedrīkst pieņemt, vadoties tikai pēc fluorescētās *in situ* hibridizācijas (FISH) rezultātiem.

Protokola neievērošana var ietekmēt veiktspēju, un var tikt iegūti kļūdaini pozitīvi vai kļūdaini negatīvi rezultāti.

Šis komplekts nav apstiprināts izmantošanai nolūkiem, kas neatbilst norādītajam paredzētajam lietojumam.

Paredzētais lietojums

Zonde CytoCell EV11 (*MECOM*) Breakapart Probe ir kvalitatīvs, neautomatizēts fluorescences *in situ* hibridizācijas (fluorescence *in situ* hybridisation, FISH) tests, kas paredzēts hromosomālo pārkārtojumu, kas ietver 3. hromosomas reģionu 3q26.2, noteikšanai Karnuā šķīdumā (3:1 metanols/etiķskābe) fiksētās hematoloģiski iegūtās šūnu suspensijās no pacientiem, kuriem ir konstatēta akūta mieloleikoze (AML), mielodisplastiskais sindroms (MDS) vai arī pastāv aizdomas par to esamību.

Indikācijas

Šis produkts ir paredzēts kā citu klīnisko un histopatoloģisko testu papildinājums atzītās diagnostikas un klīniskās aprūpes metodēs, kad informācija par *EV11* (*MECOM*) translokācijas statusu ir svarīga klīniskajai pārvaldībai.

Testa principi

Fluorescences *in situ* hibridizācija (fluorescence *in situ* hybridisation, FISH) ir metode, kas ļauj noteikt DNS sekvences 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 norobežotu audzēju hromosomālajā analīzē. Mērķa DNS pēc fiksācijas un denaturēšanas ir pieejama hibridizācijai ar līdzīgi denaturētu, fluorescējošu marķētu DNS zondi, kurai ir papildu sekvence. Pēc hibridizācijas nesaisītā un nespecifiski saistītā DNS zonde tiek noņemta un DNS tiek iekrāsota ar kontrasta krāsvielu vizualizācijai. Pēc tam, izmantojot fluorescences mikroskopiju, hibridizēto zondi var vizualizēt mērķa materiālā.

Informācija par zondi

MECOM (*MDS1* un *EV11* kompleksā lokusa) onkogēns, kas atrodas 3q26.2, bieži ir pārkārtots mieloīdās izcelsmes ļaundabīgos hematoloģiskajos jaunveidojumos.

MECOM kodē cinka pirksta proteīnu, kas ir neatbilstoši ekspressēts leukēmijas šūnās 2–5 % pacientu ar AML un MDS¹. Šīs deregulētās ekspresijas izraisītājs bieži ir hromosomālais pārkārtojums, kurā iesaistīts 3q26.2, un divas visbiežāk sastopamās aberācijas ir (q21;q26.2)t(3;3) un inv(3)(q21q26.2)¹. Translokāciju un inversiju pārtraukumpunkti ir ļoti atšķirīgi.

Inversijas pārtraukumpunkti ir konstatējami centromēriski attiecībā pret *MECOM* gēnu, kā arī, to ietverot, un nosedz aptuveni 600kb. Vairākums pārtraukumpunktu 3q26.2 translokācijās atrodas telomēriski attiecībā pret *MECOM* gēnu un nosedz reģionu, kurā ietilpst *MDS1* gēna telomēriskais gals un MYNN gēns².

Hromosomu pārkārtojumi, kuros iesaistīts reģions 3q26.2, ir saistīti ar ļaundabīgiem mieloīdiem jaunveidojumiem, *MECOM* gēna aberantu ekspresiju, nelabvēlīgu prognozi un agresīvu klīnisko norisi².

AML ar inv(3)(q21q26.2) vai t(3;3)(q21;q26.2) ir atzīta nozoloģiskā vienība atbilstoši Pasaules Veselības Organizācijas (PVO) mieloīdo neoplazmu un akūtas leukēmijas klasifikācijai. Šī ir transformēta vai *de novo* AML ar ļoti agresīvu klīnisko norisi ir aberācijām, kurās iesaistīts 3q26.2 reģiona *MECOM* un 3q21 reģiona RPN1 (riboforīns 1)³.

Ir konstatēti arī *MECOM* pārkārtojumi ar terapiju saistītas slimības gadījumā t(3;21)(q26.2;q22) translokācijas dēļ, kas izraisa *MECOM*- RUNX1 fūziju^{3,4}.

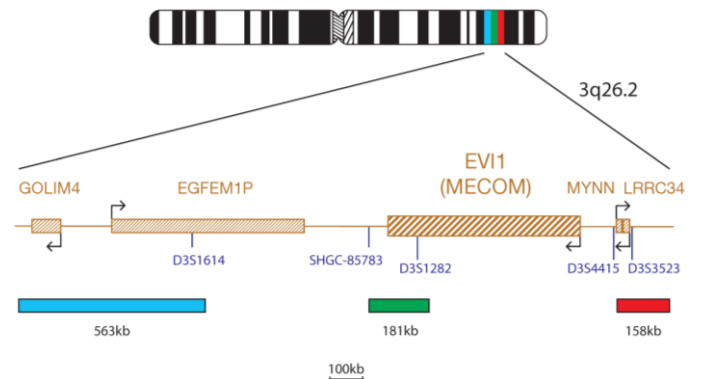
MECOM pārkārtojumi ir ļoti heterogēni, un to noteikšana var būt apgrūtināta, izmantojot standarta citoģenētiskās metodes, tādēļ FISH ir noderīgs instruments šo pārkārtojumu noteikšanā.

Zondes specifika

EV11, 3q26.2, sarkana

EV11, 3q26.2, zaļa

EV11, 3q26.2, zila



EV11 zonžu maisījuma sarkano komponentu veido 158kb zonde, kas atrodas telomēriski attiecībā pret D3S4415 marķieri un ietver LRRC34 gēnu. Zaļais komponents nosedz 181kb reģionu, kurā ietilpst EV11 (*MECOM*) gēna centromēriskā daļa un kura plešas aiz marķiera D3S1282. Zilais komponents nosedz 563kb reģionu, kas atrodas centromēriski attiecībā pret EV11 gēnu un kurā ietilpst marķieris D3S1614.

Nodrošinātie materiāli

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

Zondes tiek nodrošinātas iepriekš sajauktā veidā hibridizācijas šķīdumā (formamīds; dekstrāna sulfāts; citrāta fizioloģiskais šķīdums (salīne-sodium cetrāte, SSC)) un ir gatavas lietošanai.

Kontrasta krāsviela: 150 µl flakonā (15 testi)

Kontrasta krāsviela ir fluorescences uzturēšanas šķīdums ar DAPI (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindols)).

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

- Lietošanai *in vitro* diagnostikā. Tikai profesionālai lietošanai.
- Rīkojoties ar DNS zondēm un kontrasta krāsvielu ar DAPI, valkājiet cimdus.
- Zondes maisījumi ietver formamīdu, kas ir teratogēns, tādēļ nedrīkst pieļaut to izgarojumu ieelpošanu un saskari ar ādu. Lietojot ievērojiet piesardzību; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku.
- DAPI ir potenciāli kancerogēna viela. Lietojot ievērojiet piesardzību; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku.
- Atbrīvojieties no visām bīstamajām vielām atbilstoši jūsu iestādē spēkā esošajam vadlīnijām attiecībā uz bīstamu atkritumu utilizāciju.
- Lietotājiem jāspēj atšķirt sarkano, zilo un zaļo krāsu.
- Norādītā protokola un norādījumu par reaģentiem neievērošana var ietekmēt veiktspēju un var tikt iegūti kļūdaini pozitīvi vai kļūdaini negatīvi rezultāti.
- Zondi nedrīkst atšķaidīt vai veidot maisījumus ar citām zondēm.
- Ja protokola iepriekšējās denaturēšanas fāzes laikā netiek izmantoti 10µl zondes, var tikt ietekmēta veiktspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi vai kļūdaini negatīvi rezultāti.

Uzglabāšana un lietošana



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



Zonde saglabājas stabila normālas lietošanas gaitā notiekošajos sasaldēšanas/atkausēšanas ciklos (vienu ciklu veido zondes izņemšana no saldētavas un ievietošana atpakaļ saldētavā), un tā ir fotostabila līdz pat 48 stundas pēc nepārtraukta apgaismojuma iedarbības. Ir jādara viss iespējams, lai ierobežotu gaismas un temperatūras svārstību ietekmi.

Aprikojums 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. Fluorescences mikroskops (skatīt sadaļu "Uz fluorescences mikroskopu attiecināmie ieteikumi")
6. Fāžu kontrasta mikroskops
7. Tīri plastmasas, keramikas vai karstumizturīga stikla Koplina trauki
8. Pincete
9. Kalibrēta pH mērīerīce (vai pH indikatora strēmeles, ar kurām var veikt mērījumus pH 6,5–8,0 diapazonā)
10. Kontainers ar mitru vidi
11. Fluorescencei atbilstoša mikroskopa objektīva iegremdēšanas eļļa
12. Galda centrifūga
13. Mikroskopa priekšmetstikliņi
14. 24x24 mm segstikliņi
15. Taimeris
16. 37 °C inkubators
17. Gumijas līme
18. Virpuļmaisītājs
19. Mērcilindri
20. Magnētiskais maisītājs
21. Kalibrēts termometrs

Papildaprīkojums, kas nav ietverts komplektācijā

1. Citoģenētiskā žāvēšanas kamera

Nepieciešamie reagenti, kas nav ietverti komplektācijā

1. 20x citrātā 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 fluorescences mikroskopu attiecināmie ieteikumi

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

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

Pārliecinieties, vai mikroskops ir 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/sarkanā spektra filtru vai divjoslu zaļā spektra/sarkanā spektra filtru. Izmantojiet vienas joslas zilā spektra filtru zilā spektra optimālajai vizualizācijai vai trīs joslu sarkanā spektra/zaļā spektra/zilā spektra filtru zaļo, sarkano un zilo fluoroforu vienlaicīgai vizualizācijai.

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

Paraugu sagatavošana

Šo komplektu ir paredzēts izmantot ar hematoloģiski iegūtām šūnu suspensijām, kas fiksētas Karnuā šķīduma (3:1 metanols/etiķskābe) fiksatorā 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 paņemšanu, kultivēšanu, ievākšanu un priekšmetstikliņu sagatavošanu⁵.

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.

FISH protokols

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

Priekšmetstikliņa sagatavošana

1. Novietojiet šūnu paraugu uz mikroskopa priekšmetstikliņa, kas izgatavots no stikla. Ļaujiet nožūt. (**Pēc izvēles, ja tiek izmantota citoģenētiskā žāvēšanas kamera:** priekšmetstikliņu sagatavošanai jāizmanto citoģenētiskā žāvēšanas kamera. 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.

Iepriekšēja denaturēšana

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

Denaturēšana

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

Hibrizācija

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

Skalošana pēc hibrizācijas

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. Izņemiet šķīdumu no priekšmetstikliņa un iegremdējiet to 2xSSC, 0,05 % Tween-20 šķīdumā istabas temperatūrā (pH 7,0) uz 30 sekundēm nemaisot.
16. Noteciniet šķīdumu no priekšmetstikliņa un katram paraugam pievienojiet 10 µl fluorescences uzturēšanas līdzekli ar DAPI.
17. Uzlieciet segstikliņu, izvadiet burbuļus un ļaujiet krāsai tumšā attīstīties 10 minūtes.
18. Skatiet fluorescences mikroskopā (skatiet sadaļu "Uz fluorescences mikroskopu attiecināmie ieteikumi").

Sagatavoto priekšmetstikliņu stabilitāte

Sagatavotos priekšmetstikliņus var analizēt līdz 1 mēnesim, ja tie tiek glabāti tumšā istabas temperatūrā vai par istabas temperatūru zemākā temperatūrā.

Ieteikumi attiecībā uz procedūru

1. Priekšmetstikliņu karsēšana vai novecošanās var samazināt signāla fluorescenci.
2. Tādu reagentu izmantošana, kas nav uzņēmuma Cytocell Ltd. nodrošinātie vai ieteiktie reagenti, var nelabvēlīgi ietekmēt hibrizācijas apstākļus.
3. Šķīdumu, ūdens vannu un inkubatoru temperatūras mērīšanai jāizmanto kalibrēts termometrs, jo norādītās temperatūras ievērošana ir kritiski svarīga produkta optimālas veikspējas nodrošināšanai.
4. Skalošanas šķīdumu koncentrācijas, pH vērtības un temperatūras vērtības ir svarīgas, jo zemas plaiades gadījumā iespējama nespecifiska sasaiste, savukārt pārāk augstas plaiades gadījumā iespējama signāla nepietiekamība.
5. Nepilnīga denaturēšana var izraisīt signāla nepietiekamību, savukārt pārāk augsta 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

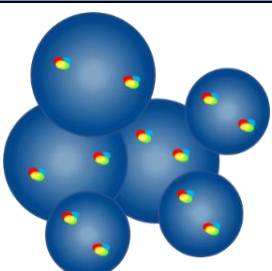
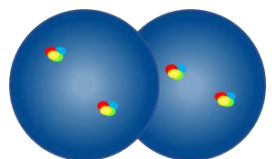
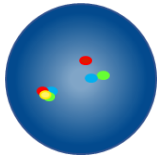
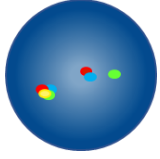
Sagatavotā priekšmetstikliņa ar paraugu kvalitātes novērtēšana

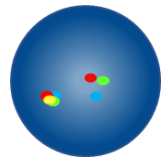
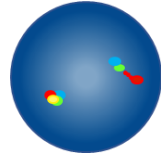
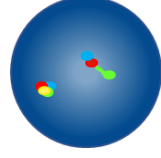
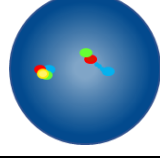
Paraugu nedrīkst analizēt tālāk norādītajos gadījumos.

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

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 jāsāk analīze no priekšmetstikliņa kreisās puses, savukārt otram laboratorijas speciālistam — no priekšmetstikliņa labās puses.
- Katram laboratorijas speciālistam jādokumentē savi rezultāti atsevišķās lapās.
- Ir jāanalizē tikai veseli kodoli, nevis pārklājošies kodoli, sablīvējušies kodoli vai kodoli, kurus sedz citoplazmatiskās atliekas vai augsta līmeņa automātiskā fluorescences.
- Jāizvairās no zonām ar pārmērīgu citoplazmatisko atlieku apjomu vai nespecifisku hibridizāciju.
- Signāla intensitāte var būt mainīga, pat vienā kodolā. Šādos gadījumos izmantojiet atsevišķus filtrus un/vai pielāgojiet fokālo plakni.
- Ja apstākļi nav pietiekami optimāli, signāli var šķīst izkliedēti. Ja divi vienādas krāsas signāli savstarpēji saskaras vai attālums starp tiem nepārsniedz divus signāla platumus, vai arī abus signālus savieno tikko redzams pavediens, šie signāli ir uzskatāmi par vienu signālu.
- Analizējot trīskrāsu sadalīšanas zondes, ja attālums starp sarkano, zaļo un zilo signālu nepārsniedz divus signāla platumus, signāls ir uzskatāms par nepārkārtotu/saplūdušu signālu.
- Ja pastāv šaubas, vai šūna ir analizējama, neveiciet tās analīzi.

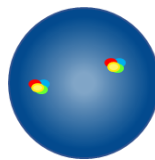
Uz analīzi attiecināmās vadlīnijas	
	Neskaitīt — kodoli atrodas pārāk tuvu viens otram, lai varētu noteikt to robežas
	Neskaitīt pārklājošos kodolus — nav redzamas visas abu kodolu zonas
	Skaitīt kā 2 fūzijas signālus — atstarpe starp sarkano un zaļo/zilo signālu ir mazāka nekā divi signāla platumi
	Skaitīt kā 2 fūzijas signālus — atstarpe starp zaļo un sarkano/zilo signālu ir mazāka nekā divi signāla platumi

	Skaitīt kā 2 fūzijas signālus — atstarpe starp zilo un sarkano/zaļo signālu ir mazāka nekā divi signāla platumi
	Skaitīt kā 2 fūzijas signālus — virs labās fūzijas sarkanais signāls ir difūzs
	Skaitīt kā 2 fūzijas signālus — virs labās fūzijas zaļais signāls ir difūzs
	Skaitīt kā 2 fūzijas signālus — virs labās fūzijas zilais signāls ir difūzs

Paredzamie rezultāti

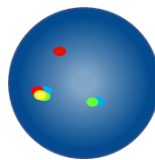
Izmantojot šo trīskrāsu stratēģiju, iespējams parādīt translokācijas vai inversijas esamību, kā var izšķirt atšķirīgos pārkārtojumu veidus.

Paredzamais normālu signālu modelis

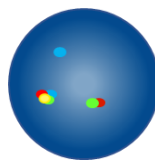


Normālā šūnā ir paredzami divi sarkani/zaļi/zili koplokālizēti signāli (2SZZi).

Paredzamie anormālo signālu modeļi



Šūnā ar t(3;nn)(q26.2;nn) translokāciju paredzamais signālu modelis ir viens sarkans, viens zaļš/zils fūzijas vai viens sarkans/zaļš/zils fūzijas signāls (1S, 1ZZi, 1SZZi).



Šūnā ar inv(3)(q21q26.2) inversiju paredzamais signālu modelis ir viens sarkans/zaļš fūzijas signāls, viens atsevišķs zils signāls un viens sarkans/zaļš/zils fūzijas signāls (1SZ, 1Zi, 1SZZi).

Citi signālu modeļi ir iespējami aneiploīdos/nelīdzsvarotos paraugos.

Zināmā krusteniskā reaktivitāte

Nav zināmas krusteniskās reaktivitātes.

Ziņošana par nevēlamiem notikumiem

Ja uzskatāt, ka ir radušies šīs ierīces darbības traucējumi vai tās veiktspējas rādītāji ir pasliktinājušies, iespējami izraisot nelabvēlīgu notikumu (piemēram, novēlotu vai nepareizu diagnozi, novēlotu vai nepiemērotu terapiju), par to nekavējoties jāziņo ražotājam (**e-pasta adrese**: vigilance@ogt.com).

Bar šādu notikumu arī var būt jāziņo kompetentajai iestādei attiecīgajā valstī. Kontaktpersonu medicīnas ierīču kontroles jautājumos saraksts ir atrodams šajā vietnē: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Specifiskās veiktspējas raksturlielumi

Analītiskais specifiskums

Analītiskais specifiskums tiek izteikts kā to signālu procentuālā vērtība, kas

hibridizējas ar pareizo lokusu un nekādu citu vietu. Analītiskais specifiskums tika noteikts, veicot 200 mērķa lokusu analīzi. Analītiskais specifiskums tika aprēķināts kā tādu FISH signālu skaits, kas hibridizējas uz pareizo lokusu, dalīts ar hibridizēto FISH signālu kopējo skaitu.

1. tabula. Zondes EVI1 Breakapart Probe analītiskais specifiskums

Zonde	Mērķa lokuss	Ar pareizo lokusu hibridizēto signālu skaits	Hibridizēto signālu kop skaits	Specifiskums (%)
Sarkans EVI1	3q26	200	200	100
Zaļš EVI1	3q26	200	200	100
Zilā EVI1	3q26	200	200	100

Analītiskais jutīgums

Analītiskais jutīgums tiek izteikts kā novērtējamo interfāzes šūnu ar paredzamu normālo signālu modeli procentuālā vērtība. Analītiskais jutīgums tika noteikts, analizējot interfāzes šūnas dažādos normālos paraugos. Jutīgums tika aprēķināts kā novērtējamo šūnu ar paredzamo signālu modeli procentuālā vērtība (ar 95 % ticamības intervālu).

2. tabula. Zondes EVI1 Breakapart Probe analītiskais jutīgums

Šūnu ar paredzamiem signālu modeļiem skaits	Šūnu ar novērtējamiem signāliem skaits	Jutīgums (%)	95 % ticamības intervāls
4957	5000	99,14	98,84–99,36

Normalitātes robežvērtību raksturojums

Uz fluorescētās in situ hibridizācijas (FISH) zondēm attiecināmā normalitātes robežvērtība ir novērtējamo 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.

3. tabula. Zondes EVI1 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 (%)
1S, 1ZZi, 1SZZi	25	200	3	4
1SZ, 1Zi, 1SZZi	25	200	3	4

Laboratorijām nepieciešams robežvērtības verificēt, izmantojot pašam savus datus^{6, 7}.

Reproducējamība

Reproducējamība tika noteikta trīs atsevišķās laboratorijās, kurās tika testēti seši kodēti paraugi (divi negatīvi attiecībā uz pārkārtojumu, divi zema līmeņa 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 vienā dienā, dažādās dienās un dažādās laboratorijās, izmantojot vienu zonu partiju, kā arī vienā no norises vietām tika testēta dažādu partiju reproducējamība, izmantojot trīs atšķirīgas zonu partijas.

Reproducējamība tika aprēķināta, izmantojot katra testa ietvaros pēlto mainīgo lielumu konverģenci.

4. tabula. Zondes EVI1 Breakapart Probe reproducējamība un precizitāte

Signāls	Reproducējamības pētījums	Paraugi	Konverģence (%)
Inversija (1SZ, 1Zi, 1SZZi)	Viena diena/dažādas dienas/dažādas laboratorijas	Negatīva	100
		Augsta līmeņa pozitīva	100
	Dažādas partijas	Negatīva	92
		Augsta līmeņa pozitīva	100
Translokācija (1S, 1ZZi, 1SZZi)	Viena diena/dažādas dienas/dažādas laboratorijas	Negatīva	100
		Augsta līmeņa pozitīva	100

Dažādas partijas	Negatīva	100
	Augsta līmeņa pozitīva	100

Klīniskā veiktspēja

Klīniskā veiktspēja tika noteikta, izmantojot reprezentatīvu neatlasītu pacientu kopu, kas tika nosūtīti attiecībā uz AML vai MDS, un norises vietā apkopojot 100 paraugus. Ar zondi noteikto pārkārtojumu incidentu daudzumi tika salīdzināti ar datiem, kas iegūti no literatūras avotiem.

Lai veiktu šo salīdzinājumu, literatūrā norādītais ticamības intervāls attiecībā uz populāciju 100 paraugu apmērā tika aprēķināts, aprēķinot 1 – paraugu proporciju testu ar kontinuitātes korekciju.

5. tabula. EVI1 Breakapart Probe klīniskā veiktspēja

Pārkārtojums	Izplatība			
	Literatūras apskats (%)	95 % LCI (%)	Klīniskais pētījums (%)	95 % UCL (%)
AML ar inv(3)/t(3;3)/MECOM pārkārtojumiem	1,3	0,1	4	6,7
MDS ar MECOM pārkārtojumiem	0,4	0		5,3

Papildinformācija

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

Tālr.: +44 (0)1223 294048

E-pasta adrese: techsupport@cytoCELL.com

Timekļa vietne: www.ogt.com

Atsauces

- Soderholm *et al.*, Leukemia 1997;11:352-358
- Bobadilla *et al.*, Br J Haematol 2007;136:806-813
- Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
- Pedersen-Bjerggaard *et al.*, Leukemia 2008;22:240-248
- Arsham, MS., Barch, M.J. and Lawce H.J. (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 skaidrojums

REF	Iv: Kataloga numurs
IVD	Iv: <i>In vitro</i> diagnostikas medicīniskā ierīce
LOT	Iv: Partijas kods
	Iv: Skatīt lietošanas instrukcijas
	Iv: Ražotājs
	Iv: Derīguma termiņš
	Iv: Temperatūras ierobežojums
	Iv: Sargāt no saules gaismas
	Iv: Saturs ir pietiekams <n> testiem
CONT	Iv: Saturs

Patenti un preču zīmes

CytoCell ir reģistrēta CytoCell Ltd. preču zīme.



CytoCell Ltd.

Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science
Park, Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, Apvienotā Karaliste
Tālr.: +44(0)1223 294048
Fakss: +44(0)1223 294986
E-pasta adrese: probes@cytoCell.com
Tīmekļa vietne: www.oqt.com