



A Sysmex Group Company



Käyttöohje

REF: LPH 036-S / LPH 036

EV11 (MECOM) Breakapart Probe



VAIN AMMATTIKÄYTTÖÖN



www.cytocell.com

Lisätietoja ja muita kieliä saatavilla osoitteesta www.ogt.com

Rajoitukset

Laite on suunniteltu havaitsemaan uudelleenjärjestyksiä, joissa on katkaisukohtia tämän koetinajan punaisten, vihreiden ja sinisten kloonien sitomilla alueilla, joihin sisältyy EV11 (MECOM) -alue. Tämä tuote ei ehkä havaitse kyseisen alueen ulkopuolisia katkoskohtia tai vaihtoehtoisia uudelleenjärjestyksiä, jotka sisältyvät kokonaisuudessaan tälle alueelle.

Testiä ei ole tarkoitettu käytettäväksi riippumattomaan diagnostiikkaan, raskausajan tutkimuksiin, väestöpohjaiseen seulontaan, vieritestaukseen tai itsestaukseen. Tämä tuote on tarkoitettu ainoastaan ammattimaiseen laboratoriokäyttöön; soveltuvan pätevyyden saaneen henkilöstön on tulkittava kaikki tulokset ottaen huomioon muut asiaankuuluvat testitulokset.

Tätä tuotetta ei ole validoitu käytettäväksi sellaisen näyte- tai tautityypin kohdalla, joita ei ole määritetty aiotussa käyttötarkoituksessa.

FISH-tulosten raportoinnin ja tulkinnan on oltava yhdenmukainen ammattimaisten käytäntöstandardien kanssa, ja niissä on otettava huomioon muut kliiniset ja diagnostiset tiedot. Sarja on tarkoitettu muiden diagnostisten laboratoriotestien apuvälineeksi, eikä hoitotoimia saa käynnistää yksinomaan FISH-tuloksen perusteella.

Mikäli protokollaa ei noudateta, se saattaa vaikuttaa suorituskykyyn ja johtaa virheellisiin positiivisiin/negatiivisiin tuloksiin.

Tätä sarjaa ei ole validoitu mainitusta aiotusta käyttötarkoituksesta poikkeavaan käyttöön.

Aiottu käyttötarkoitus

CytoCell EV11 (MECOM) Breakapart Probe irrotettava koetin on kvalitatiivinen, ei-automatisoitu FISH (fluorescence *in situ* hybridisation, fluoresenssi *in situ* -hybridisaatio) -testi, jota käytetään kromosomien uudelleenjärjestyksien havaitsemiseen kromosomin 3 alueella 3q26.2 Carnoy'n liuokseen (3:1 metanoli/etikkahappo) fiksoiduille, hematologisesti johdetuille solususpensioidille potilaita, joilla on vahvistettu tai epäilty akuutti myeloinen leukemia (AML) tai akuutti lymfoblastinen leukemia (MDS).

Käyttöaiheet

Tämä tuote on suunniteltu käytettäväksi muiden kliinisten ja histopatologisten testien lisäksi vakiintuneissa diagnostiikan ja kliinisen hoidon hoitopoluissa, joissa EV11 (MECOM) -translokaation tilan tunteminen olisi tärkeää kliiniselle hoidolle.

Testin periaatteet

Fluoresenssi *in situ* -hybridisaatio (FISH) on tekniikka, jonka avulla DNA-sekvenssejä voidaan havaita metafaasikromosomeista tai fiksoitujen sytogeneettisten näytteiden interfaasitumista. Tekniikassa käytetään DNA-koettimia, joiden avulla hybridisaatio koskee kokonaisia kromosomeja tai yksittäisiä, ainutkertaisia sekvenssejä ja jotka toimivat tehokkaana sytogeneettisen G-rait-analyysin apuvälineenä. Tätä tekniikkaa voidaan nyt käyttää olennaisena tutkimustyökaluna raskauden aikaiseen, hematologiseen ja kiinteiden tumorien kromosomianalyyysiin. Kohde-DNA on fiksaation ja denaturaation jälkeen saatavilla palautumiseksi samalla tavoin denaturoituu, fluoresenssimerkittyyn DNA-koettiin, jolla on täydentävä sekvenssi. Hybridisaation jälkeen sitomaton ja muu kuin spesifisesti sidottu DNA-koetin poistetaan, ja DNA vastavärjätään visualisointia varten. Sen jälkeen hybridisoitu koetin voidaan visualisoida fluoresenssimikroskopian avulla kohdemateriaalissa.

Koettimen tiedot

MECOM (MDS1- ja EV11-kompleksin lokus) -onkogeneeni paikassa 3q26.2 on usein uudelleenjärjestynyt hematologisissa syövässä, jotka ovat lähtöisin imusolmukkeesta.

MECOM koodaa sinkkisormiproteiinin, joka ilmentyy virheellisesti leukemiasoluissa 2–5 prosentilla AML- ja MDS-potilaista¹. Tämä dereguloitu ilmentyminen johtuu usein kromosomien uudelleenjärjestymisestä, jossa on mukana 3q26.2, ja kaksi yleisintä poikkeusta ovat t(3;3)(q21;q26.2) ja inv(3)(q21q26.2)¹. Translokaatioiden ja inversioiden katkoskohdat vaihtelevat huomattavasti.

Inversion katkoskohtia tavataan MECOM-geenin sentromeerisellä puolella ja MECOM-geeni mukaan lukien, ja ne kattavat noin 600 kb. Suurin osa katkoskohdista translokaatioissa 3q26.2 on telomeerisia MECOM-geeniin nähden ja kattavat alueen, johon sisältyy MDS1-geenin telomeerinen pää ja MYNN-geeni².

Kromosomien uudelleenjärjestymät, joissa on mukana alue 3q26.2, on yhdistetty myelooisiin syöpiin, MECOM-geenin epänormaaliin ilmentymiseen, epäsuotuisaan ennusteeseen sekä aggressiiviseen kliiniseen etenemiseen².

AML ja inv(3)(q21q26.2) tai t(3;3)(q21;q26.2) on tunnistettu tautikokonaisuus Maailman terveysjärjestön (WHO) myelooisten neoplasmien ja akuuttien leukemoiden luokituksen mukaisesti. Tämä on transformoitu tai de novo -AML, jonka eteneminen on hyvin aggressiivista, ja poikkeamissa on mukana MECOM kohdassa 3q26.2 ja RPN1 (riboforiini I) paikassa 3q21³.

MECOMin on myös osoitettu olevan uudelleenjärjestynyt hoitoon liittyvissä sairauksissa translokaation t(3;21)(q26.2;q22) kautta, mistä seuraa MECOM-RUNX1-fuusio^{3,4}.

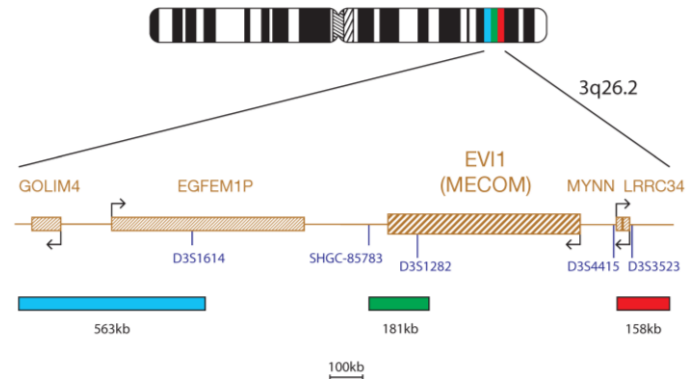
MECOM-uudelleenjärjestymät ovat hyvin heterogeenisiä ja niitä voi olla vaikea havaita perinteisen sytogenetiikan keinoin, jolloin FISH on hyödyllinen työkalu niiden havaitsemiseen.

Koettimen tekniset tiedot

EV11, 3q26.2, punainen

EV11, 3q26.2, vihreä

EV11, 3q26.2, sininen



EV11-koetinseoksen punainen komponentti sisältää 158 kb:n koettimen, joka on telomeerinen D3S4415-markkerille ja sisältää LRRRC34-geenin. Vihreä komponentti kattaa 181 kb:n alueen, johon sisältyy EV11 (MECOM) -geenin sentromeerinen osa, ja se ylittää D3S1282-markkerin yli. Sininen komponentti kattaa 563 kb:n alueen EV11-geenin sentromeerisessä osassa, johon sisältyy D3S1614-markkeri.

Toimitettavat materiaalit

Koetin: 50 µl pulloa kohti (5 testiä) tai 100 µl pulloa kohti (10 testiä)

Koettimet toimitetaan ennalta sekoitettuna hybridisaatioliuokseen (formamidi, dekstraanisulfaatti, suolaliuos-natriumsitraatti (SSC)), ja ne ovat valmiita käytettäväksi.

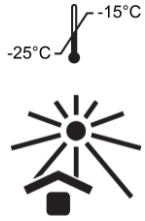
Vastaväri: 150 µl pulloa kohti (15 testiä)

Vastaväri on DAPI häipymistä ehkäisevä (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenyylindoli)).

Varoitukset ja varoimet

- In vitro* -diagnostiseen käyttöön. Vain ammattikäyttöön.
- Käytä käsiä käsitellessäsi DNA-koettimia ja DAPI-vastaväriä.
- Koetinseokset sisältävät formamidiä, joka on teratogeeni: älä hengitä höyryä sisään tai päästä ainetta kosketuksiin ihon kanssa. Käsiteltävä varoen: käytä käsiä ja laboratoriotakkia.
- DAPI on potentiaalinen karsinogeeni. Käsiteltävä varoen: käytä käsiä ja laboratoriotakkia.
- Hävitä kaikki vaaralliset materiaalit laitoksesi vaarallisten jätteiden hävittämistä koskevien ohjeiden mukaan.
- Käyttäjien on pystyttävä erottamaan toisistaan punainen, sininen ja vihreä väri.
- Mikäli hahmoteltua protokollaa ei noudateta ja sen mukaisia reagensseja ei käytetä, se saattaa vaikuttaa suorituskykyyn ja johtaa virheellisiin positiivisiin/negatiivisiin tuloksiin.
- Koetinta ei saa laimentaa tai sekoittaa muiden koetinten kanssa.
- Mikäli 10 µl:n koetinta ei käytetä protokollan esidenaturaatiovaiheessa, se saattaa vaikuttaa suorituskykyyn ja johtaa virheellisiin positiivisiin/negatiivisiin tuloksiin.

Säilytys ja käsittely



Sarjaa on säilytettävä pakastimessa $-25...-15\text{ °C:n}$ lämpötilassa sarjan etiketissä ilmoitettuun eräpäivään saakka. Koetinta ja vastaväripulloja on säilytettävä pimeässä.

Koetin pysyy vakaana normaalissa käytössä ilmenevien pakastus- ja sulatusjaksojen ajan (jolloin yhden jakson aikana koetin poistetaan pakastimesta ja laitetaan takaisin pakastimeen), ja se on fotostabiili jopa 48 tuntia altistuttuaan jatkuville valaistusolosuhteille. On ryhdyttävä kaikkiin mahdollisiin toimenpiteisiin valolle ja lämpötilan muutoksille altistumisen rajoittamiseksi.

Tarvitavat laitteet ja materiaalit, jotka eivät sisälly pakkaukseen

Kalibroituja laitteistoja on käytettävä:

1. Lämpölevy (kiinteällä levyllä ja tarkalla lämpötilan hallinnalla 80 °C:n lämpötilaan saakka)
2. Kalibroidut tilavuudeltaan vaihtelevat mikropipetit ja kärjet, 1–200 μl
3. Vesikylypy tarkalla lämpötilan hallinnalla 37 °C:n ja 72 °C:n lämpötilassa
4. Mikrosentrifugiletkut (0,5 ml)
5. Fluoresenssimikroskooppi (katso Fluoresenssimikroskooppisuositus-osio)
6. Vaihekontrastimikroskooppi
7. Coplin-purkit puhdasta muovia, keramiikkaa tai lämmönkestävää lasia
8. Pihdit
9. Kalibroitu pH-mittari (tai pH-indikaattoriliuskat, joilla voidaan mitata 6,5–8,0:n pH-arvo)
10. Kostutettu säiliö
11. Fluoresenssiluokan mikroskooppilinnin immersioöljy
12. Työpöytäsentrifugi
13. Mikroskooppiobjekttilasi
14. 24 x 24 mm:n peitelasit
15. Ajastin
16. 37 °C:n inkubaattori
17. Kumiliuosliima
18. Pyörresekoitin
19. Mittasylinterit
20. Magneettinen sekoitin
21. Kalibroitu lämpömittari

Valinnainen laitteisto, ei sisälly pakkaukseen

1. Sytogeneettinen kuivauskammio

Tarvitavat reagenssit, jotka eivät sisälly pakkaukseen

1. 20x suolaliuos-natriumsitraattiliuos (SSC)
2. 100-prosenttinen etanoli
3. Tween-20
4. 1M natriumhydroksidi (NaOH)
5. 1M suolahappo (HCl)
6. Akkuvesi

Fluoresenssimikroskooppisuositus

Käytä 100 watin elohopealamppua tai vastaavaa ja öljymimmersiosuunnitelman 60/63x- tai 100x-apokromaattiohjelmia parhaaseen mahdolliseen visualisointiin. Tässä koetinsarjassa käytettävät loisteaineet virittyvät ja säteilevät seuraavilla aaltopituuksilla:

Loisteaine	Viritysmaks [nm]	Emissiomaks [nm]
Sininen	418	467
Vihreä	495	521
Punainen	596	615

Varmista, että mikroskooppiin on sovitettu asianmukaiset viritys- ja emissiosuodattimet, jotka kattavat yllä luetellut aallonpituudet. Käytä DAPI- / vihreän spektrin / punaisen spektrin kolmoisikaistanpäästösuoatinta tai vihreän spektrin / punaisen spektrin kaksoisikaistanpäästösuoatinta vihreän ja punaisen loisteaineen optimaaliseen samanaikaiseen visualisointiin. Käytä sinisen spektrin yksinkertaista kaistanpäästösuoatinta sinisen spektrin optimaaliseen visualisointiin tai punaisen spektrin/vihreän spektrin/sinisen spektrin kolmoisikaistanpäästösuoatinta vihreän, punaisen ja sinisen loisteaineen samanaikaiseen visualisointiin.

Tarkista fluoresenssimikroskooppi ennen käyttöä varmistaaksesi, että se toimii asianmukaisesti. Käytä immersioöljyä, joka soveltuu fluoresenssimikroskooppille ja jonka koostumus on tarkoitettu alhaiselle automaattiselle fluoresenssille. Vältä häilymistä ehkäisevän DAPIn sekoittamista mikroskoopin immersioöljyn kanssa, sillä se hämärtää signaaleita. Noudata valmistajien suosituksia lampun käyttöänsä ja suodatinten iän suhteen.

Näytteen valmistelu

Sarja on suunniteltu käytettäväksi hematologisesti johdettuihin solususpensioihin, jotka on fiksoitu Carnoy'n liuosfiksatiiviin (3:1 metanoli/etikahappo) ja jotka on valmistettu laboratorion tai laitoksen suuntaviivojen mukaisesti. Valmistele ilmakuivatut näytteet mikroskoopin objektiivilaseille sytogeneettisten vakio-toimenpiteiden mukaisesti. AGT-sytogenetiikkalaboratorion opaskirja sisältää suosituksia näytteen keräämisestä, viljelystä, poiminnasta ja objektiivilasi valmistelusta⁵.

Liuksen valmistus

Etanoliliuokset

Laimenna 100-prosenttinen etanoli akkuedellä seuraavissa suhteissa ja sekoita huolellisesti.

- 70 % etanolia – 7 osaa 100-prosenttistä etanolia ja 3 osaa akkuedettä
- 85 % etanolia – 8,5 osaa 100-prosenttistä etanolia ja 1,5 osaa akkuedettä

Säilytä liuosta enintään 6 kuukautta huoneenlämpötilassa ilmatiiviissä säiliössä.

2 x SSC-liuos

Laimenna 1 osa 20 x SSC-liuosta 9 osaan akkuedettä ja sekoita huolellisesti. Tarkista pH ja säädä pH-arvoon 7,0 käyttäen natriumhydroksidia tai vetykloridia tarpeen mukaan. Säilytä liuosta enintään 4 viikkoa huoneenlämpötilassa ilmatiiviissä säiliössä.

0,4 x SSC-liuos

Laimenna 1 osa 20 x SSC-liuosta 49 osaan akkuedettä ja sekoita huolellisesti. Tarkista pH ja säädä pH-arvoon 7,0 käyttäen natriumhydroksidia tai vetykloridia tarpeen mukaan. Säilytä liuosta enintään 4 viikkoa huoneenlämpötilassa ilmatiiviissä säiliössä.

2 x SSC, 0,05-prosenttinen Tween-20-liuos

Laimenna 1 osa 20 x SSC-liuosta 9 osaan akkuedettä. Lisää 5 μl Tween-20-liuosta 10 ml kohti ja sekoita huolellisesti. Tarkista pH ja säädä pH-arvoon 7,0 käyttäen natriumhydroksidia tai vetykloridia tarpeen mukaan. Säilytä liuosta enintään 4 viikkoa huoneenlämpötilassa ilmatiiviissä säiliössä.

FISH-protokolla

(Huomautus: Varmista, että koettimen ja vastavärin altistuminen laboratoriovaloille on aina rajallista).

Objektiivilasin valmistelu

1. Laita pisara solunäytettä mikroskooppiobjekttilasille. Anna kuivua. (Valinnainen, jos käytössä on sytogeneettinen kuivauskammio: objekttilasille annostelu tulee tehdä käyttämällä sytogeneettistä kuivauskammiota. Kammiota on käytettävä noin 25 °C:n lämpötilassa ja 50 %:n kosteudessa, jotta solunäytepisara voidaan asettaa optimaalisesti lasille. Mikäli sytogeneettistä kuivauskammiota ei ole saatavilla, käytä vaihtoehtoisesti vetokaappia).
2. Upota objektiivilasi 2 x SSC-liuokseen 2 minuutiksi huoneenlämpötilassa ravistamatta.
3. Kuivaa kutakin etanolisarjassa (70 %, 85 % ja 100 %) 2 minuuttia huoneenlämpötilassa.
4. Anna kuivua.

Esidenaturaatio

5. Poista koetin pakastimesta ja anna sen lämmetä huoneenlämpötilaan. Sentrifugoi putkia lyhyen aikaa ennen käyttöä.
6. Varmista, että koetinliuos on sekoitettu yhtenäisesti pipetillä.
7. Poista 10 μl koetinta testiä kohti ja siirrä se mikrosentrifugiputkeen. Palauta jäljelle jäänyt koetin nopeasti pakastimeen.
8. Aseta koetin ja näyteobjektiivilasi esilämpimään 37 °C:n ($\pm 1\text{ °C}$) lämpölevylle 5 minuutiksi.
9. Laita 10 μl koetinseosta solunäyteelle ja aseta peitelasi varoen paikalleen. Sulje kumiliuosliimalla ja anna liiman kuivua täysin.

Denaturaatio

10. Denaturoi näyte ja koetin samanaikaisesti kuumentamalla objektiivilasia lämpölevyllä 2 minuutin ajan 75 °C:n ($\pm 1\text{ °C}$) lämpötilaan.

Hybridisaatio

11. Laita objektiivilasi yöksi kosteaan valonkestävään säiliöön 37 °C:n ($\pm 1\text{ °C}$) lämpötilaan.

Hybridisaation jälkeiset pesut

12. Poista DAPI pakastimesta ja anna sen lämmetä huoneenlämpötilaan.
13. Poista peitelasi ja kaikki liimajäljet huolellisesti.
14. Käytä liuosten, vesikylypyjen ja inkubaattorien lämpötilojen mittaamiseen kalibroituja lämpömittareita, sillä nämä lämpötilat ovat ratkaisevan tärkeitä tuotteen optimaalisen suorituskyvyn kannalta.
15. Tyhjennä objektiivilasi ja upota se 30 sekunniksi 2 x SSC:tä ja 0,05 % Tween-20:tä sisältävään liuokseen huoneenlämpötilassa (pH 7,0) ravistamatta.
16. Tyhjennä objektiivilasi ja laita kuhunkin näytteeseen 10 μl häilymistä ehkäisevää DAPIa.
17. Peitä peitelasilla, poista mahdolliset kuplat ja anna värin kehittyä pimeässä 10 minuuttia.
18. Tarkastele fluoresenssimikroskooppilla (katso **Fluoresenssimikroskooppisuositus**).

Valmiiden objektiivilasiensa vakaus

Valmiita objektiivilaseja voidaan analysoida enintään 1 kuukausi, mikäli niitä säilytetään pimeässä huoneenlämpötilassa tai sitä matalammassa lämpötilassa.

Toimenpidesuositukset

1. Objektiivilasiensa sintraaminen tai ikäännyttäminen saattaa heikentää signaalien fluoresenssia
2. Muiden kuin CytoCell Ltd -yhtiön toimittamien tai suosittelemien reagenssien käyttö saattaa vaikuttaa haitallisesti hybridisaatio-olosuhteisiin.
3. Käytä liuosten, vesikylypyjen ja inkubaattorien lämpötilojen mittaamiseen kalibroituja lämpömittareita, sillä nämä lämpötilat ovat ratkaisevan tärkeitä tuotteen optimaalisen suorituskyvyn kannalta.
4. Pesupitoisuudet, pH-arvo ja lämpötilat ovat tärkeitä, sillä liiallinen löyhyyys saattaa johtaa koettimen epäspesifiseen sitoutumiseen ja liiallinen ankaruus signaalien puuttumiseen.

- Epätäydellinen denaturaatio saattaa johtaa signaalin puuttumiseen ja liiallinen denaturaatio saattaa myös johtaa epäspesifiseen sitoutumiseen.
- Liiallinen hybridisaatio saattaa johtaa ylimääräisiin tai odottamattomiin signaaleihin.
- Käyttäjien on optimoitava omien näytteidensä protokolla ennen testin käyttöä diagnostiikkiin tarkoituksiin.
- Suboptimaaliset olosuhteet saattavat johtaa epäspesifiseen sitoutumiseen, jotka saatetaan tulkita koetinsignaaleiksi.

Tulosten tulkitseminen

Objektiivilasin laadun arviointi

Objektiivilasia ei tarvitse analysoida, jos:

- yksittäisten suodatinten signaalit ovat liian heikkoja analysoitavaksi – jotta analyysia voidaan jatkaa, signaalien on näytävä kirkkaina, selkeinä ja helposti arvioitavina
- analyysia vaikeuttaa suuri määrä yhteen kasautuneita / päällekkäisiä soluja
- > 50 % soluista ei ole hybridisoituneita
- solujen välissä on liikaa fluoresoivia hiukkasia ja/tai fluoresoivaa utua, joka häiritsee signaaleita – optimaalisissa objektiivilaseissa taustan pitäisi näkyä tummana tai mustana ja puhtaana
- solun tuman rajoja ei voida erottaa, eivätkä ne ole eheitä.

Analysointiohjeet

- Kahden analytytikon pitäisi analysoida ja tulkita jokainen näyte. Kaikki eriytyvät on annettava kolmannen analytytikon arvioitavaksi.
- Jokaisella analytytikolla on oltava sopiva pätevyys tunnustettujen kansallisten standardien mukaan.
- Jokaisen analytytikon pitäisi saada riippumattomasti 100 tumaa kustakin näytteestä. Ensimmäisen analytytikon pitäisi käynnistää analyysi objektiivilasin vasemmalta puolelta ja toisen analytytikon oikealta puolelta.
- Kunkin analytytikon on dokumentoitava tuloksiaan erillisillä arkeilla.
- Analysoi vain eheitä tumia, ei päällekkäisiä tai yhteen kasautuneita tumia tai sellaisia tumia, jotka ovat sytoplasmajätteen peitossa tai joissa on runsaasti autofluoresenssia.
- Vältä alueita, joilla on liiallista sytoplasmajätettä tai epäspesifistä hybridisaatiota.
- Signaalin intensiteetti saattaa vaihdella yksittäisenkin tuman kohdalla. Käytä tällaisissa tapauksissa yksittäisiä suodattimia ja/tai säädä fokustasoa.
- Suboptimaalisissa olosuhteissa signaalit saattavat näyttää hajanaisilta. Jos kaksi samanväristä signaalia koskettaa toisiaan, jos niiden välinen etäisyys on enintään yhtä suuri kuin kahden signaalin leveys tai jos kahta signaalia yhdistää heikko säie, katso ne yhdeksi signaaliksi.
- Analysoida kolmivärisiä irrotettavia koettimia, signaalit on laskettava muiksi kuin uudelleenjärjestellyiksi/fuusioituneiksi, jos punaisen, vihreän ja sinisen signaalin välinen rako on enintään kahden signaalileveyden kokoinen.
- Mikäli on epäilystä siitä, voidaanko solu analysoida, älä analysoi sitä.

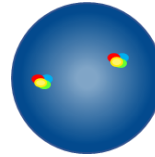
Analysointiohjeet	
	Älä laske – tumat ovat liian lähekkäin, jotta rajoja voisi määrittää
	Älä laske päällekkäisiä tumia – kummankin tuman kaikki alueet eivät ole näkyvissä
	Laske kahdeksi fuusiosignaaliiksi – punaisen ja vihreän/sinisen signaalin välinen rako on enintään kahden signaalileveyden kokoinen
	Laske kahdeksi fuusiosignaaliiksi – vihreän ja punaisen/sinisen signaalin välinen rako on enintään kahden signaalileveyden kokoinen

	Laske kahdeksi fuusiosignaaliiksi – sinisen ja punaisen/vihreän signaalin välinen rako on enintään kahden signaalileveyden kokoinen
	Laske kahdeksi fuusiosignaaliiksi – oikeanpuoleisessa yläfuusiossa punaisen signaali on hajanainen
	Laske kahdeksi fuusiosignaaliiksi – oikeanpuoleisessa yläfuusiossa vihreä signaali on hajanainen
	Laske kahdeksi fuusiosignaaliiksi – oikeanpuoleisessa yläfuusiossa sinisen signaali on hajanainen

Odotettavissa olevat tulokset

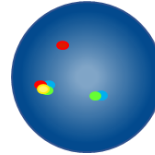
Kolmen värin strategia osoittaa translokaation tai inversion ilmenemisen ja mahdollistaa kunkin erilaisen uudelleenjärjestymän tyyppien erottamisen.

Odotettavissa oleva normaali signaalikuvi

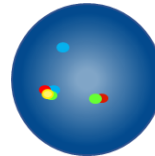


Tavallisessa solussa on odotettavissa kaksi punaista/vihreää/sinistä samalle alueelle paikantuvaa signaalia (2PVS).

Odotettavissa olevat epänormaalit signaalikuvot



Jos solussa on t(3;nn)(q26.2;nn)-translokaatio, odotettavissa oleva signaalikuvi on yksi punainen, yksi vihreä/sininen fuusio ja yksi punainen/vihreä/sininen fuusiosignaali (1P, 1VS, 1PVS).



Jos solussa on inversio inv(3)(q21q26.2), odotettavissa oleva signaalikuvi on yksi punainen/vihreä fuusio, yksi erillinen sininen signaali ja yksi punainen/vihreä/sininen fuusiosignaali (1PV, 1S, 1PVS).

Muut signaalikuvot ovat mahdollisia aneuploidisissa/epätasapainoisissa näytteissä.

Tunnettu ristireaktiivisuus

Ei tunnettua ristireaktiivisuutta.

Haittatapahtumista raportointinen

Jos uskot, että tässä laitteessa on ilmennyt toimintahäiriö tai että sen suorituskyvyminaisuuksissa on tapahtunut huononemista, joka on saattanut myötävaikuttaa haittatapahtumaan (kuten viivästynyt tai virheellinen diagnoosi, viivästynyt tai epäasianmukainen hoito), tästä on ilmoitettava välittömästi valmistajalle (**sähköposti:** vigilance@ogt.com).

Soveltuvien osien tapahtumasta on ilmoitettava myös kansallisille toimivaltaisille viranomaisille. Luettelo vaaratilanteiden yhteystiedoista on seuraavassa osoitteessa: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Erityiset suorituskykyominaisuudet

Analyttinen spesifisyys

Analyttinen spesifisyys on prosenttiosuus signaaleista, jotka hybridisoidaan oikeaan lokukseen eikä muihin sijainteihin. Analyttinen spesifisyys määritettiin analysoimalla yhteensä 200 kohdelokusta. Analyttinen spesifisyys laskettiin sellaisten FISH-signaalien määräksi, jotka hybridisoituivat oikeaan lokukseen jaettuna hybridisoituneiden FISH-signaalien kokonaismäärällä.

Taulukko 1. EVI1 Breakapart Probe irrotettavan koettimen analyttinen spesifisyys

Koetin	Kohdelokus	Oikeaan lokukseen hybridisoituneiden signaalien määrä	Kaikkien hybridisoituneiden signaalien kokonaismäärä	Spesifisyys (%)
Punainen EVI1	3q26	200	200	100
Vihreä EVI1	3q26	200	200	100
Sininen EVI1	3q26	200	200	100

Analyttinen herkkyys

Analyttinen herkkyys on niiden tulosten laskennassa käytettävien interfaasisolujen prosenttiosuus, joiden odotettavissa oleva signaalikuvio on normaali. Analyttinen herkkyys määritettiin analysoimalla interfaasisoluja erilaisten normaaliin näytteiden halki. Herkkyys laskettiin prosenttiosuudeksi tulosten laskennassa käytettävistä interfaasisoluista, joilla on odotettavissa oleva signaalikuvio (95 %:n luottamusväli).

Taulukko 2. EVI1 Breakapart Probe irrotettavan koettimen analyttinen herkkyys

Sellaisten solujen määrä, joilla on odotettavissa olevat signaalikuviot	Sellaisten solujen määrä, joilla on tulosten laskennassa käytettävät signaalit	Herkkyys (%)	95 %:n luottamusväli
4 957	5 000	99,14	98,84–99,36

Normaalien raja-arvojen luokittelu

Normaali raja-arvo on yhdessä FISH-koettimen kanssa maksimiprosenttiosuus tulosten laskennassa käytettävistä interfaasisoluista, joilla on spesifinen epänormaali signaalikuvio, jonka kohdalla näyte katsotaan normaaliksi kyseisen signaalikuvion osalta.

Normaali raja-arvo määritettiin uudelleenjärjestymälle negatiivisista näytteistä, joita koetin on tarkoitettu tunnistamaan, ja käyttäen käänteistä beetafunktiota. Kaksi analyttikkoa kirjasi toisistaan riippumatta 100 interfaasituman signaalikuviot, yhteensä 200 näytettä kohden.

Taulukko 3. EVI1 Breakapart Probe irrotettavan koettimen normaalien raja-arvojen luokittelu

Epänormaali signaalikuvio	Raja-arvon määrittämisessä analysoitujen näytteiden lukumäärä	Näytettä kohden analysoidujen tumien lukumäärä	Väärin positiivisten signaalikuvioiden suurin lukumäärä	Normaali raja-arvo (%)
1P, 1VS, 1PVS	25	200	3	4
1PV, 1S, 1PVS	25	200	3	4

Laboratorioiden on tarkistettava raja-arvot käyttäen omia tietojaan^{6, 7}.

Uusittavuus

Uusittavuus määritettiin kolmessa erillisessä laboratoriossa, jotka testasivat kuusi sokkonäytettä (kaksi negatiivisia uudelleenjärjestymän osalta, kaksi heikosti positiivista näytettä, joissa oli 1–3-kertainen raja-arvo, ja kaksi vahvasti positiivista näytettä, jotka sisälsivät yli 45 prosenttia uudelleenjärjestymälle positiivisia soluja). Analyysi tehtiin käyttäen kahta kopiota jokaisesta näytteestä viiden ei-peräkkäisen päivän aikana.

Kaikissa kolmessa kohteessa suoritettiin päivän sisäinen, päivien välinen ja kohteiden välinen testaus käyttäen samaa koetinerää, ja yksi kohde suoritti myös erän sisäisen uusittavuustestin käyttäen kolmea eri koetinerää.

Uusittavuus laskettiin käyttäen kunkin testin aikana tutkittujen muuttujien yhtäpitävyyttä.

Taulukko 4. EVI1 Breakapart Probe irrotettavan koettimen uusittavuus ja tarkkuus

Signaali	Uusittavuustutkimus	Näyte	Yhtäpitävyys (%)
Inversio (1PV, 1S, 1PVS)	Päivänsisäinen/päivienvälinen /kohteidenvälinen	Negatiivinen	100
		Vahvasti positiivinen	100
	Eränsisäinen	Negatiivinen	92
		Vahvasti positiivinen	100

Translokaatio (1P, 1VS, 1PVS)	Päivänsisäinen/päivienvälinen /kohteidenvälinen	Negatiivinen	100
		Vahvasti positiivinen	100
	Eränsisäinen	Negatiivinen	100
		Vahvasti positiivinen	100

Kliininen suorituskyky

Kliininen suorituskyky määritettiin käyttäen valikoimattomien potilaiden edustavaa joukkoa, jotka olivat saaneet lähetteen AML:n tai MDS:n vuoksi, ja 100:aa kohteesta kerättyä näytettä. Koettimen havaitsemien uudelleenjärjestymien ilmenemisprosentteja verrattiin kirjallisuuskatsauksen tuloksiin.

Tämän vertailun mahdollistamiseksi kirjallisuuden osoittama luottamusväli 100 näytteen populaation koolta laskettiin laskemalla 1–näyteosuuksien testi-jatkuvuuskorjauksella.

Taulukko 5. EVI1 Breakapart Probe irrotettavan koettimen kliininen suorituskyky

Uudelleenjärjestely	Prevalenssi			
	Kirjallisuuskatsaus (%)	95 % LCI (%)	Kliininen tutkimus (%)	95 % UCL (%)
AML ja inv(3)/t(3;3)/MECOM-uudelleenjärjestymät	1,3	0,1	4	6,7
MDS ja MECOM-uudelleenjärjestymät	0,4	0		5,3

Lisätietoja

Tuotteita koskevia lisätietoja on saatavilla ottamalla yhteyttä CytoCell-yhtiön teknisen tuen osastoon.

Puh.: +44 (0)1223 294048

Sähköposti: techsupport@cytoCELL.com

Verkkosivut: www.ogt.com

Viitteet

- 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, 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.

Symboliopas

REF	fi: Kuvastonumero
IVD	fi: <i>In vitro</i> -diagnostinen lääkinnällinen laite
LOT	fi: Eräkoodi
	fi: Tutustu käyttöohjeisiin
	fi: Valmistaja
	fi: Käytön eräpäivä
	fi: Lämpötilaraja
	fi: Pidettävä poissa auringonvalosta
	fi: Riittävä sisältö <n> testiin
CONT	fi: Sisältö

Patentit ja tavaramerkit

CytoCell on CytoCell Ltd -yhtiön rekisteröity tavaramerkki.



CytoCell Ltd.

Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science
Park, Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, Yhdistynyt kuningaskunta
Puh.: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
Sähköposti: probes@cytoCell.com
Verkkosivut: www.ogt.com