



A Sysmex Group Company



Kasutusjuhend

REF: CE-LPH 036-S / CE-LPH 036

Sond EVI1 (MECOM) Breakapart Probe



AINULT ERIALASEKS KASUTUSEKS



Lisateave ja muud keeled on saadaval aadressil ogt.com/IFU

Kasutusotstarve

Sond CytoCell® EVI1 (MECOM) Breakapart Probe on kvalitatiivne, mitteautomaatne, fluorestsents *in situ* hübriidsatsiooni (FISH) uuring, mida kasutatakse 3. kromosoomi 3q26.2 piirkonna kromosomaalsete ümberkorralduste tuvastamiseks Carnoy lahuses (3:1 metanool/atseethape) fikseeritud hematoloogiliselt tuletatud rakususpensioonides, mis pärinevad kinnitatud või kahtlustatud MECOM-i ümberkorraldusega ägeda müeloidse leukeemia (AML) või müelodüplastilise kasvaja (MDS) patsientidelt.

Näidustused

See seade on loodud täiendusena teistele kliinilistele ja histopatoloogilistele uuringutele tunnustatud diagnostilistes ja kliinilistes raviteedes, kus teadmised MECOM-i ümberkorralduse oleku kohta on kliinilise ravi seisukohalt olulised.

Piirangud

See seade on loodud selles sondide komplektis punaste, roheliste ja rohekassiniste kloonidega piiritletud piirkondade murdepunktidega ümberkorralduste tuvastamiseks, mis sisaldab MECOM-i piirkonda (roheline sond), MECOM-i geeni suhtes telomeerset piirkonda (punane sond) ja MECOM-i geeni suhtes tsentromeerset piirkonda (rohekassine sond). Nendest piirkondadest väljajäävaid murdepunkte või alternatiivseid ümberkorralduste variante, mis jäävad selle piirkonna sisse, ei pruugita selle seadmega tuvastada. See seade pole ette nähtud kasutamiseks iseseisva diagnostilise vahendina, diagnostilise abivahendina, prenataalseks analüüsimiseks, populatsioonipõhiseks skriininguks, patsiendilähedaseks analüüsimiseks või iseendal analüüsimiseks. See seade on sobimatu kasutamiseks muude proovitüüpide ega haigustüüpide korral ega muuks kasutusotstarbeks, peale selle, mis on kasutusotstarbes täpsustatud. Seade on ette nähtud muude laboratoorse teaduse analüüside täiendamiseks ja ravi ei tohiks alustada, põhinedes vaid FISH-i tulemustel. FISH-i tulemusi peab tõlgendama ja nendest teavitama vastava kvalifikatsiooniga personal vastavalt erialastele kutsestandarditele ja võttes arvesse muid asjakohaseid analüüsitulemusi ning muud kliinilist ja diagnostilist teavet. See seade on ette nähtud ainult erialaseks laboratoorseks kasutamiseks. Protokolli järgimata jätmine võib mõjutada analüüsi jõudlust ja põhjustada valepositiivseid/negatiivseid tulemusi.

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. Pärast fikseeritud ja denatureeritud sihtmärk-DNA on saadaval samase denatureeritud, fluorestsentsmarkeriga DNA sondiga paardumiseks, millel on komplementaarne järjestus. Peale hübriidsatsiooni eemaldatakse seondumata ja ebaspetsiifiliselt seotud DNA sond ning DNA visualiseeritakse vastandvärvimisega. 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, sealhulgas müelodüplastiliste neoplasmide (MDS) ja MECOM-i ümberkorraldusega ägeda müeloidse leukeemia (AML) puhul. Selle ekspressioon neoplasti müeloidi rakkudes häirib müeloidi diferentseerumist, rakutsükli regulatsiooni ja raku signaaliedastuse teid¹.

Reguleerimata ekspressioon on sageli põhjustatud 3q26.2 hõlmavast kromosomaalsest ümberkorraldusest, kusjuures kõige sagedasemad (~ 40%) aberratsioonid on t(3;3)(q21;q26.2) ja inv(3)(q21q26.2)¹. Kirjeldatakse rohkem kui 30 täiendavat 3q26.2 ümberkorraldust, enamikku neist kirjeldatakse molekulaartasemel¹.

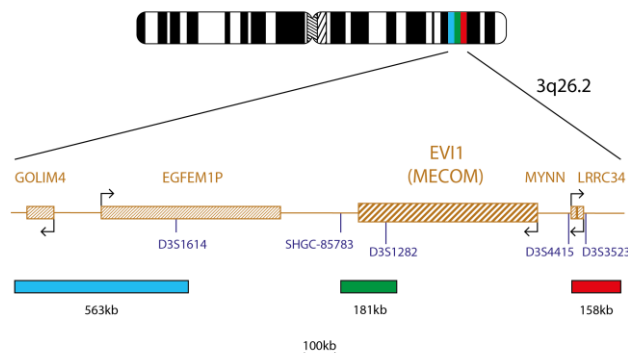
Translokatsioonide ja inversioonide murdepunktid võivad oluliselt varieeruda. MECOM-i ümberkorraldused on väga heterogeensed ja võib olla raske tuvastada tavapäraste tsütogeneetiliste meetoditega, mistõttu on FISH nende tuvastamisel kasulik tööriist. Variandi t(3;3)(q26.2;q26.2) murdepunkti piirkondi saab pikendada 3 tolli võrra MECOM-ist proksimaalselt kuni 5 tolli võrra MDS1-EVI1 promootorist distaalselt, mida katab roheline sond. Seetõttu erineb nende translokatsioonide laiendatud signaalmuster sõltuvalt murdepunkti asukohast². MECOM-i ümberpaigutuste testimine on soovitatav nii MDS-i kui ka AML-i korral³.

AML koos MECOM-i ümberkorraldustega on agressiivne haigus, mille elulemus on lühike, sõltumata blasti protsendist, ning mille tulemuses ei esine erinevusi inv(3)/t(3;3) juhtumites, võrreldes MECOM-i ümberkorraldusi muude partnerite omadega¹. MDS-i riski stratifikatsioon sisaldab muutujaid, nagu vanus, tsütopeniate raskusaste ja tsütogeneetilised leiud¹.

Sondi spetsifikatsioon

EV11, 3q26.2, punane
EV11, 3q26.2, roheline
EV11, 3q26.2, rohekassine

CMP-H021 v008.00



EV11 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 *EV11 (MECOM)* geeni tsentromeerset osa ja ulatub üle markeri D3S1282. Rohekassine komponent hõlmab 563 kb *EV11* 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 hübriidsatsioonilahusega eelsegatuna (< 65% formamiid; < 20 mg dekstraansulfaat; < 10% 20-kordne naatriumsitraadi soolalahus (saline-sodium citrate, SSC)) ja on valmis kasutamiseks.

Vastandvärv: 150 µl viaali kohta (15 analüüsi)

Vastandvärv on pleekimisvastane DAPI ES (sisaldus 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) glütseroolipõhises kinnituskeskonnas).

Hoiatused ja ettevaatusabinõud

1. Kasutamiseks *in vitro* diagnostikas. Ainult erialaseks laboratoorseks kasutamiseks.
2. Sondi segud sisaldavad formamiidi, mis on teratogeenne; ärge hingake sisse auru ning vältige kontakti nahaga. Käsitsege ettevaatlikult; kasutage kindaid ja laborikitiit.
3. Käsitsege DAPI-t ettevaatlikult; kasutage kindaid ja laborikitiit.
4. Ärge kasutage, kui viaal(id) on kahjustatud või kui viaali sisu on mistahes viisil rikutud.
5. Tootejäätmate ohutuks käitlemiseks järgige kohalikke jäätmekäitluseeskirju ja kemikaali ohutuskaidil toodud soovitusi. See kehtib ka kahjustatud analüüsikomplekti sisule.
6. Vabanegage kõigist kasutatud reaktiividest ja muudest saastunud ühekordseks kasutuseks ette nähtud vahenditest nakkusohu või potentsiaalselt nakkusohu tekitavate jäätmekäitlemise eeskirjade kohaselt. Iga labor peab ise vedelaid ja tahkeid jäätmekäitlema vastavalt nende loomusele ja ohtlikkuse tasemele ning tagama nende käitlemise ja kõrvaldamise (või laskma need käidelda ja kõrvaldada) vastavalt kehtivatele eeskirjadele.
7. Kasutajad peavad olema suutelised eristama punast, sinist ja rohelist värvi.
8. Esitatud protokolli ja reaktiivide järgimata jätmine võib mõjutada analüüsi jõudlust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.
9. Sondi ei tohiks lahjendada ega segada teiste sondidega.

10. Kui enne denaturatsiooni ei kasutata 10 µl sondi, nagu on protokollis ette nähtud, siis võib see mõjutada analüüsi jõudlust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.
11. Kõiki tooteid tuleb enne kasutamist valideerida.
12. Sisemised kontrollid tuleb läbi viia kontrollproovidega, mis sisaldavad mõjutamata rakupopulatsioone.

Temperatuuri määratlused

- -20 °C / külmutatud / külmikus: -25 °C...-15 °C
- 37 °C: +37 °C ± 1 °C
- 72 °C: +72 °C ± 1 °C
- 75 °C: +75 °C ± 1 °C
- Toatemperatuur: +15 °C...+25 °C

Säilitamine ja käsitsemine

 Komplekti tuleb säilitada külmutatuna temperatuurivahemikus -25...-15 °C kuni kehtivusaja lõpuni, mis on esitatud toote etiketil. Sondi ja vastandvärvi viaale tuleb säilitada pimedas.

 FISH-i sond, pleekimisvastane DAPI ES vastandvärv ja hübriidsatsioonilahus säilitavad stabiilsuse normaalse kasutamise ajal esinevate sulatamise ja külmutamise tsüklite kestel (kus üks tsüklil kestab sondi eemaldamisest külmikust kuni sinna tagasipanekuni) – 5 tsüklit 50 µl (5 analüüsi) FISH-i sondi viaali puhul, 10 tsüklit 100 µl (10 analüüsi) FISH-i sondi viaali puhul ja 15 tsüklit 150 µl (15 analüüsi) vastandvärvi viaali puhul. Kokkupuudet valgusega tuleb piirata ja võimaluse korral alati vältida. Hoidke komponente kaasas olevas valguskindlas mahutis. Siltidel märgitustest erinevatel tingimustel säilitatud ja kasutatud komponendid ei pruugi oodatud viisil toimida ja võivad ebasoodsalt mõjutada analüüsitulemusi. 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 °C)
 2. Kalibreeritud erineva mahuga mikropipetid ja otsikud vahemikus 1–200 µl
 3. Vesivann, täpse temperatuuriregulaatoriga 37 °C ja 72 °C juures
 4. Mikrotsentrifuugi katsutid (0,5 ml)
 5. Fluorestsentsmikroskoop (vt jaotist Fluorestsentsmikroskoobi soovitusel)
 6. Faasikontrastmikroskoop
 7. Läbipaistvast plastist, keraamilised või kuumakindlast klaasist Coplini anumad
 8. Pintsetid
 9. Kalibreeritud pH-meeter (või pH indikaatorribad vahemikus pH 6,5–8,0)
 10. Niiskuskamber
 11. Fluorestsentsmikroskoobi immersioonõli
 12. Lauatsentrifuug
 13. Mikroskoobi alusklaasid
 14. 24×24 mm katteklasisid
 15. Taimer
 16. 37 °C inkubaator
 17. Katteklasi 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% etanool
3. Tween-20
4. 1M naatriumhüdroksiid (NaOH)
5. 1M vesinikkloriid (HCl)
6. Destilleeritud vesi

Fluorestsentsmikroskoobi soovitusel

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

Fluorofoor	Eksitatsioon _{max} [nm]	Emissioon _{max} [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 ühe rohekassinise spektri läbilaskevõimega filtrit rohekassinise spektri optimaalseks visualiseerimiseks või kolme spektri läbilaskevõimega punase spektri/roheline spektri/sinise spektri filtrit roheline, punase ja rohekassinise fluorofoori samaaegselt visualiseerimiseks.

Kontrollige enne kasutamist fluorestsentsmikroskoopi, et veenduda selle korrasolekus. Kasutage immersioonõli, mis on fluorestsentsmikroskoopiaks sobiv ja on madala autofluorestsentsiga. Vältige pleekimisvastase DAPI segamist

immersioonõliga, kuna see segab signaali. Järgige tootja soovitusi lambi tööea ja filtrite vanuse kohta.

Proovi ettevalmistamine

Komplekt on loodud kasutamiseks Carnoy lahuses (3 : 1 metanool/atseethape) fikseeritud hematoloogiliselt tuletatud rakususpensioonides, mis pärinevad kinnitatud või kahtlustatud ägeda müeloidse leukeemia (AML) või müelodüsplastiliste neoplasmidega (MDS) patsientidelt, ja ette valmistatud vastavalt labori või asutuse eeskirjadele. Valmistage ette õhu käes kuivatatud proovid mikroskoobi alusklaasidel vastavalt tsütogeneetika standardprotseduuridele. AGT *Tsütogeneetika laborijuhend* sisaldab soovitusi proovi kogumise, kultuuri istutamise, kogumise ja alusklaasi tegemise kohta.⁴

Lahuse ettevalmistamine

Etanooli lahused

Lahjendage 100% etanool destilleeritud veega, jälgides suhtarvu ja põhjalikult segades:

- 70%-line etanool – 7 osa 100% etanooli suhtes 3 osa destilleeritud vett
 - 85%-line etanool – 8,5 osa 100% 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 µl 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).

Alusklaasi ettevalmistamine

1. Tilgutage rakuproov mikroskoobi klaasist alusklaasile. Laske kuivada. (Valikuline, kui kasutatakse tsütogeneetilist kuivatuskambrit: rakuproovi optimaalseks valmistamiseks tuleks kambrit kasutada temperatuuril ligikaudu 25 °C ja õhuniiskusel 50%. Kui tsütogeneetiline kuivatuskamber ei ole kättesaadav, kasutage alternatiivina tõmbekappi).
2. Kastke alusklaasid 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 sellel soojeneda toatemperatuurile. Tsentrifugeerige katsuteid lühidalt enne kasutamist.
6. Veenduge, et sondi lahust on ühtlaselt segunenud, kasutades pipetti.
7. Eemaldage 10 µl sondi analüüsi kohta ja viige see mikrotsentrifuugi katsutisse üle. Pange ülejäänud sond kiiresti külmikusse tagasi.
8. Asetage sond ja proovislaid 5 minutiks kuumutusplaadile eelsoojenema temperatuurile 37 °C (+/- 1 °C).
9. Tilgutage 10 µl sondisegu rakuproovile ja asetage ettevaatlikult katteklasi. Lisage katteklasi liim ja laske liimil täielikult kuivada.

Denaturatsioon

10. Denatureerige proov ja sond üheaegselt, kuumutades slaidi kuumutusplaadil temperatuuril 75 °C (+/- 1 °C) 2 minutit.

Hübriidsatsioon

11. Asetage slaid niiskesse valguskindlasse kambrisse temperatuurile 37 °C (+/- 1 °C), laske seista üleöö.

Hübriidsatsioonijärgsed pesud

12. Eemaldage DAPI külmikust ja laske soojeneda toatemperatuurile.
13. Eemaldage ettevaatlikult katteklasisid ja kõik liimijäljed.
14. Kastke slaidid 2 minutiks ilma segamata 0,4-kordsesse SSC lahusesse (pH 7,0) temperatuuril 72 °C (+/- 1 °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 µl pleekimisvastast DAPI-d.
17. Katke katteklasisiga, eemaldage mullid ja laske värvil pimedas kujuneda 10 minutit.
18. Vaadake fluorestsentsmikroskoobiga (vt **Fluorestsentsmikroskoobi soovitusel**).

Protseduuri soovitusel

1. Slaidide keetmine või aegumine võib fluorestsentssignaali nõrgendada.
2. Cytocell Ltd. poolt toodetud või soovitatud reaktiivide asemel muude reaktiivide kasutamine võib ebasoodsalt mõjutada hübriidsatsioonitingimusi.

- Kasutage lahuste, vesivannide ja inkubaatorite temperatuuri mõõtmisel kalibreeritud termomeetrit, sest need temperatuurid on toote optimaalseks jõudluseks kriitilise tähtsusega.
- Pesukontsentratsioonid, pH ja temperatuurid on olulised, kuna vähene rangus võib põhjustada sondi ebaspetsiifilist sidumist ja liiga suur rangus võib põhjustada signaali puudumist.
- Mittetäielik denatureerimine võib põhjustada signaali puudumist ja üleliigne denatureerimine võib samuti põhjustada ebaspetsiifilist seondumist.
- Üleliigne hübridisatsioon võib põhjustada täiendavaid või ootamatuid signaale.
- Kasutajad peaksid enne analüüsi kasutamist diagnostilisel eesmärgil protokollile oma proovidega optimeerima.
- Suboptimaalsed tingimused võivad põhjustada ebaspetsiifilist seondumist, mida võidakse ekslikult sondi signaalina tõlgendada.

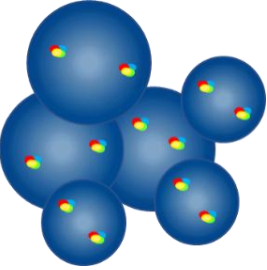
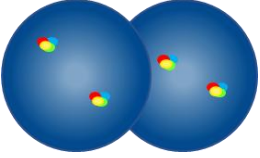
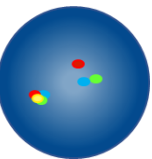
Tulemuste tõlgendamine
Slaidi kvaliteedi hindamine

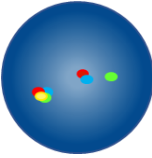
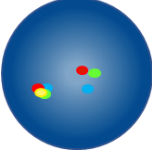
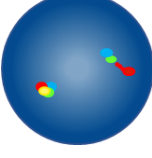
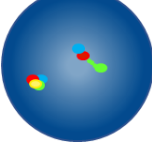
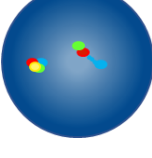
Slaidi ei tohiks analüüsida, kui:

- signaalid on ühe filtriga analüüsimiseks liiga nõrgad – analüüsi jätkamiseks peaksid signaalid olema eredad, selged ja lihtsalt hinnatavad;
- liiga palju kokkukleepunud/kattuvasid rakke segavad analüüsimist;
- üle 50% rakkudest pole hübridiseeritud;
- 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.

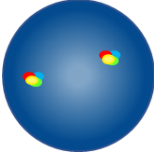
Analüüsi eeskirjad

- Igat proovi peaks analüüsima ja tõlgendama kaks analüütikut. Kõik lahknevused 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 tugevasti autofluorestseerivaid tuumi.
- Vältige alasid, kus esineb liigseid tsütoplasma jääke või ebaspetsiifilist hübridisatsiooni.
- 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 kolmevärviliste lahutatavate sondide analüüsimisel ei ole mistahes 3 signaali (punane, roheline, rohekassine) vahel tühimik suurem kui 2 signaalipikkust, lugege see ümber korraldamata / 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 tuuma kõiki alasid ei ole näha
	Lugeda 2 fusioonsignaalina, kui punase ja rohelise/rohekassinise signaali vaheline tühimik on kahest sondi pikkusest väiksem

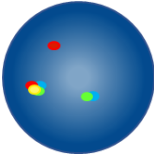
	Lugeda 2 fusioonsignaalina, kui rohelise ja punase/rohekassinise signaali vaheline tühimik on kahest sondi pikkusest väiksem
	Lugeda 2 fusioonsignaalina, rohekassine ja punase/rohelise signaali vaheline tühimik on kahest sondi pikkusest väiksem
	Lugeda 2 fusioonsignaalina, punane signaal on ülemises parempoolses fusioonis difuusne
	Lugeda 2 fusioonsignaalina, roheline signaal on ülemises parempoolses fusioonis difuusne
	Lugeda 2 fusioonsignaalina, rohekassine signaal on ülemises parempoolses fusioonis difuusne

Eeldatavad tulemused
Eeldatav normaalne signaalimuster

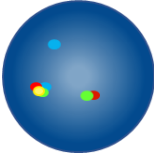


Normaalse raku eeldatav tulemus on kaks punast/rohelist/rohekassinist fusioonsignaali (2PRRo).

Eeldatavad ebanormaalsed signaalimustrid



Aberratsioone t(3;3)(q21;26.2) või t(3;v)(q26.2;v) rakus, mille murdepunkt on rohelise sondi suhtes distaalne, eeldatav signaalimuster on üks punane/roheline/rohekassine fusioonsignaali, üks roheline/rohekassine fusioon ja üks punane signaal (1PRRo1RRo1P).



Aberratsioone inv(3)(q21q26.2) või t(3;v)(q26.2;v) rakus, mille murdepunkt on rohelise sondi suhtes proksimaalsed, eeldatav signaalimuster on üks punane/roheline/rohekassine fusioonsignaali, üks punane/roheline fusioon ja üks rohekassine signaal (1PRRo1PR1Ro).

Aneuploidsete/tasakaalustamata proovides võivad esineda teised signaalimustrid.

Teadaolevad asjakohased segajad / segavad ained
Teadaolevaid asjakohaseid segajaid / segavaid aineid pole teada.

Teadaolev ristreaktiivsus puudub.

Teavitamine tõsisest juhtumist

Patsientidele / kasutajatele / kolmandatele osapooltele Euroopa Liidus ja identsete eeskirjadega riikides (määrus (EU) 2017/746 *In vitro* diagnostikameditsiiniseadmete kohta): kui seadme kasutamise käigus või seoses selle kasutamisega on leitud aset tõsine juhtum, tuleb sellest teavitada tootjat ja riiklikku pädevat ametiasutust.
Muudes riikides tuleb tõsistest juhtumitest teavitada tootjat ja, kui see on nõutav, riiklikku pädevat ametiasutust.
Tootja järelevalve kontaktandmed: vigilance@ogt.com
Järelevalvet teostavate EU riiklike pädevate ametiasutuste loend on esitatud lehel: https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

Spetsiifilised toimivuskarakteristikud

Analüütiline spetsiifilisus

Analüütiline spetsiifilisus on määratletud kui üksnes õige lookusega hübridiseeritud signaalide protsentarv. Analüüsi kaht kromosomaalset lookust viie proovi kõigis kahekümnes metafaasi rakus, saades 200 andmepunkti komponendi kohta. Iga hübridiseeritud sondi asukoht kaardistati ja õige lookusega hübridiseeritud metafaasi kromosoomi FISH-i signaalide arv salvestati.

Arvutati komplekti iga sondi analüütilise spetsiifilisuse number, jagades õige lookusega hübridiseeritud metafaasi kromosoomi FISH-i signaalide arvu hübridiseeritud metafaasi kromosoomi FISH-i signaalide koguarvuga, saadud tulemus korrutati 100-ga, väljendati protsendina ja anti 95% usaldusvahemik.

Tabel 1. Sondi EVI1 (MECOM) Breakapart Probe analüütiline spetsiifilisus

Sihtmärk	Hübridiseeritud metafaasi kromosoomide arv	Õigesti hübridiseeritud lookuste arv	Analüütiline spetsiifilisus	95% usaldusvahemik
3q26.2	200	200	100%	98,12–100%
3q26.2	200	200	100%	98,12–100%
3q26.2	200	200	100%	98,12–100%

Analüütiline tundlikkus

Analüütiline tundlikkus on hinnatavate interfaasi rakkude protsent eeldatava normaalse signaalmustri suhtes. Iga 25 fikseeritud luuüdirakusensiooni korral tunnistati *MECOM*-i ümberkorralduse suhtes negatiivseks, analüüsi vähemalt 200 interfaasi raku, saades tulemuseks vähemalt 5000 tuuma iga proovi tüübi kohta. Tundlikkuse andmeid analüüsi normaalse eeldatava signaalmustriga rakkude protsendi alusel ja väljendati protsendina 95% usaldusvahemikuga.

Tabel 2. Sondi EVI1 (MECOM) Breakapart Probe analüütiline tundlikkus

Proovi tüüp	Tundlikkuse kriteeriumid	Tundlikkuse tulemus
Luuüdi	> 95%	99,14% (98,89%...99,39%)

Normaalse väljaarvamise piirväärtuste kirjeldus

Normaalne väljaarvamine määratletakse nende rakkude protsendina, mis näitavad valepositiivset signaalmustrit, mille korral isik loetakse normaalseks ja kliinilisele diagnoosile mittevastavaks. Iga 25 luuüdi proovi korral, mis tunnistati *MECOM*-i ümberkorraldus kustutamise suhtes negatiivseks, analüüsi vähemalt 200 interfaasi raku, saades tulemuseks vähemalt 5000 tuuma iga proovi tüübi kohta.

Väljaarvamise piirväärtus määratleti MS Excelis funktsiooniga β -inversse (BETAINV). See arvutati valepositiivset signaalmustrit näitavate interfaasi rakkude protsendina, kasutades normaalse patsiendiproovi binominaalse jaotuse ühepoolse 95% usaldusvahemiku ülemist seotust.

Tabel 3. Sondi EVI1 (MECOM) Breakapart Probe normaalse väljaarvamise piirväärtuste kirjeldus

Proovi tüüp	Väljaarvamise tulemus
Luuüdi	4%

Laborid peavad oma andmete põhjal kinnitama väljaarvamise piirväärtused ^{5,6}.

Reprodutseeritavus

Tehti järgmised reprodutseeritavuse uuringud:

- 3 uuringukoha päevasisene reprodutseeritavus (proov-prooviga)
- 3 uuringukoha päevadevaheline reprodutseeritavus (päev-päevaga)
- 3 uuringukoha uuringukohtadevaheline reprodutseeritavus (uuringukoht-uuringukohaga)
- ühe uuringukoha partiidevaheline reprodutseeritavus (partii-partiiga)

Reprodutseeritavus tehti kindlaks 3 eraldi labori poolt, kes testisid 12 pimedat proovi, 6 signaalmustri kohta (2 ümberkorralduse suhtes negatiivset, 2 nõrgalt positiivset proovi, mis ületasid piirväärtust 1–3 korda, ja 2 tugevalt positiivset proovi, mis sisaldasid üle 45% ümberkorralduse suhtes positiivseid rakke). Analüüs viidi läbi iga proovist 2 replikaadiga 5 mittejärjestikusel päeval.

Kõik 3 asutust viisid läbi päevasisese, päevadevahelise ja uuringukohtadevahelise testimise, kasutades ühte ja sama sondi partiid, samas kui üks asutus teostas ka partiidevahelise reprodutseeritavuse testimise, kasutades 3 erinevat sondi partiid.

Tulemused esitati üldise ühilduvusena prognoositud negatiivse klassiga (negatiivsete proovide korral) ja prognoositud positiivse klassiga (positiivsete proovide korral).

Tabel 4a. Sondi EVI1 (MECOM) Breakapart Probe reprodutseeritavus ja täpsus – inversiooni signaalmuster

Muutuja	Proovi tüüp	Ühilduvus
Päevasisene (proov-prooviga), päevadevaheline (päev-päevaga) ja uuringukohtadevaheline reprodutseeritavus (uuringukoht-uuringukohaga)	Luuüdi, negatiivne	100%
	Luuüdi, nõrgalt positiivne	63%
	Luuüdi, tugevalt positiivne	100%
Partiidevaheline (partii-partiiga) reprodutseeritavus	Luuüdi, negatiivne	92%
	Luuüdi, nõrgalt positiivne	67%
	Luuüdi, tugevalt positiivne	100%

Tabel 4b. Sondi EVI1 (MECOM) Breakapart Probe reprodutseeritavus ja täpsus – translokatsiooni signaalmuster

Muutuja	Proovi tüüp	Ühilduvus
Päevasisene (proov-prooviga), päevadevaheline (päev-päevaga) ja uuringukohtadevaheline reprodutseeritavus (uuringukoht-uuringukohaga)	Luuüdi, negatiivne	100%
	Luuüdi, nõrgalt positiivne	98%
	Luuüdi, tugevalt positiivne	100%
Partiidevaheline (partii-partiiga) reprodutseeritavus	Luuüdi, negatiivne	100%
	Luuüdi, nõrgalt positiivne	100%
	Luuüdi, tugevalt positiivne	100%

Viidi läbi reprodutseeritavuse lisauuring inversiooni signaalmustri nõrgalt positiivsete tulemuste täiendamiseks, kasutades 2 erinevate nõrgalt positiivsete tasemetega proovi (2x ja 4x piirväärtus) ja 1 negatiivset proovi, et teha kindlaks:

- ühe uuringukoha päevasisene reprodutseeritavus (proov-prooviga);
- ühe uuringukoha päevasisene reprodutseeritavus (päev-päevaga);
- ühe uuringukoha kasutajasisene reprodutseeritavus (kasutaja-kasutajaga).

Reprodutseeritavuse kindlaks tegemiseks kasutati 1 sondi partiid, hinnati iga proovi 2 replikaati ning testiti 2 erineva kasutaja poolt 5 mittejärjestikusel päeval.

Tulemused esitati üldise ühilduvusena prognoositud positiivse klassiga (positiivsele proovide korral).

Tabel 4c. Sondi EVI1 (MECOM) Breakapart Probe reprodutseeritavuse ja täpsuse täiendavad toetavad andmed – inversiooni signaalmuster

Muutuja	Proovi tüüp	Ühilduvus
Päevasisene (proov-prooviga), päevadevaheline (päev-päevaga) ja kasutajatevaheline reprodutseeritavus (kasutaja-kasutajaga)	Luuüdi, nõrgalt positiivne (2x piirväärtus)	100%
	Luuüdi, nõrgalt positiivne (4x piirväärtus)	100%

Kliiniline toimivus

Tagamaks, et toode tuvastab ettenähtud ümberkorraldused, tehti toote kliiniline toimivus kindlaks toote sihtpopulatsiooni esindusproove hõlmava 3 uuringuga: Carnoy lahuses (3:1 metanool/atseethape) fikseeritud hematoloogiliselt tuletatud rakususpensioonides mis pärinevad kinnitatud või kahtlustatud ägeda müeloidse leukeemia (AML) või müelodüsplastilise neoplaskasvaja (MDS) patsientidelt. Uuringutes kombineeriti sajakaheksateistkümnest (118) proovist koosnevat valimi suurust, mille sihtpopulatsioon oli seitse (7) translokatsiooni positiivset ja sadaüksteist (111) translokatsiooni negatiivset ning kombineeritud sajaüheksateistkümnest (119), mille hulka kuulusid sadaüksteist (111) inversioon negatiivset ja kaheksa (8) inversiooni positiivset proovi. Tulemusi võrreldi proovi teadaoleva olekuga. Tulemuste ühilduvuse/ebakõla tulemused vastasid selle uuringu vastuvõetavuskriteeriumidele.

Testide tulemusi analüüsi ühemõõtelise meetodiga, et selgitada välja positiivsete signaalide kliinilise tundlikkuse, kliinilise spetsiifilisuse ja valepositiivsuse määra (FPR) väärtused.

Tabel 5. Sondi EVI1 (MECOM) Breakapart Probe kliiniline toimivus – translokatsioon

Muutuja	Tulemus
Kliiniline tundlikkus (true positive rate, TPR) (tõeselt positiivsete määr)	99,94%
Kliiniline spetsiifilisus (true negative rate, TNR) (tõeselt negatiivsete määr)	99,97%
Valepositiivsete määr (false positive rate, FPR) = 1–spetsiifilisus	0,03%

Tabel 6. Sondi EVI1 (MECOM) Breakapart Probe kliiniline toimivus – inversioon.

Muutuja	Tulemus
Kliiniline tundlikkus (true positive rate, TPR) (tõeselt positiivsete määr)	96,26%
Kliiniline spetsiifilisus (true negative rate, TNR) (tõeselt negatiivsete määr)	99,28%
Valepositiivsete määr (false positive rate, FPR) = 1–spetsiifilisus	0,72%

Ohutuse ja toimivuse kokkuvõte (SSP)

SSP tehakse avalikkusele ligipääsetavaks Euroopa meditsiiniseadmete andmebaasi (Eudamed) kaudu, kus see on seotud põhi-UDI-DI-ga. Eudamedi URL: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> Põhi-UDI-DI: 50558449LPH036JL

Kui Eudamed ei toimi täielikult, tehakse OTK avalikkusele ligipääsetavaks nõudmisel meili teel SSP@ogt.com.

Lisateave

Lisateavet saate, kui võtate ühendust ettevõtte CytoCell tehnilise toe osakonnaga. Tel: +44 (0)1223 294048 E-post: techsupport@cytozell.com Veebisait: www.ogt.com

Viited

1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Haematolymphoid tumours [Internet; beta version ahead of print]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2022 [cited 2023 December 21]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 11). Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
2. Ottema et al. Atypical 3q26/MECOM rearrangements genocopy inv(3)/t(3;3) in acute myeloid leukemia. Blood (2020)136(2):224–234.
3. Rack et al., Leukemia (2019) 33:1851–1867
4. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
5. 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.
6. Wiktor AE, Dyke DL 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 sõnastik

EN ISO 15223-1:2021 – „Meditsiiniseadmed – Sümbolid, mida kasutatakse koos tootja poolt esitatava teabega – 1. osa: Üldnõuded“ (© International Organization for Standardization)		
Sümbol	Pealkiri	Viitenumber (-numbrid)
	et: Tootja	5.1.1
	et: Volitatud esindaja Euroopa Ühenduses / Euroopa Liidus	5.1.2
	et: Kõlblik kuni	5.1.4
	et: Partii number	5.1.5
	et: Kataloogi number	5.1.6
	et: Hoidke päikesevalguse eest kaitstult	5.3.2
	et: Temperatuuripiirang	5.3.7
	et: Vt kasutusjuhised	5.4.3

 ogt.com/IFU	et: Lugege elektroonilist kasutusjuhendit	5.4.3
	et: Hoiatus!	5.4.4
	et: In vitro diagnostikameditsiiniseade	5.5.1
	et: Sisaldus piisav <n> analüüsi jaoks	5.5.5
	et: Seadme unikaalne identifikaator	5.7.10
IVD reaktiivide ja komponentide EDMA sümbolid, 2009. a oktoobri väljaanne		
Sümbol	Pealkiri	Viitenumber (-numbrid)
	et: Sisu (või sisaldab)	Ei kohaldata

Patendid ja kaubamärgid

CytoCell on ettevõtte Cytozell Limited registreeritud kaubamärk.



Cytozell Limited
Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
ÜHENDKUNINGRIIK

Tel: +44 (0)1223 294048
E-post: probes@cytozell.com
Veebisait: www.ogt.com



Sysmex Europe SE
Deelböge 19 D
22297 Hamburg
SAKSAMAA

Veebisait: www.sysmex-europe.com

Kasutusjuhendi versioonialalugu

V001 2023-01-11: Uus kasutusjuhend kooskõlas määrusega (EL) 2017/746
V002 2025-08-29: UKCA märgi eemaldamine
V003 2025-09-09: Uuendus ELi volitatud esindaja aadressile. ELi volitatud esindaja telefoninumbri eemaldamine. OGT fakside numbri eemaldamine