



A Sysmex Group Company



Návod k použití (IFU)

REF: CE-LPH 039-S / CE-LPH 039

CKS1B/CDKN2C (P18) Amplification/Deletion Probe



POUZE K PROFESIONÁLNÍMU POUŽITÍ



Další informace a více jazyků k dispozici na ogt.com/IFU

Zamýšlený účel

Sonda CytoCell® CKS1B/CDKN2C (P18) Amplification/Deletion Probe je kvalitativní, neautomatizovaný, fluorescenční *in situ* hybridizační test (FISH) používaný k detekci chromozomálních zisků a delecí v oblastech 1p32.3 a 1q21 na chromozomu 1 v hematologicky získaných buněčných suspenzích fixovaných v Carnoyově roztoku (3 : 1 metanol / kyselina octová) od pacientů s potvrzeným nebo předpokládaným mnohočetným myelomem (MM).

Indikace k použití

Tento prostředek byl vytvořen jako doplněk k dalším klinickým a histopatologickým testům v rámci uznávaných diagnostických postupů a postupů klinické péče v případech, kdy by znalost stavu *CKS1B* nebo *CDKN2C* (*P18*) byla důležitá pro klinickou léčbu.

Omezení

Tento prostředek je navržen tak, aby detekoval genomové zisky nebo ztráty větší než oblast pokrytá červenými a zelenými kopiemi v této sadě sond, což zahrnuje oblasti *CKS1B* a *CDKN2C* (*P18*). Genomové zisky nebo ztráty mimo tyto oblasti nebo částečné zisky nebo ztráty této oblasti nemusí být tímto prostředkem detekovány.

Tento prostředek není určen k použití v rámci samostatné diagnostiky, doprovodné diagnostiky, prenatálního testování, skrínungu populace, testování přímo u pacientů nebo provádění autotestování.

Tento prostředek nebyl validován pro typy vzorků, chorob nebo účely jiné, než ty, které jsou uvedeny v zamýšleném účelu.

Je koncipován jako doplněk dalších diagnostických laboratorních testů. Terapeutické postupy nesmí být zahajovány pouze na základě výsledků testů FISH.

Hlášení a interpretace výsledků FISH musejí být prováděny kvalifikovanými pracovníky v souladu s profesionálními standardy praxe a měly by zohledňovat další relevantní výsledky testů, a také klinické a diagnostické informace.

Tento prostředek je určen pouze k laboratornímu profesionálnímu použití. Nedodržení protokolu může ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům.

Principy testu

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika umožňující detekovat sekvenční DNA na metafázových chromozomech nebo v interfázních jádrech z fixovaných cytogenetických vzorků. Tato technika využívá sondy DNA, které hybridizují na celé chromozomy nebo na jednotlivé jedinečné sekvenční DNA. Slouží jako důležitý doplněk cytogenetické analýzy pomocí G-pruhování. Tuto techniku je nyní možno aplikovat jako základní vyšetřovací nástroj při prenatálním a hematologickém vyšetření a při chromozomální analýze solidního tumoru. Po fixování a denaturaci je cílová DNA k dispozici pro reasociaci na podobně denaturovanou, fluorescenčně označenou sondu DNA, která má komplementární sekvenci. Po hybridizaci se nevázaná a nespecificky vázaná DNA sonda odstraní a DNA se barevně označí pro účely vizualizace. Fluorescenční mikroskopie potom umožňuje vizualizaci hybridizované sondy na cílovém materiálu.

Informace o sondě

Gen *CKS1B* (*CDC28* regulační podjednotka proteinové kinázy 1B) se nachází na 1q21 a gen *CDKN2C* (inhibitor cyklin dependentních kináz 2C) se nachází na 1p32.3.

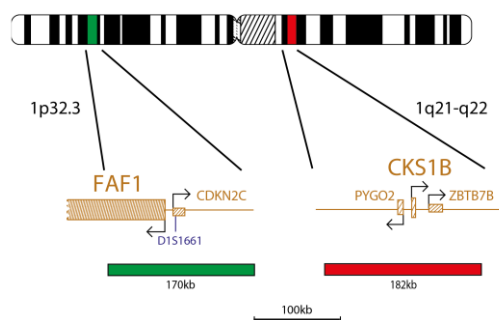
Zisk oblasti 1q21 včetně *CKS1B* je jednou z nejběžnějších se vyskytujících chromozomálních aberací přítomných u mnohočetného myelomu¹. Nadměrná exprese genu *CKS1B* up-reguluje progresi buněčného cyklu, což vede ke zvýšení proliferace choroby². To souvisí s pokročilým fenotypem mnohočetného myelomu a může být proto spojováno se špatnou prognózou a progresí choroby^{1,2,3}. Zisk 1q21 je spojován s horším přežitím a při relapsu onemocnění vznikají další amplifikace. Kompletní zisky dlouhého raménka chromozomu 1 jsou také běžné u mnohočetného myelomu a mohou se objevovat jako izochromozomy, duplikace nebo jumping translokace a jsou často spojovány s progresí onemocnění⁴.

CDKN2C je tumor supresorový gen odpovědný za vyvolání smrti apoptotických buněk a za fragmentaci DNA⁵. U mnohočetného myelomu je up-regulována exprese cytokinu IL-6 a homozygotní delece genu je spojována se zvýšenou proliferací onemocnění⁶. Ačkoli bylo zjištěno, že k delecí *CDKN2C* u malignit u lidí dochází zřídka, cytogenetické analýzy ukázaly, že k abnormalitám 1p32-36 dochází asi u 16 % případů mnohočetného myelomu u lidí a jsou spojovány s horším celkovým přežitím^{2,3,5,6}.

Konvenční cytogenetikou jsou cytogenetické abnormality detekovány přibližně u jedné třetiny případů mnohočetného myelomu, ale metoda FISH zvyšuje procento detekovaných chromozomálních abnormalit na >90 %⁷.

Parametry sondy

CKS1B, 1q21-q22, červená
CDKN2C (*P18*), 1p32.3, zelená



Produkt CKS1B/CDKN2C se skládá ze sondy o délce 182 kb, označené červeně, pokrývající celý gen *CKS1B* a přilehlé oblasti, včetně genů *PYGO2* a *ZBTB7B*, a zelené sondy pokrývající oblast o délce 170 kb, včetně celého genu *CDKN2C*, markeru D1S1661 a centromerického konce genu *FAF1*.

Dodaný materiál

Sonda: 50 µl v jedné lahvičce (5 testů) nebo 100 µl v jedné lahvičce (10 testů)
Sondy jsou dodávány předem smíchané v hybridizačním roztoku (<65 % formamidu; <20 mg dextran sulfátu; <10 % 20× solného roztoku citrátu sodného (SSC)) a jsou připraveny k použití.

Kontrastní barvivo: 150 µl v jedné lahvičce (15 testů)

Kontrastním barvivem je DAPI Antifade ES (0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol) v montážním médiu na bázi glycerolu).

Varování a bezpečnostní pokyny

- Pro diagnostické použití *in vitro*. Výhradně k laboratornímu profesionálnímu použití.
- Směsi v sondách obsahují formamid, což je teratogen; nevdechujte výpary a zamezte kontaktu s pokožkou. Zacházejte s ním opatrně; noste rukavice a laboratorní plášť.
- Zacházejte s DAPI opatrně; noste rukavice a laboratorní plášť.
- Nepoužívejte, pokud jsou lahvičky poškozeny nebo je obsah lahvičky jakkoli znehodnocen.
- Při výběru bezpečné likvidace tohoto produktu se řiďte místními předpisy pro likvidaci ve vaší lokalitě spolu s doporučeními uvedenými v bezpečnostním listu. To platí i pro poškozený obsah testovací sady.
- Všechny použité reagentie a další kontaminované materiály na jedno použití zlikvidujte podle postupů pro infekční nebo potenciálně infekční odpad. Každá laboratoř je odpovědná za nakládání s pevným a kapalným odpadem podle jeho povahy a stupně nebezpečnosti a za jeho zpracování a likvidaci (nebo za zajištění jeho zpracování a likvidace) v souladu s platnými předpisy.
- Pracovníci musí být schopni rozlišit červenou, modrou a zelenou barvu.
- Nedodržení předepsaného protokolu a reagentií může ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům.
- Sonda se nesmí fedit ani míchat s jinými sondami.
- Není-li během kroku predenaturace v rámci protokolu použito 10 µl sondy, může to ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům.
- Všechny produkty by měly být před použitím validovány.
- Interní kontroly by měly být prováděny pomocí nedotčených buněčných populací v testovacích vzorcích.

Definice teploty

- -20 °C / zmražené / v mrazničce: -25 °C až -15 °C
- 37 °C: +37 °C ± 1 °C
- 72 °C: +72 °C ± 1 °C
- 75 °C: +75 °C ± 1 °C
- Pokojová teplota (RT): +15 °C až +25 °C

Uchovávání a manipulace

 Sadu je třeba uchovávat v mrazničce při teplotách -25 °C až -15 °C až do data expirace, uvedeného na štítku sady. Sonda a lahvičky s kontrastními barvivy musí být uloženy v temnu.

 Sonda FISH, kontrastní barvivo DAPI Antifade ES a hybridizační roztok zůstávají při běžném používání stabilní po celou dobu cyklů zmrazování a rozmrazování (přičemž jeden cyklus představuje vyjmutí lahvičky z mrazničky a její vložení zpět) – 5 cyklů pro 50 µl (5 testů) lahvičku sondy FISH, 10 cyklů pro 100 µl (10 testů) lahvičku sondy FISH a 15 cyklů pro 150 µl (15 testů) lahvičku kontrastního barviva. Je třeba minimalizovat vystavení světlu a pokud možno se mu zcela vyhnout. Složky skladujte v dodané nádobě odolné vůči působení světla. Složky použité a skladované za jiných podmínek, než jaké jsou uvedeny na etiketě, nemusí fungovat podle očekávání a mohou nepříznivě ovlivnit výsledky testu. Je třeba vynaložit veškeré úsilí na omezení expozice světlu a teplotním změnám.

Potřebné vybavení a materiál, které nejsou součástí dodávky

Je nutné používat kalibrovaná zařízení:

1. Varná deska (s pevnou plotnou a přesným ovládáním teploty do 80 °C)
2. Kalibrované mikropipety s různým objemem a špičkami v rozsahu od 1 µl do 200 µl
3. Vodní lázeň s přesným ovládáním teploty od 37 °C do 72 °C
4. Mikrocentrifugační zkumavky (0,5 ml)
5. Fluorescenční mikroskop (viz oddíl Doporučení ohledně fluorescenčního mikroskopu)
6. Mikroskop s fázovým kontrastem
7. Čisté plastové, keramické nebo skleněné (z ohnivzdorného skla) lahvičky typu „coplin“
8. Chirurgické kleště
9. Kalibrovaný pH metr (nebo pH indikační proužky schopné měřit pH v rozmezí 6,5–8,0)
10. Vlhčená nádoba
11. Imerzní olej na objektiv fluorescenčního mikroskopu
12. Stolní odstředivka
13. Mikroskopová sklička
14. Krycí sklička 24 × 24 mm
15. Stopky
16. Inkubátor 37 °C
17. Lepidlo na bázi kaučukového roztoku
18. Vířivý mixér
19. Odměrné válce
20. Magnetická míchačka
21. Kalibrovaný teploměr

Volitelné vybavení, které není součástí dodávky

1. Cytogenetická sušicí komora

Potřebné reagenty, které nejsou součástí dodávky

1. 20× fyziologický roztok citrátu sodného (SSC)
2. 100 % etanol
3. Tween-20
4. 1M hydroxid sodný (NaOH)
5. 1M kyselina chlorovodíková (HCl)
6. Demineralizovaná voda

Doporučení ohledně fluorescenčního mikroskopu

Pro optimální vizualizaci použijte 100wattovou rtuťovou lampu nebo její ekvivalent a apochromatické objektivy 60/63× nebo 100× s imerzním olejem. Fluorofory použité v této sadě sondy budou excitovat a emitovat při následujících vlnových délkách:

Fluorofor	Excitace _{max} [nm]	Emise _{max} [nm]
Zelená	495	521
Červená	596	615

Zajistěte, aby byl mikroskop vybaven příslušnými excitačními a emisními filtry, které pokrývají výše uvedené vlnové délky. Pro optimální simultánní vizualizaci zelených a červených fluoroforů použijte třípásmový DAPI/zelený/červený filtr nebo dvoupásmový zelený/červený filtr.

Před použitím zkontrolujte správnou funkci fluorescenčního mikroskopu. Použijte imerzní olej vhodný pro fluorescenční mikroskopy připravený pro nízkou autofluorescenci. Dbejte na to, aby nedošlo ke smíchání barviva DAPI antifade s imerzním olejem do mikroskopu, protože by tak došlo k zastínění signálů. Dodržujte doporučení výrobce týkající se životnosti lampy a stáří filtrů.

Příprava vzorků

Sada je určena pro použití u hematologicky získaných buněčných suspenzí fixovaných v Carnoyově roztoku (3 : 1 metanol / kyselina octová), které jsou připraveny v souladu s pokyny laboratoře nebo zdravotnického zařízení. Na mikroskopová sklička naneste vzorky usušené na vzduchu v souladu se standardními cytogenetickými postupy. *Cytogenetics Laboratory Manual* AGT

(Příručka pro cytogenetické laboratoře) obsahuje doporučení pro odběr, kultivaci a získávání vzorků a pro přípravu sklíček⁸.

Příprava roztoků

Etanolvé roztoky

Rozřeďte 100 % etanol demineralizovanou vodou v následujících poměrech a řádně promíchejte:

- 70 % etanol – 7 dílů 100 % etanolu na 3 díly demineralizované vody
- 85 % etanol – 8,5 dílů 100 % etanolu na 1,5 díly demineralizované vody

Roztoky skladujte až 6 měsíců při pokojové teplotě ve vzduchotěsné nádobě.

Roztok 2×SSC

Zřeďte 1 díl roztoku 20×SSC 9 díly demineralizované vody a řádně promíchejte. Zkontrolujte pH a pomocí NaOH nebo HCl podle potřeby upravte na pH 7,0. Roztok skladujte ve vzduchotěsné nádobě při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů.

Roztok 0,4×SSC

Zřeďte 1 díl roztoku 20×SSC 49 díly demineralizované vody a řádně promíchejte. Zkontrolujte pH a pomocí NaOH nebo HCl podle potřeby upravte na pH 7,0. Roztok skladujte ve vzduchotěsné nádobě při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů.

Roztok 2×SSC, 0,05 % roztok Tween-20

Zřeďte 1 díl roztoku 20×SSC 9 díly demineralizované vody. Na 10 ml přidejte 5 µl roztoku Tween-20 a řádně promíchejte. Zkontrolujte pH a pomocí NaOH nebo HCl podle potřeby upravte na pH 7,0. Roztok skladujte ve vzduchotěsné nádobě při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů.

Protokol FISH

(Poznámka: Dbejte na to, aby vždy byla omezena expozice sondy a kontrastních barviv vůči osvětlení v laboratoři).

Příprava sklička

1. Naneste buněčný vzorek na mikroskopové skličko. Nechte ho uschnout. **(Volitelně při použití cytogenetické sušicí komory:** K optimálnímu nanesení buněčných vzorků by měla komora pracovat při teplotě přibližně 25 °C a 50 % vlhkosti. Pokud cytogenetickou sušicí komoru nemáte, použijte jako alternativu digestoř.)
2. Skličko ponořte na 2 minuty do roztoku 2×SSC při pokojové teplotě. Neprotřepávejte.
3. Dehydratujte pomocí etanolvé série (70 %, 85 % a 100 %), vždy po dobu 2 minut při pokojové teplotě.
4. Nechte ho uschnout.

Predenaturace

5. Vyjměte sondu z mrazničky a nechte ji zahřát na pokojovou teplotu. Laboratorní lahvičky před použitím krátce odstředte.
6. Dbejte, aby byl roztok sondy rovnoměrně promíchán pipetou.
7. Na každý test odeberte 10 µl sondy a přeneste ji do mikrocentrifugační zkumavky. Zbytek sondy vraťte rychle do mrazničky.
8. Sondu a skličko se vzorkem umístěte na varnou desku a předeheřte po dobu 5 minut při teplotě 37 °C (+/- 1 °C).
9. Kápněte 10 µl směsi sondy na buněčný vzorek a opatrně jej překryjte krycím sklíčkem. Neprodyšně uzavřete pomocí lepidla na bázi kaučukového roztoku a nechte lepidlo úplně uschnout.

Denaturace

10. Zahříváním sklička na varné desce po dobu 2 minut při teplotě 75 °C (+/- 1 °C) vzorek a sondu souběžně denaturujte.

Hybridizace

11. Skličko uložte na noc do vlhké neprůsvitné nádoby při teplotě 37 °C (+/- 1 °C).

Post-hybridizační vymývání

12. Vyjměte DAPI z mrazničky a nechte ho zahřát na pokojovou teplotu.
13. Opatrně sejmete krycí skličko a odstraňte všechny zbytky lepidla.
14. Skličko ponořte na 2 minuty do roztoku 0,4×SSC (pH 7,0) při teplotě 72 °C (+/- 1 °C). Neprotřepávejte.
15. Skličko osušte a na 30 sekund ponořte do roztoku 2×SSC, 0,05 % Tween-20 při pokojové teplotě (pH 7,0). Neprotřepávejte.
16. Skličko osušte a na každý vzorek naneste 10 µl DAPI antifade.
17. Přikryjte krycím sklíčkem, odstraňte veškeré bubliny, uložte do temna a po dobu 10 minut nechte vyvíjet barvu.
18. Zkontrolujte pomocí fluorescenčního mikroskopu (viz **Doporučení ohledně fluorescenčního mikroskopu**).

Doporučení pro zpracování

1. Vypalování nebo stárnutí sklíček může redukovat fluorescenční signál.
2. Podmínky hybridizace mohou být nepříznivě ovlivněny použitím reagentů, které nedodává nebo nedoporučuje společnost Cytocell Ltd.
3. K měření teplot roztoků, vodních lázní a inkubátorů používejte kalibrovaný teploměr, protože tyto teploty jsou velmi důležité k zajištění optimální funkce produktu.
4. Koncentrace promývacího roztoku, pH a teplota jsou důležité, protože nedostatečná důslednost může vést k nespecifickému vázání sondy a přílišná důslednost naopak k nedostatečnému signálu.
5. Neúplná denaturace může vést k nedostatečnému signálu a příliš dlouhá denaturace může rovněž způsobit nespecifické vázání.
6. Nadměrná hybridizace může vést k dodatečným nebo neočekávaným signálům.
7. Uživatelé musejí před použitím testu pro diagnostické účely optimalizovat protokol pro své vlastní vzorky.

8. Neoptimální podmínky mohou vést k nespecifickému vázání, které může být nesprávně interpretováno jako signál sondy.

Interpretace výsledků

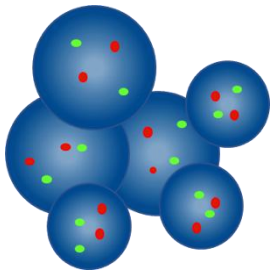
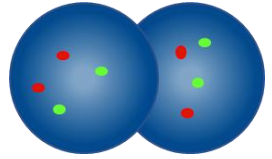
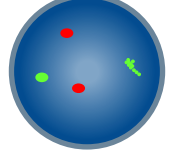
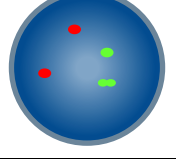
Vyhodnocení kvality sklička

Skličko by se nemělo analyzovat, jestliže:

- jsou signály příliš slabé a nelze je proto analyzovat jednoduchými filtry – pro pokračování v analýze musejí být signály jasné, výrazné a snadno hodnotitelné;
- analýze brání velký počet shluků buněk nebo překrývajících se buněk;
- nebylo hybridizováno >50 % buněk;
- mezi buňkami se nachází příliš mnoho fluorescenčních částic a/nebo fluorescenčního zákalu, který ruší signály – u optimálních skliček by mělo být pozadí tmavé nebo černé a čiré;
- není možné rozlišit hranice buněčných jader a hranice nejsou nepoškozené.

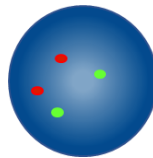
Pokyny pro analýzu

- Každý vzorek musí analyzovat a vyhodnotit dva analytici. Jakékoliv nesrovnalosti se musí vyřešit hodnocením třetího analytika.
- Všichni analytici musí mít odpovídající kvalifikaci v souladu s uznávanými národními standardy.
- Všichni analytici musí provést nezávislé hodnocení 100 jader každého vzorku. První analytik musí začít provádět analýzu z levé strany sklička a druhý analytik z pravé strany.
- Každý analytik musí zdokumentovat své výsledky na samostatných listech.
- Analyzujte pouze nepoškozená jádra, nikoli překrývající se nebo nahromaděná jádra ani jádra překrytá cytoplazmatickým odpadem či jádra s vysokým stupněm autofluorescence.
- Vyhněte se místům, kde je příliš mnoho cytoplazmatického odpadu nebo kde se vyskytuje nespecifická hybridizace.
- Intenzita signálu se může lišit, dokonce i v rámci jediného jádra. V takových případech použijte jednoduché filtry a/nebo upravte ohniskovou rovinu.
- Za neoptimálních podmínek se mohou signály jevit jako rozptýlené. Jestliže se dva signály stejné barvy vzájemně dotýkají, nebo je mezi nimi vzdálenost menší než dvě šířky signálu, nebo pokud dva signály spojuje slabý pruh, počítejte je jako jeden signál.
- Pokud při analýze dvoubarevných zlomových sond není mezera mezi červeným a zeleným signálem větší než 2 šířky signálu, počítejte to jako nepřeskupený/fúzní signál.
- Pokud není při analýze tříbarevných zlomových sond mezi kterýmkoli ze 3 signálů (červený, zelený, modrý) mezera větší než 2 signály na šířku, počítejte to jako nepřeskupený/fúzní signál.
- Pokud si nejste jisti, zda lze buňku analyzovat či nikoli, analýzu neprovádějte.

Pokyny pro analýzu	
	Nepočítejte – jádra jsou příliš těsně u sebe, takže není možno určit hranice
	Nepočítejte překrývající se jádra – všechny oblasti obou jader nejsou viditelné
	Počítejte jako dva kontrolní signály – jeden ze dvou zelených signálů je difúzní
	Počítejte jako dva kontrolní signály – mezera u jednoho zeleného signálu je menší než dvě šířky signálu

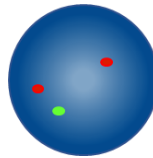
Předpokládané výsledky

Předpokládaný vzorec normálního signálu

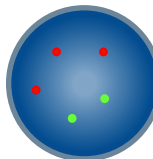


U normální buňky se předpokládají dva červené a dva zelené signály (2Č2Z).

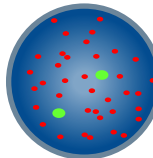
Předpokládané vzorce abnormálního signálu



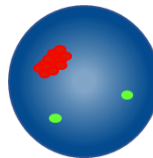
V buňce s delecí 1p32.3 bude mít předpokládaný vzorec signálu dva červené a jeden zelený signál (2Č1Z).



V buňce se ziskem v lokusu 1q21 se předpokládají dva zelené a tři nebo více červených signálů (3+Č2Z).



V buňce s amplifikací lokusu 1q21 lze pozorovat jako velké množství malých červených signálů rozptýlených po celé cytoplazmě a dva zelené kontrolní signály (ampČ2Z).



V buňce s amplifikací lokusu 1q21 způsobující homogenně zabarvenou oblast lze pozorovat velké množství červených signálů podél prodlouženého a expandovaného chromozomálního segmentu spolu se dvěma zelenými kontrolními signály (ampČ2Z).

U aneuploidních/nevyvážených vzorků jsou možné jiné vzory signálů.

Známé relevantní interference / interferující látky

Nejsou známy žádné relevantní interference / interferující látky.

Známá zkřížená reaktivita

Zkřížená reaktivita není známa

Hlášení závažných událostí

Pro pacienta / uživatele / třetí stranu v Evropské unii a v zemích se shodným regulačním režimem (nařízení (EU) 2017/746 o diagnostických zdravotnických prostředcích *in vitro*); pokud během používání tohoto prostředku nebo v důsledku jeho používání došlo k závažné události, nahlase ji výrobci a svému příslušnému národnímu orgánu.

Pokud došlo k závažným událostem v jiných zemích, nahlase je prosím výrobci a případně svému příslušnému národnímu orgánu.

Kontaktní osoba pro vigilanci výrobce: vigilance@ogt.com

Pro příslušné národní orgány v EU je seznam kontaktních míst pro vigilanci k dispozici na adrese:

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

Specifické funkční charakteristiky

Analytická specifická

Analytická specifická je definována jako procento signálů, které hybridizují do správného lokusu a na žádné jiné místo. Byly analyzovány čtyři chromozomální lokusy v každé z 20 metafázových buněk z pěti vzorků, což znamená celkem 400 datových bodů. Bylo zmapováno umístění všech hybridizovaných sond a byl zaznamenán počet FISH signálů metafázových chromozomů hybridizovaných na správný lokus.

Analytická specifická jednotlivých sond v sadě byla vypočtena jako počet signálů FISH metafázového chromozomu hybridizovaných na správný lokus vydělený celkovým počtem hybridizovaných FISH signálů metafázového chromozomu, tento výsledek byl vynásoben číslem 100 a vyjádřen jako procento s intervalem spolehlivosti 95 %.

Tabulka 1. Analytická specifická sondy CKS1B/CDKN2C (P18) Amplification/Deletion Probe

Cíl	Počet hybridizovaných metafázových chromozomů	Počet správně hybridizovaných lokusů	Analytická specifická	Interval spolehlivosti 95 %
1q21	200	200	100 %	98,12 % – 100 %
1p32.3	200	200	100 %	98,12 % – 100 %

Analytická citlivost

Analytická citlivost je procento započitatelných interfázních buněk s předpokládaným vzorcem normálního signálu. U každé z 25 fixovaných buněčných suspenzí z kostní dřeně a 25 fixovaných buněčných suspenzí z plazmatických buněk CD138+, které byly považovány za negativní na zisk/amplifikaci CKS1B nebo delecí CDKN2C, bylo analyzováno minimálně 100 interfázních buněk, což pro každý typ vzorku znamenalo minimálně 2 500 hodnocených jader. Byly analyzovány údaje o citlivosti na základě procenta buněk vykazujících normální předpokládaný signální vzorec, a byly vyjádřeny jako procento s 95 % intervalem spolehlivosti.

Tabulka 2. Analytická citlivost sondy CKS1B/CDKN2C (P18) Amplification/Deletion Probe

Typ vzorku	Kritéria citlivosti	Výsledek citlivosti
Kostní dřeň	>95 %	98,68 % (97,87–99,49 %)
CD138+	>95 %	95,95 % (94,96–96,94 %)

Charakteristika normálních mezních hodnot

Normální mezní data jsou definována jako procento buněk vykazujících falešně pozitivní signální vzorec, při němž by hodnota u pacienta byla považována za normální a neodpovídala klinické diagnóze. U každé z 25 fixovaných buněčných suspenzí z kostní dřeně a 25 fixovaných buněčných suspenzí z CD138+, které byly považovány za negativní na zisk/amplifikaci CKS1B nebo delecí CDKN2C, bylo analyzováno minimálně 100 interfázních buněk, což pro každý typ vzorku znamenalo minimálně 2 500 hodnocených jader.

Mezní hodnota byla určena pomocí funkce β -inverse (BETAINV) v MS Excel. Byla vypočtena jako procento interfázních buněk vykazujících falešně pozitivní signální vzorec pomocí horní hranice jednostranného 95 % intervalu spolehlivosti binomického rozdělení u vzorku normálního pacienta.

Tabulka 3. Charakteristika normálních mezních hodnot sondy CKS1B/CDKN2C (P18) Amplification/Deletion Probe

Typ vzorku	Mezní výsledky 3C2Z	Mezní výsledky 2C1Z
Kostní dřeň	5,93 %	5,71 %
CD138+	9,24 %	10,21 %

Laboratoře si musí ověřit mezní hodnoty pomocí vlastních dat^{9,10}.

Přesnost

Byla měřena přesnost tohoto produktu pokud jde o přesnost v rámci jednoho dne (mezi vzorky), přesnost v různých dnech (mezi dny) a přesnost v rámci různých šarží na jednom pracovišti (mezi šaržemi).

K hodnocení přesnosti produktu byly použity tři (3) vzorky: 1 normální vzorek CD138+, 1 CD138+ s nízkou pozitivitou na 2C1Z (-CDKN2C) a 1 CD138+ s nízkou pozitivitou na 3C2Z (+CKS1B). Vzorky CD138+ s nízkou pozitivitou byly vytvořeny tak, že se použila část negativních vzorků CD138+, ke kterým se přidal známý pozitivní vzorek CD138+, s cílem vytvořit nízké pozitivní vzorky v rozmezí 2–4násobku mezní hodnoty, aby se zpochybnila sonda v oblasti kolem stanovených mezních hodnot.

Pro stanovení přesnosti v rámci různých dnů / v rámci jednoho dne byly vzorky hodnoceny v rozmezí 10 dnů, které nenásledovaly po sobě; pro stanovení přesnosti mezi šaržemi byly hodnoceny 3 šarže produktu v rámci 3 opakování stejných vzorků. Výsledky byly prezentovány jako všeobecná shoda s předpovídanou negativní klasifikací (u negativních vzorků).

Tabulka 4. Reprodukovatelnost a přesnost sondy CKS1B/CDKN2C (P18) Amplification/Deletion Probe

Variabilní	Typ vzorku	Shoda
Přesnost v rámci jednoho dne / v různých dnech	Normální CD138+ (negativní)	100 %
	CD138+ s nízkou pozitivitou na 2C1Z (-CDKN2C)	100 %
	CD138+ s nízkou pozitivitou na 3C2Z (+CKS1B)	100 %
Přesnost mezi šaržemi	Normální CD138+ (negativní)	100 %
	CD138+ s nízkou pozitivitou na 2C1Z (-CDKN2C)	100 %
	CD138+ s nízkou pozitivitou na 3C2Z (+CKS1B)	100 %

Klinická funkce

Aby bylo zajištěno, že produkt odhalí záměrná přeskupení, byla pro tento produkt stanovena pomocí 1 studie klinická funkce na reprezentativních vzorcích určené populace: zbytkový materiál fixovaný metanolem / kyselinou octovou získaný z hematologických vzorků. Velikost souboru v rámci této studie byla 23 vzorků, přičemž cílovou populaci tvořilo 10 vzorků pozitivních na amplifikaci CKS1B nebo na delecí CDKN2C nebo obojí a 13 vzorků negativních na amplifikaci CKS1B nebo na delecí CDKN2C. Všechny vzorky byly anonymizovány a randomizovány, aby nedošlo ke zkreslení analýzy. Výsledky byly porovnány se známým stavem vzorku. Sonda správně určila stav vzorků ve všech případech.

Výsledky těchto testů byly analyzovány, aby poskytl hodnoty klinické citlivosti, klinické specifické a míru falešné positivity (FPR) pozitivních signálů pomocí jednodimenzního přístupu.

Tabulka 5. Klinická funkce sondy CKS1B/CDKN2C (P18) Amplification/Deletion Probe, výsledky amplifikace CKS1B

Variabilní	Výsledek
Klinická senzitivita (míra skutečné positivity, TPR)	98,71 %
Klinická specifická (míra skutečné negativity, TNR)	99,75 %
Míra falešné positivity (FPR) = 1–specifická	0,25 %

Tabulka 6. Klinická funkce sondy CKS1B/CDKN2C (P18) Amplification/Deletion Probe, výsledky delecí CDKN2C

Variabilní	Výsledek
Klinická senzitivita (míra skutečné positivity, TPR)	100 %
Klinická specifická (míra skutečné negativity, TNR)	100 %
Míra falešné positivity (FPR) = 1–specifická	0 %

Souhrn bezpečnosti a funkce (SSP)

SSP je zpřístupněn veřejnosti prostřednictvím evropské databáze zdravotnických prostředků (Eudamed), kde je propojen se základním UDI-DI. Eudamed URL: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> Základní UDI-DI: 50558449LPH039JS

Pokud není systém Eudamed plně funkční, musí být SSP zpřístupněn veřejnosti na základě žádosti zasláné e-mailem na adresu SSP@oqt.com.

Další informace

Další informace o produktu vám sdělí oddělení technické podpory společnosti CytoCell.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytoCELL.com
W: www.oqt.com

Reference

- Hanamura I, Blood 2006;108(5):1724-32
- Fonseca *et al.*, Leukemia 2009;23(12):2210-2221
- Sawyer, Cancer Genetics 2011;204(1):3-12
- Fonseca *et al.*, Leukemia 2006;20(11):2034-40
- Leone *et al.*, Clin Cancer Res 2008;14(19):6033-41
- Kulkarni *et al.*, Leukemia 2002;16:127-34
- Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
- Arsham, MS., Barch, MJ. 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.

Slovníček symbolů

EN ISO 15223-1:2021–„Zdravotnické prostředky–Symboly, které se budou používat s informacemi, dodá výrobce– Část 1: Všeobecné požadavky“ (© International Organization for Standardization (Mezinárodní organizace pro normalizaci))		
Symbol	Název	Referenční číslo/čísla
	cs: Výrobce	5.1.1
	cs: Zplnomocněný zástupce v Evropském společenství / Evropské unii	5.2.1
	cs: Datum spotřeby	5.4.1
	cs: Kód šarže	5.5.1
	cs: Katalogové číslo	5.6.1
	cs: Chraňte před slunečním světlem	5.3.2
	cs: Omezení teploty	5.3.7
	cs: Viz návod k použití	5.4.3
 ogt.com/IFU	cs: Přečtěte si elektronický návod k použití	5.4.3
	cs: Upozornění	5.4.4
	cs: <i>In vitro</i> zdravotnický diagnostický prostředek	5.5.1
	cs: Množství dostačuje k provedení <n> testů	5.5.5
	cs: Jedinečný identifikátor prostředku	5.7.10
Symboly EDMA pro IVD reagencie a složky, revize říjen 2009		
Symbol	Název	Referenční číslo/čísla
	cs: Obsah (nebo obsahuje)	N/A

Patenty a ochranné známky
CytoCell je registrovaná ochranná známka společnosti CytoCell Limited.



Cytocell Limited
Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
SPOJENÉ KRÁLOVSTVÍ

T: +44 (0)1223 294048
E: probes@cytoCell.com
W: www.ogt.com



Sysmex Europe SE
Deelbøge 19 D
22297 Hamburg
NĚMECKO

W: www.sysmex-europe.com

Historie verzí IFU
V001.00 2023-01-11: Nový IFU z důvodu nařízení (EU) 2017/746
V002 2025-08-29: Odstranění značky UKCA
V003 2025-09-09: Aktualizace adresy zmocněnce v EU. Odebrání telefonního čísla zmocněnce v EU. Odebrání faxového čísla OGT.