



A Sysmex Group Company



## Kasutusjuhend

REF: LPH 036-S / LPH 036

## Sond EVI1 (MECOM) Breakapart Probe



AINULT ERIALASEKS KASUTAMISEKS



www.cytocell.com

Lisateave ja teave muudes keeles on saadaval aadressil [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

### Piirangud

Seade on loodud tuvastama murdepunktidega ümberkorraldusi sondikomplekti punase, rohelise ja sinise klooniga seotud piirkonnas, mis sisaldab *EVI1 (MECOM)* piirkonda. Piirkonnast väljajäävaid murdepunkte või alternatiivseid ümberkorralduste variante, mis jäävad selle piirkonna sisse, ei pruugita selle tootega tuvastada.

See analüüs pole ette nähtud kasutamiseks iseseisva diagnostilise vahendina, prenataalseks analüüsiks, populatsioonipõhiseks skriininguks, patsiendilähedaseks analüüsiks või iseendal analüüsiks. See toode on ette nähtud ainult erialaseks laboratoorseks kasutamiseks; kõiki tulemusi peab tõlgendama vastava väljaõppega personal võttes arvesse muid asjakohaseid analüüsitulemusi.

Seda toodet ei ole valideeritud kasutamiseks muude proovituüpide ega haigustüüpide korral, kui ainult nende, mis on kasutusotstarbes täpsustatud.

FISH-i tulemuste tõlgendamine ja teavitamine peab vastama erialastele kutsestandarditele ja peaks arvesse võtma muud kliinilist ja diagnostilist teavet. See komplekt on ette nähtud muude laboratoorse analüüside täiendamiseks ja ravi ei tohi alustada, põhinedes ainult FISH-i tulemustel.

Protokoll järgimata jätmise võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.

Seda komplekti ei ole valideeritud kasutamiseks muul kui kasutusotstarbes esitatud eesmärgil.

### Kasutusotstarve

Sond CytoCell EVI1 (MECOM) Breakapart Probe on kvalitatiivne, mitteautomaatne, fluorestsents *in situ* hübriidsatsiooni (FISH) uuring, mida kasutatakse 3. kromosoomi 3q26.2 piirkonna kromosomaalse ümberkorralduste tuvastamiseks Carnoy lahuses (3:1 metanool/atseetaph) fikseeritud hematoloogiliselt tuletatud rakuspensioonides, mis pärinevad kinnitatud või kahtlustatud ägeda müeloidse leukeemia (AML) või müelodüsplastilise sündroomi (MDS) patsientidelt.

### Näidustused

See toode on loodud täiendusena teistele kliinilistele ja histopatoloogilistele uuringutele tunnustatud diagnostilistes ja kliinilistes raviteedes, kus teadmised *EVI1 (MECOM)* translokatsiooni oleku kohta on kliinilise ravi seisukohalt olulised.

### Analüüsi põhimõte

Fluorestsents *in situ* hübriidsatsioon (FISH) on meetod DNA järjestuste tuvastamiseks metafaasi kromosoomides või fikseeritud tsütogeneetiliste proovide interfaasi tuumades. Meetod kasutab DNA sonde, mis hübriidseeritakse kogu kromosoomi või üksiku unikaalse järjestusega ning toimib G-vöödi tsütogeneetiliste analüüside võimeka täiendusena. Seda meetodit saab nüüd rakendada prenataalse, hematoloogilise ja tahke kasvaja kromosomaalse analüüsi esmatähtsa uuringu tööriistana. Fikseeritud ja denatureeritud sihtmärk-DNA on saadaval sarnase denatureeritud, fluorestsentsmarkeriga DNA sondiga paardumiseks, millel on komplementaarne järjestus. Peale hübriidseerimise eemaldatakse seondumata ja ebaspetsiifiliselt seotud DNA sond ning DNA visualiseeritakse vastandvärvmisega. Seejärel võimaldab fluorestsentsmikroskoopia hübriidseeritud sondi visualiseerimist sihtmärkmaterjalil.

### Sondi teave

MECOM (*MDS1* ja *EVI1* komplekslookus) onkogeene asukohas 3q26.2 on sageli ümberkorraldatud müeloidset päritolu hematoloogiliste pahaloomuliste protsesside puhul.

MECOM kodeerib tsinksõrmede motiivi valku, mille ekspressioon leukeemilistes rakkudes on ebanormaalne 2–5% AML-i ja MDS-ga patsientidest<sup>1</sup>. Reguleerimata ekspressioon on sageli põhjustatud 3q26.2 hõlmavast kromosomaalsest ümberkorraldusest, kusjuures kaks kõige sagedasemat aberratsiooni on t(3;3)(q21;q26.2) ja inv(3)(q21q26.2)<sup>1</sup>. Translokatsioonide ja inversioonide murdepunktid võivad oluliselt varieeruda.

Inversiooni murdepunktid sisaldavad MECOM geeni ja on selle suhtes tsentromeersed ja hõlmavad ligikaudu 600 kb. Enamus 3q26.2 translokatsioonide murdepunktidest on MECOM geeni suhtes telomeersed ja hõlmavad piirkonda, mis sisaldab *MDS1* geeni telomeerset otsa ja *MYNN* geeni<sup>2</sup>.

3q26.2 piirkonda hõlmavad kromosomaalsed ümberkorraldused on seotud müeloidsete pahaloomuliste protsesside, MECOM geeni aberrantse ekspressiooni, ebasoodsa prognoosi ja agressiivse kliinilise kuluga<sup>2</sup>.

AML koos inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2) moodustab tunnustatud haigusüksuse vastavalt Maailma Terviseorganisatsiooni (WHO) müeloidsete kasvujate ja ägeda leukeemia klassifikatsioonile. Tegu on muundunud või de novo AML-ga, millel on väga agressiivne kliiniline kulgu ja aberratsioonid, mis hõlmavad MECOM-i asukohas 3q26.2 ja RPN1 (ribofoirin I) asukohas 3q21<sup>3</sup>.

MECOM-i ümberkorraldusi on leitud ka raviga seotud haigusega üle t(3;21)(q26.2;q22) translokatsiooni, mis põhjustab MECOM-RUNX1 fusiooni<sup>3,4</sup>.

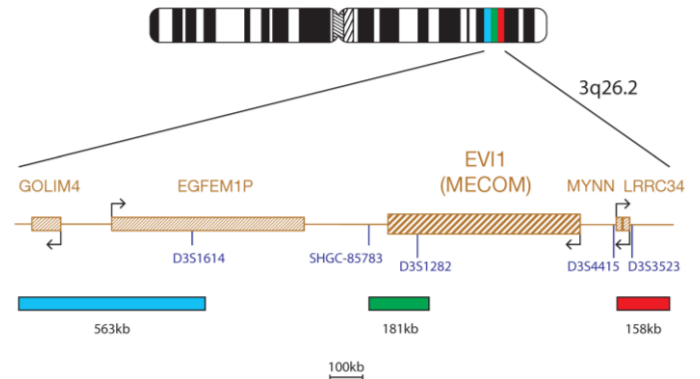
MECOM-i ümberkorraldused on väga heterogeensed ja võib olla raske tuvastada tavapäraste tsütogeneetiliste meetoditega, mistõttu on FISH nende tuvastamisel kasulik tööriist.

### Sondi spetsifikatsioon

EVI1, 3q26.2, punane

EVI1, 3q26.2, roheline

EVI1, 3q26.2, sinine



EVI1 sondisegu punane komponent sisaldab 158 kb sondi, mis on markeri D3S4415 suhtes telomeerne ja sisaldab LRRC34 geeni. Roheline komponent hõlmab 181 kb piirkonda, mis sisaldab *EVI1 (MECOM)* geeni tsentromeerset osa ja ulatub üle markeri D3S1282. Sinine komponent hõlmab 563 kb *EVI1* geeni suhtes tsentromeerset piirkonda, mis sisaldab markerit D3S1614.

### Tarnitavad materjalid

**Sond:** 50 µl viaali kohta (5 analüüsi) või 100 µl viaali kohta (10 analüüsi)

Sondid tarnitakse hübriidseerimislahusega eelsegatuna (formamiid; dekstraansulfaat; naatriumsitraadi soolalahus (saline-sodium citrate, SSC)) ja on valmis kasutamiseks.

**Vastandvärv:** 150 µl viaali kohta (15 analüüsi)

Vastandvärv on DAPI, tuhmunisvastane (sisaldus: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenüülindool)).

### Hoiatused ja ettevaatusabinõud

1. Kasutamiseks *in vitro* diagnostikas. Ainult erialaseks kasutamiseks.
2. DNA sondide ja DAPI vastandvärvi käsitsemisel kandke kindaid.
3. Sondi segud sisaldavad formamiidi, mis on teratogeenne; ärge hingake sisse auru ning vältige kontakti nahaga. Käsitsege ettevaatlikult; kasutage kindaid ja laborikittlit.
4. DAPI on potentsiaalne kartsinogeen. Käsitsege ettevaatlikult; kasutage kindaid ja laborikittlit.
5. Vabanegage kõigist ohtlikest jäätmest oma asutuse ohtlike jäätmete käitlemise eeskirjade kohaselt.
6. Kasutajad peavad olema suutelised eristama punast, sinist ja rohelist värvi.
7. Esitatud protokollid ja reaktiivid järgimata jätmise võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.
8. Sondi ei tohiks lahjendada ega segada teiste sondidega.
9. Sondi 10µl kasutamata jätmise protokollid denatureerimise etapis võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.

## Säilitamine ja käsitsemine



Komplekti tuleb säilitada külmutatuna temperatuurivahemikus  $-25...-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  kuni kehtivusaja lõpuni, mis on esitatud toote etiketil. Sondi ja vastandvärvi viaale tuleb säilitada pimedas.



Sond säilitab stabiilsuse normaalse kasutamise ajal esinevate sulatamise ja külmutamise tsüklite kestel (kus üks tsüklil kestab sondi eemaldamisest külmikust kuni sinna tagasipanekuni) ja on fotostabiilne kuni 48 tundi peale pideva valgusega kokkupuudet. Piirake iga hinna eest kokkupuudet valgusega ja temperatuurimuutustega.

## Seadmed ja materjalid, mis on vajalikud, kuid mida ei tarnita

Kasutada tuleb kalibreeritud seadmeid.

1. Kuumutusplaat (täisplaadi ja täpse temperatuuriregulaatoriga kuni  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ )
2. Kalibreeritud erineva mahuga mikropipetid ja otsikud vahemikus  $1\text{--}200\text{ }\mu\text{l}$
3. Vesivann, täpse temperatuuriregulaatoriga  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ja  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures
4. Mikrotsentrifuugi katsutid ( $0,5\text{ ml}$ )
5. Fluorestsentsmikroskoop (vt jaotist „Fluorestsentsmikroskoobi soovitused“)
6. Faasikontrastmikroskoop
7. Läbipaistvast plastist, keraamilised või kuumakindlast klaasist Coplini anumad
8. Pintsetid
9. Kalibreeritud pH-meeter (või pH indikaatorribad vahemikus pH  $6,5\text{--}8,0$ )
10. Niiskuskamber
11. Fluorestsentsmikroskoobi immersioonõli
12. Lauatsentrifuug
13. Mikroskoobi alusklaasid
14.  $24\times 24\text{ mm}$  katteklasaadid
15. Taimer
16.  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubaator
17. Katteklaasi liim
18. Vortex-segisti
19. Gradueeritud silindrid
20. Magnetsegisti
21. Kalibreeritud termomeeter

## Valikulised seadmed, mida ei tarnita

1. Tsütogeneetiline kuivatuskamber

## Vajalikud reaktiivid, mida ei tarnita

1. 20-kordne naatriumsitraadi soolalahus (SSC)
2. 100%-line etanool
3. Tween-20
4. 1M naatriumhüdroksiid (NaOH)
5. 1M vesinikloriid (HCl)
6. Destilleeritud vesi

## Fluorestsentsmikroskoobi soovitus

Kasutage optimaalseks visualiseerimiseks 100-vatist elavhõbelampi või sellega samavärset ning immersioonõliga apokromaatsset objektiivi 60/63-kordse või 100-kordse suurendusega. Selles sondi komplektis kasutatud fluorofoorid aktiveeruvad ja emiteerivad järgnevatel lainepikkustel:

Fluorofoor	Eksitatsioon <sub>max</sub> [nm]	Emissioon <sub>max</sub> [nm]
Rohekassinine	418	467
Roheline	495	521
Punane	596	615

Veenduge, et asjakohased eksitatsiooni- ja emissioonifiltrid, mis hõlmavad eespool esitatud lainepikkusi, on mikroskoopi paigaldatud. Kasutage kolme spektri läbilaskevõimega DAPI / rohelise spektri / punase spektri filtrit või kahe spektri läbilaskevõimega rohelise spektri / punase spektri filtrit rohelise ja punase fluorofoori samaaegselt optimaalseks visualiseerimiseks. Kasutage ühe rohekassinine spektri läbilaskevõimega filtrit rohekassinine spektri optimaalseks visualiseerimiseks või kolme spektri läbilaskevõimega punase spektri / rohelise spektri / rohekassinine spektri filtrit rohelise, punase ja rohekassinine fluorofoori samaaegselt visualiseerimiseks.

Kontrollige enne kasutamist fluorestsentsmikroskoopi, et veenduda selle korrasolekus. Kasutage immersioonõli, mis on fluorestsentsmikroskoopiaks sobiv ja on madala autofluorestsentsiga. Vältige pleekimisvastast DAPI segamist immersioonõliga, kuna see segab signaali. Järgige tootja soovitusi lambi tööea ja filtrite vanuse kohta.

## Proovi ettevalmistamine

Komplekt on loodud kasutamiseks hematoloogiliselt saadud rakususpensioonidega, mis on fikseeritud Carnoy lahuses (3:1 metanool/atseetahape) ja ette valmistatud vastavalt labori või asutuse eeskirjadele. Valmistage ette õhu käes kuivatatud mikroskoobi alusklaasid vastavalt tsütogeneetika standardprotseduuridele. AGT *Tsütogeneetika laborijuhend* sisaldab soovitusi proovi kogumise, kultuuri istutamise, kogumise ja slaidi tegemise kohta<sup>2</sup>.

## Lahuse ettevalmistamine

### Etanooli lahused

Lahjendage 100%-line etanool destilleeritud veega, jälgides suhtarvu ja põhjalikult segades.

- 70%-line etanool–7 osa 100%-list etanooli suhtes 3 osa destilleeritud vett
- 85%-line etanool – 8,5 osa 100%-list etanooli suhtes 1,5 osa destilleeritud vett

Säilitage lahuseid kuni 6 kuud toatemperatuuril õhukindlas nõus.

## 2-kordne SSC lahust

Lahjendage 1 osa 20-kordset SSC lahust 9 osa destilleeritud veega ja segage põhjalikult. Kontrollige pH-d ja kohandage, kuni pH on 7,0, kasutades NaOH või HCl vastavalt vajadusele. Säilitage lahust kuni 4 nädalat toatemperatuuril õhukindlas nõus.

## 0,4-kordne SSC lahust

Lahjendage 1 osa 20-kordset SSC lahust 49 osa destilleeritud veega ja segage põhjalikult. Kontrollige pH-d ja kohandage, kuni pH on 7,0, kasutades NaOH või HCl vastavalt vajadusele. Säilitage lahust kuni 4 nädalat toatemperatuuril õhukindlas nõus.

## 2-kordne SSC, 0,05% Tween-20 lahust

Lahjendage 1 osa 20-kordset SSC lahust 9 osa destilleeritud veega. Lisage 5  $\mu\text{l}$  Tween-20 10 ml kohta ja segage põhjalikult. Kontrollige pH-d ja kohandage, kuni pH on 7,0, kasutades NaOH või HCl vastavalt vajadusele. Säilitage lahust kuni 4 nädalat toatemperatuuril õhukindlas nõus.

## FISH-i protokoll

(Märkus. Veenduge, et sondi ja vastandvärvi kokkupuude labori valgustusega oleks kogu aeg piiratud).

## Slaidi ettevalmistamine

1. Tilgutage rakuproov mikroskoobi klaasist alusklaasile. Laske kuivada. (**Valikuline, kui kasutatakse tsütogeneetilist kuivatuskambrit:** slaidid tuleks valmistada tsütogeneetilist kuivatuskambrit kasutades. Rakuproovi optimaalseks valmistamiseks tuleks kambrit kasutada temperatuuril ligikaudu  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ja õhuniiskusel 50%. Kui tsütogeneetiline kuivatuskamber ei ole kättesaadav, kasutage alternatiivina tõmbekappi).
2. Kastke slaidid toatemperatuuril 2 minutiks 2-kordsesse SSC lahusesse ilma segamata.
3. Dehüdreerige etanoolilahuste seerias (70%, 85% ja 100%), igas 2 minutit toatemperatuuril.
4. Laske kuivada.

## Enne denaturatsiooni

5. Eemaldage sond külmikust ja laske sel soojeneda toatemperatuuril. Tsentrifuugige katsuteid lühidalt enne kasutamist.
6. Veenduge, et sondi lahust on ühtlaselt segunenud, kasutades pipetti.
7. Eemaldage 10  $\mu\text{l}$  sondi analüüsi kohta ja viige see mikrotsentrifuugi katsutisse üle. Tagastage ülejäänud sond kiiresti külmikusse.
8. Asetage sond ja proovislaid 5 minutiks kuumutusplaadile eelsoojenema temperatuuril  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
9. Tilgutage 10  $\mu\text{l}$  sondisegu rakuproovile ja asetage ettevaatlikult katteklaas. Lisage katteklaasi liim ja laske liimil täielikult kuivada.

## Denaturatsioon

10. Denatureerige proov ja sond üheaegselt, kuumutades slaidi kuumutusplaadil temperatuuril  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 2 minutit.

## Hübridisatsioon

11. Asetage slaid niiskesse valguskindlasse kambris temperatuuril  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), laske seista üleöö.

## Hübridisatsioonijärgsed pesud

12. Eemaldage DAPI külmikust ja laske soojeneda toatemperatuuril.
13. Eemaldage ettevaatlikult katteklaasid ja kõik liimijäljed.
14. Kastke slaidid 2 minutiks ilma segamata 0,4-kordsesse SSC lahusesse (pH 7,0) temperatuuril  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
15. Kuivatage slaid ja kastke see 30 sekundiks ilma segamata 2-kordsesse SSC lahusesse, 0,05% Tween-20 lahusesse, toatemperatuuril (pH 7,0).
16. Kuivatage slaid ja lisage igale proovile 10  $\mu\text{l}$  pleekimisvastast DAPI-d.
17. Katke katteklaasiga, eemaldage mullid ja laske värvil pimedas kujuneda 10 minutit.
18. Vaadake fluorestsentsmikroskoobiga (vt **Fluorestsentsmikroskoobi soovitus**).

## Valmis slaidide stabiilsus

Valmis slaidid on analüüsivad kuni 1 kuu, kui neid hoitakse pimedas toatemperatuuril või alla selle.

## Protseduuri soovitus

1. Slaidide keetmine või aegumine võib fluorestsentssignaali nõrgendada.
2. Cytocell Ltd toodetud või soovitatud reaktiivide asemel muude reaktiivide kasutamine võib ebasoodsalt mõjutada hübridiseerimistingimusi
3. Kasutamine võib ebasoodsalt mõjutada hübridiseerimistingimusi
4. Pesukontsentratsioonid, pH ja temperatuurid on olulised, kuna vähene rangus võib põhjustada sondi ebaspetsiifilist sidumist ja liiga suur rangus võib põhjustada signaali puudumist
5. Mittetäielik denatureerimine võib põhjustada signaali puudumist ja üleliigne denatureerimine võib samuti põhjustada ebaspetsiifilist seondumist
6. Üleliigne hübridiseerimine võib põhjustada täiendavaid või ootamatuid signaale
7. Kasutajad peaksid enne analüüsi kasutamist diagnostilisel eesmärgil protokollid oma proovidega optimeerima
8. Suboptimaalsed tingimused võivad põhjustada ebaspetsiifilist seondumist, mida võidakse ekslikult sondi signaalina tõlgendada

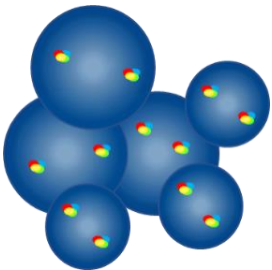
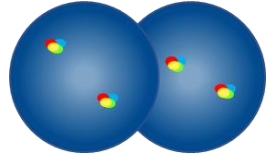
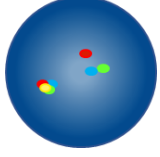
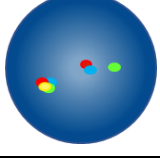
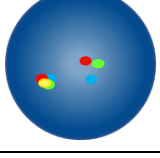
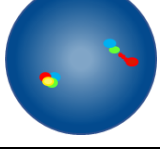
**Tulemuste tõlgendamine**  
**Slaidi kvaliteedi hindamine**

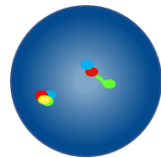
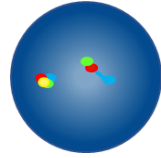
Slaidi ei tohiks analüüsida, kui:

- signaalid on ühe filtriga analüüsimiseks liiga nõrgad–analüüsi jätkamiseks peaksid signaalid olema eredad, selged ja lihtsalt hinnatavad;
- liiga palju kokkukleepunud/kattuvaid rakke segavad analüüsimist;
- üle 50% rakkudest pole hübriidiseeritud;
- rakkude vahel on üleliigsed fluorestsentsosakesed ja/või fluorestsentshägu, mis segab signaali–optimaalsetel slaididel peaks taust tunduma tume või must ja puhas;
- rakutuuma piire ei saa eristada ja need pole terviklikud.

**Analüüsi eeskirjad**

- Igat proovi peaks analüüsima ja tõlgendama kaks analüütikut. Kõik lahknemused tuleks lahendada kolmanda analüütiku hinnanguga.
- Analüütikud peaks olema riiklikult tunnustatud standardite kohase väljaõppega.
- Iga analüütik peaks hindama eraldi 100 tuuma iga proovi kohta. Esimene analüütik peaks alustama slaidi vasakult küljelt ja teine analüütik paremalt küljelt.
- Iga analüütik peaks oma tulemused üles märkima eraldi andmekandjale.
- Analüüsige vaid terviklikke tuumi, mitte kattuvaid või kokkukleepunud või tsütoplasma jääkidega kaetud ega tugevalt autofluorestsereivaid tuumi.
- Vältige alasid, kus esineb liigseid tsütoplasma jääke või ebaspetsiifilist hübriidiseerimist.
- Signaali tugevus võib vahelduda, isegi ühe tuuma piires. Sellistel juhtudel kasutage üksikfiltreid ja/või kohandage fokaaltasandit.
- Suboptimaalsete tingimuste korral võivad signaalid hajuda. Kui kaks sama värvi signaali puutuvad kokku või nendevaheline kaugus ei ole suurem kui kaks signaalipikkust või kui kaht signaali ühendab ähmane niit, lugege signaalid üheks.
- Kui kolmevärvilise lahutatavate sondide analüüsimisel ei ületa punase, roheline ja rohekassinise signaali vahel tühimik kaht signaalipikkust, lugege see ümberkorraldamata/sulandunud signaaliks.
- Kui kahtlete, kas proov on analüüsimiseks sobiv, siis ärge analüüsige seda.

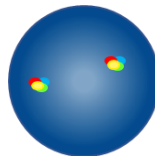
Analüüsi eeskirjad	
	Mitte lugeda, kui tuumad on piiride määramiseks üksteisele liiga lähedal
	Mitte lugeda kattuvaid tuumasid, sest mõlema tuumi kõik alasid ei ole näha
	Lugeda 2 fusioonisignaalina, kui punase ja roheline/sinise signaali vaheline tühimik on kahest signaalipikkusest väiksem
	Lugeda 2 fusioonisignaalina, kui roheline ja punase/sinise signaali vaheline tühimik on kahest signaalipikkusest väiksem
	Lugeda 2 fusioonisignaalina, kui sinise ja punase/roheline signaali vaheline tühimik on kahest signaalipikkusest väiksem
	Lugeda 2 fusioonisignaalina, kui ülemise parempoolse fusiooni punane signaal on difuusne

	Lugeda 2 fusioonisignaalina, kui ülemise parempoolse fusiooni roheline signaal on difuusne
	Lugeda 2 fusioonisignaalina, kui ülemise parempoolse fusiooni sinine signaal on difuusne

**Eeldatavad tulemused**

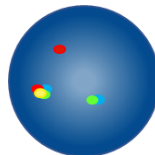
Kolme värviga strateegia näitab translokatsiooni või inversiooni esinemist ja võimaldab eristada ümberkorralduste igat erinevat tüüpi.

Eeldatav normaalne signaalimuster

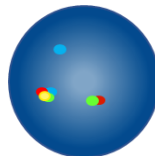


Normaalse raku eeldatav tulemus on kaks punast/rohelist/sinist kolokaliseeritud signaali (2PRS).

Eeldatavad ebanormaalsed signaalimustrid



Translokatsiooniga  $t(3;nn)(q26.2;nn)$  raku on eeldatav signaalimuster üks punane, üks roheline/sinine ja üks punane/roheline/sinine fusioonisignaali (1P, 1RS, 1PRS).



Inversiooniga  $inv(3)(q21q26.2)$  raku on eeldatav signaalimuster üks punane/roheline fusioonisignaali, üks eraldi sinine signaal ja üks punane/roheline/sinine fusioonisignaali (1PR, 1S, 1PRS).

Aneuploidsete/tasakaalustamata proovides võivad esineda teised signaalimustrid.

**Teadaolev ristreaktiivsus**

Teadaolev ristreaktiivsus puudub.

**Kõrvalnähtudest teatamine**

Kui usute, et see toode ei toimi või selle toimivus on halvenenud ning selle toimel võis esineda kõrvalnäht (nt hilinenud või valediagnoos, hilinenud või ebasobiv ravi), tuleb sellest tootjat kohe teavitada (**meiliaadress**: [vigilance@ogt.com](mailto:vigilance@ogt.com)).

Kui see on kohandatav, tuleks sündmusest teavitada riiklikule pädevale asutusele. Pädevate ametiasutuste loend on esitatud lehel: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

**Spetsiifilised toimivuskarakteristikud**

**Analüütiline spetsiifilisus**

Analüütiline spetsiifilisus on vaid õige lookusega hübriidiseeritud signaalide protsentarv. Analüütiline spetsiifilisus saavutati kokku 200 sihtmärk-lookuse analüüsimisel. Analüütiline spetsiifilisus arvutati, jagades õige lookusega hübriidiseeritud FISH-i signaalide arvu kogu hübriidiseeritud FISH-i signaali arvuga.

Tabel 1. Sondi EVI1 Breakapart Probe analüütiline spetsiifilisus

Sond	Sihthark-lookus	Õige lookusega hübriidiseeritud signaalide arv	Hübriidiseeritud signaalide koguarv	Spetsiifilisus (%)
Punane EVI1	3q26	200	200	100
Roheline EVI1	3q26	200	200	100
Sinine EVI1	3q26	200	200	100

**Analüütiline tundlikkus**

Analüütiline tundlikkus on hinnatavate interfaasi rakkude protsent eeldatava normaalse signaalimustri suhtes. Analüütiline tundlikkus saavutati interfaasi rakkude analüüsimisel erinevates normaalses proovides. Tundlikkus arutati hinnatavate rakkude ja eeldatava signaalimustri protsentsuhtena (95%-lise usaldusvahemikuga).

Tabel 2. Sondi EVI1 Breakapart Probe analüütiline tundlikkus

Eeldatava signaalimustriga rakkude arv	Hinnatava signaaliga rakkude arv	Tundlikkus (%)	95% usaldusvahemik
4957	5000	99,14	98,84–99,36

**Normaalse väljaarvamise piirväärtuste kirjeldus**

FISH-i sondidega seotud normaalse väljaarvamise piirväärtus on hinnatavate, teatud ebanormaalse signaalimustriga interfaasi rakkude suurim protsent, mille juures proov hinnatakse normaalseks.

Normaalne väljaarvamise piirväärtus määrati proovidega, mis olid negatiivsed ümberkorralduse suhtes, mida sond peaks tuvastama, ja beeta-pöörfunktsiooniga. Iga proovi kohta salvestati 100 interfaasi raku signaalimustrid kahe sõltumatu analüütiku poolt, kokku 200 proovi kohta.

Tabel 3. Sondi EVI1 Breakapart Probe normaalse väljaarvamise piirväärtuste kirjeldus

Ebanormaalne signaalimuster	Väljaarvamise piirväärtuse loomiseks analüüsitud proovide arv	Proovi kohta hinnatud tuumade arv	Max valepositiivsete signaalimustrite arv	Normaalne väljaarvamise piirväärtus (%)
1P, 1RS, 1PRS	25	200	3	4
1PR, 1S, 1PRS	25	200	3	4

Laborid peavad oma andmete põhjal läviväärtused kinnitama<sup>6,7</sup>.

**Reprodutseeritavus**

Reprodutseeritavus tehti kindlaks kolme eraldi labori poolt, kes testisid kuut pimedat proovi (kaks ümberkorralduse suhtes negatiivset, kaks nõrgalt positiivset proovi, mis ületasid piirväärtust 1–3 korda, ja kaks tugevalt positiivset proovi, mis sisaldasid üle 45% ümberkorralduse suhtes positiivseid rakke). Analüüs viidi läbi iga proovist kahe replikaadiga viiel järjestikusel päeval.

Kõik kolm asutust viisid läbi päevasisese, päevadevahelise ja asutusevahelise testimise, kasutades ühte ja sama sondi partiid, samas kui üks asutus teostas ka partiidevahelise reprodutseeritavuse testimise, kasutades kolme erinevat sondi partiid.

Reprodutseeritavus arutati, kasutades katse ajal uuritud muutujate vahelist ühilduvust.

Tabel 4. Sondi EVI1 Breakapart Probe reprodutseeritavus ja reprodutseeritavuse täpsus

Signaal	Reprodutseeritavuse uuring	Proov	Ühilduvus (%)
Inversioon (1PR, 1S, 1PRS)	Päevasisene/päevadevaheline/asutustevaheline	Negatiivne	100
		Tugevalt positiivne	100
	Partiidevaheline	Negatiivne	92
		Tugevalt positiivne	100
Translokatsioon (1P, 1RS, 1PRS)	Päevasisene/päevadevaheline/asutustevaheline	Negatiivne	100
		Tugevalt positiivne	100
	Partiidevaheline	Negatiivne	100
		Tugevalt positiivne	100

**Kliiniline toimivus**

Kliiniline toimivus määrati, kasutades AML-i või MDS-i tõttu suunatud esindusliku valimata patsientide komplekti kogutud 100 proovi. Sondiga tuvastatud ümberkorralduste esinemismäärasid võrreldi kirjandusallikate ülevaatest kogutud andmetega.

Selle võrdluse võimaldamiseks arutati kirjanduses esitatud usaldusvahemik 100

proovi populatsiooni suuruse kohta, arvutades 1–proovi proportsioonide testi koos jätkuva korrigeerimisega.

Tabel 5. Sondi EVI1 Breakapart Probe kliiniline toimivus

Ümberkorraldus	Levimus			
	Kirjanduse ülevaade (%)	95% LCI (%)	Kliiniline uuring (%)	95% UCL (%)
AML koos inv(3)/t(3;3)/MECOM ümberkorraldustega	1,3	0,1	4	6,7
MDS koos MECOM ümberkorraldustega	0,4	0		5,3

**Lisateave**

Lisateabe saamiseks võtke ühendust ettevõtte CytoCell tehnilise toe osakonnaga.

Tel: +44 (0)1223 294048











E-post: techsupport@cytoCELL.com

Veebisait: www.ogt.com

**Viited**

- 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-Bjergaard *et al.*, Leukemia 2008;22:240-248
- Arsham, MS., Barch, M.J. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. Genet Med. 2011;13(7):667-675.
- Wiktor AE, Dyke DLV, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16–23.

**Sümbolite seletus**

	et: Kataloogi number
	et: <i>In vitro</i> diagnostikameditsiiniseade
	et: Partii number
	et: Vt kasutusjuhendit
	et: Tootja
	et: Kõlblik kuni
	et: Temperatuuripiirang
	et: Hoidke päikesevalguse eest kaitstult
	et: Sisaldus piisav <n> analüüsi jaoks
	et: Sisu

**Patendid ja kaubamärgid**

CytoCell on ettevõtte Cytocell Ltd registreeritud kaubamärk.



**Cytocell Ltd.**

Oxford Gene Technology,  
418 Cambridge Science  
Park, Milton Road,  
Cambridge, CB4 0PZ, Ühendkuningriik  
Tel: +44(0)1223 294048  
Faks: +44(0)1223 294986  
E-post: [probes@cytoCELL.com](mailto:probes@cytoCELL.com)  
Veebisait: [www.ogt.com](http://www.ogt.com)