



A Sysmex Group Company



Lietošanas instrukcija

ATS.: CE-LPH 064-S / CE-LPH 064

FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe



TIKAI PROFESIONĀLAM LIETOJUMAM



Papildinformācija un informācija citās valodās ir pieejama vietnē ogt.com/IFU

Paredzētais lietošanas mērķis

Zonde CytoCell® FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe ir kvalitatīvs, neautomatizēts luminiscentās *in situ* hibridizācijas (fluorescence *in situ* hybridisation — FISH) tests, kas paredzēts hromosomālo pārkārtojumu noteikšanai starp 15. hromosomas reģionu 15q24 un 17. hromosomas reģionu 17q21.1-q21.2 Karnuā šķīdumā (3:1 metanols/etiķskābe) fiksētās hematoloģiski iegūtās šūnu suspensijās no pacientiem, kuriem ir konstatēta akūta mieloleikoze (AML) vai pastāv aizdomas par tās esamību.

Lietošanas indikācijas

Šis ierīce ir paredzēta kā citu klīnisko un histopatoloģisko testu papildinājums atzītās diagnostikas un klīniskās aprūpes metodēs, kad informācija par PML::RARA translokācijas statusu ir svarīga klīniskajai pārvaldībai.

Ierobežojumi

Šī ierīce ir paredzēta pārkārtojumu ar pārtraukumpunktiem noteikšanai reģionā, ko nosedz sarkanie un zaļie kloni šajā zonžu komplektā, kurā ietilpst PML un RARA reģioni. Izmantojot šo ierīci, var netikt noteikti pārtraukumpunkti ārpus šī reģiona vai pārkārtojumu varianti, kas pilnībā ietilpst šajā reģionā.

Šī ierīce nav paredzēta: izmantošanai autonoma diagnostikas līdzekļa statusā, papildu diagnostikas nolūkā, prenatalai testēšanai, konkrētu populāciju skrīningam, testēšanai ārpus laboratorijas un paštestēšanai.

Šī ierīce nav validēta paraugu tiem, slimību tiem vai mērķiem, kas neatbilst paredzētajam lietošanas mērķim.

Tā ir paredzēta kā citu diagnostisko laboratorijas testu palīg līdzeklis, un lēmumus par terapiju nedrīkst pieņemt, vadoties tikai pēc FISH testa rezultātiem.

Zināšana par FISH testa rezultātiem un to interpretēšana ir jāveic atbilstoši kvalificētam personālam saskaņā ar profesionālajiem prakses standartiem, un ir jāņem vērā citu testu rezultāti, klīniskā un diagnostikas informācija.

Šī ierīce ir paredzēta tikai profesionālam lietojumam laboratorijā.

Neievērojot attiecīgo protokolu, var tikt ietekmēta veikspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi vai kļūdaini negatīvi rezultāti.

Testa principi

Luminiscentā *in situ* hibridizācija (fluorescence *in situ* hybridisation — FISH) ir metode, kas ļauj noteikt DNS sekvenču metafāzu hromosomās vai interfāzes kodolos fiksētiem citogēnētiskiem paraugiem. Šajā metodē tiek izmantotas DNS zondes, kas hibridizējas ar veselām hromosomām vai atsevišķām unikālām sekvencēm un kalpo kā efektīvs G joslu citogēnētiskās analīzes palīg līdzeklis. Šo metodi tagad var lietot kā būtisku izmeklēšanas instrumentu prenatalajā, hematoloģiskajā un solidu audzēju hromosomālajā analīzē. Mērķa DNS pēc fiksācijas un denaturēšanas ir pieejama hibridizācijai ar līdzīgi denaturētu, luminiscējošu marķētu DNS zondi, kurai ir papildu sekvenču. Pēc hibridizācijas nesaisītā un nespecifiski saistītā DNS zonde tiek aizvākta un DNS tiek kontrastēta vizualizācijai. Pēc tam, izmantojot luminiscences mikroskopiju, hibridizēto zondi var vizualizēt mērķa materiālā.

Informācija par zondi

PML (promielocitiskās leikēmijas) gēna atrašanās vieta ir 15q24.1, savukārt RARA (retinskābes alfa receptora) gēna atrašanās vieta ir 17q21.2. Translokācijas

t(15;17)(q24;q21) rezultātā rodas PML::RARA fūzijas gēns, kas ir akūtas promielocitiskās leikēmijas (APL) diagnostiska iezīme.

Šī FAST PML/RARα FISH zonde nodrošina ātru pārkārtojuma noteikšanu, un ir nepieciešama tikai stundu ilga hibridizācija.

PML::RARA fūzijas gēnu izveido t(15;17)(q24;q21) translokācija, kas konstatējama vairāk nekā 90% APL gadījumu (APL ir leikēmija, kas veido 5–8% akūtās mieloidās leikēmijas (AML) gadījumu)^{1,2}. Gadījumu apakškopā ir novērojami RARA translokāciju varianti. Zināmajos fūzijas partneros ietilpst NPM1, kura atrašanās vieta ir 5q35, NUMA1, kura atrašanās vieta ir 11q13, ZBTB16 (PLZF), kura atrašanās vieta ir 11q23, STAT5B, kura atrašanās vieta ir 17q21, PRKAR1A, kura atrašanās vieta ir 17q24, FIP1L1, kura atrašanās vieta ir 4q12, un BCOR, kura atrašanās vieta ir Xp11^{3,4,5}.

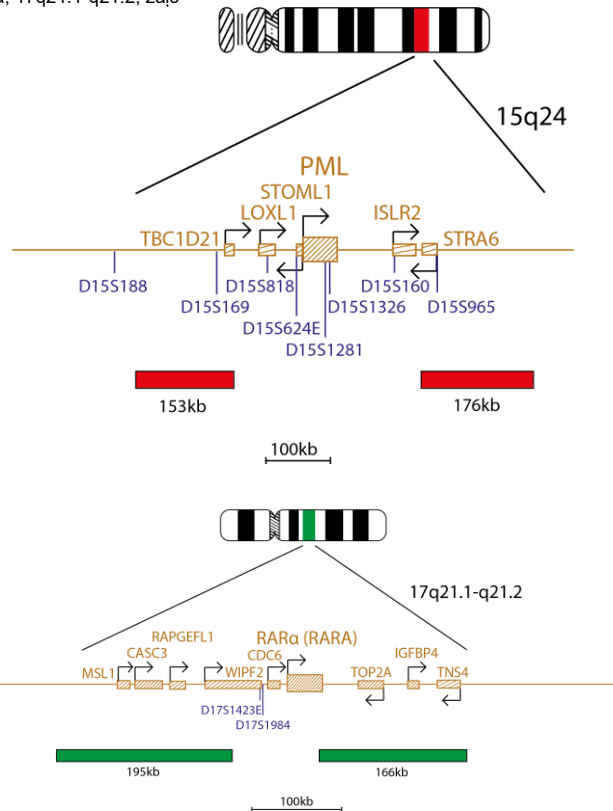
PML un RARA ir iesaistīti normālā hematopoēzē. PML pārvalda augšanas supresora un proapoptotisko aktivitāti, savukārt RARA ir transkripcijas faktors, kas mediē retinskābes iedarbību noteiktos reakcijas elementos⁶. PML::RARA fūzijas proteīns darbojas kā mainīts retinskābes receptors ar spēju pārraidīt onkogēnos signālus⁷.

Tūlītējas terapijas nodrošināšana APL pacientiem ir kritiski svarīga, jo šī diagnoze nozīmē fatālus koagulācijas traucējumus un dzīvībai bīstamu hemorāģiju. Pirms all-trans-retinskābes (ATRA) un arsēna trioksīda (ATO) iekļaušanas APL ārstēšanas protokolos šīs saslimšanas iznākuma prognoze bija nelabvēlīga, bet pēc šo terapiju ieviešanas vispārējais izdzīvošanas koeficients ir krasi paaugstinājies un izārstēti tiek gandrīz 90%⁵ pacientu. Pacientiem ar RARA translokāciju variantiem ir novērojama atšķirīga jutība pret terapiju; dažiem pacientiem ir novērojama rezistence pret terapijas protokolu^{3,5}. Tādēļ ir svarīgi diferencēt APL pacientus ar PML::RARA fūziju un pacientus ar RARA translokāciju variantiem.

Zondes specifikācija

PML, 15q24 sarkana

RARα, 17q21.1-q21.2, zaļš



PML zonžu maisījumā, kas marķēts sarkanā krāsā, ietilpst 153 kb zonde, kuras novietojums ir centromērisks attiecībā pret PML gēnu, kas nosedz marķieri D15S169, un 176 kb zonde, kuras novietojums ir telomērisks attiecībā pret PML gēnu, kas nosedz marķieri D15S965. RARα (RARA) zonžu maisījumā, kas marķēts zaļā krāsā, ietilpst 195 kb zonde, kuras novietojums ir centromērisks attiecībā pret RARα (RARA) gēnu, tostarp arī CAS3 gēnu, un 166 kb zonde, kas ietver RARα (RARA) gēna, kā arī TOP2A, IGFBP4 un TNS4 gēnu telomērisko galu.

Nodrošinātie materiāli

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

Zondes tiek nodrošinātas iepriekš sajauktā veidā hibridizācijas šķīdumā (< 65% formamīds; < 20 mg dekstrāna sulfāts; < 10% 20x citrāta fizioloģiskais šķīdums (saline-sodium citrate, SSC)) un ir gatavas lietošanai.

Kontrasta krāsviela: 150 µl flakonā (15 testi)

Kontrasta krāsviela ir DAPI luminiscences uzturēšanas šķīdums ES (0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindols) šķīdumā uz glicerīna bāzes).

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

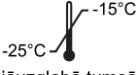
1. Lietošanai *in vitro* diagnostikā. Tikai profesionālam lietojumam laboratorijā.

2. Zondes maisījumus ietilpst formamīds, kas ir teratogēns, tādēļ nedrīkst pieļaut to izgarojumu ieelpošanu un nonākšanu saskarē ar ādu. Rīkojieties ar to piesardzīgi; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku.
3. Rīkojieties ar DAPI piesardzīgi; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku.
4. Nelietot, ja flakons(-i) ir bojāts(-i) vai flakona saturs jebkādā veidā ir bojāts.
5. Izpildiet vietējos utilizācijas noteikumus, kā arī drošības datu lapā sniegtos ieteikumus par drošu šī produkta utilizāciju. Tas attiecas arī uz bojātu testa komplekta saturu.
6. Utilizējiet visus izmantotos reagentus un jebkādus citus piesārņotus vienreizlietojamus materiālus, ievērojot procedūras attiecībā uz infekcioziem vai potenciāli infekcioziem atkritumiem. Katra laboratorija ir atbildīga par rīcību ar cietajiem un šķidrājiem atkritumiem atbilstoši to veidam un bīstamības pakāpei, kā arī par to apstrādi un utilizāciju (līdz šim un turpmāk) saskaņā ar spēkā esošajiem noteikumiem.
7. Operatoriem jāspēj atšķirt sarkano, zilo un zaļo krāsu.
8. Neievērojot norādīto protokolu un norādījumus par reagentiem, var tikt ietekmēta veikspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi/negatīvi rezultāti.
9. Zondi nedrīkst atšķaidīt vai veidot maisījumus ar citām zondēm.
10. Ja protokola priekšdenaturēšanas fāzes laikā netiek izmantoti 10 µl no zondes, var tikt ietekmēta veikspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi/negatīvi rezultāti.
11. Pirms lietošanas visi produkti ir jāapstiprina.
12. Iekšējās kontroles jāveic, testēšanas paraugos izmantojot neietekmētas šūnu populācijas.

Temperatūras definīcijas

- 20 °C/sasaldēts/saldētavā: No -25 °C līdz -15 °C
- 37 °C: +37 °C ± 1 °C
- 72 °C: +72 °C ± 1 °C
- 75 °C: +75 °C ± 1 °C
- Istabas temperatūra (Room Temperature — RT): No +15 °C līdz +25 °C

Uzglabāšana un apiešanās

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



FISH zonde, DAPI Antifade ES kontrastviela un hibridizācijas šķīdums paliek stabili visos sasaldēšanas-atkausēšanas ciklos parastas lietošanas laikā (kur viens cikls ir flakona izņemšana no saldētavas un ievietošana tajā atpakaļ) — 5 cikli 50 µl (5 testi) FISH zondes flakonam, 10 cikli 100 µl (10 testi) FISH zondes flakonam un 15 cikli 150 µl (15 testi) kontrastvielas flakonam. Pēc iespējas jāsamazina gaismas iedarbība un jāizvairās no tās, kad vien iespējams. Uzglabājiet komponentus nodrošinātajā gaismas necaurlaidīgajā konteinerā. Komponenti, kas izmantoti un uzglabāti apstākļos, kas nav norādīti marķējumā, var nedarboties, kā paredzēts, un tie var negatīvi ietekmēt analīzes rezultātus. Ir jāveic viss iespējamais, lai ierobežotu gaismas un temperatūras svārstību ietekmi.

Aprikojums un materiāli, kas ir nepieciešami, bet nav iekļauti komplektācijā

Ir jāizmanto kalibrēts aprikojums.

- Sildierīce (ar cietu sildvirsmu un precīzu temperatūras regulēšanu līdz pat 80 °C)
- Kalibrētas dažāda tilpuma mikropipetes un uzgaļi 1–200 µl diapazonā.
- Ūdens vanna ar precīzu temperatūras regulēšanu 37 °C un 72 °C
- Mikrocentrifūgas mēģenes (0,5 ml)
- Luminiscences mikroskops (sk. sadaļu Uz luminiscences mikroskopu attiecināmie ieteikumi)
- Fāžu kontrasta mikroskops
- Tīri plastmasas, keramikas vai karstumizturīga stikla Koplina trauki
- Pincete
- Kalibrēta pH mērierīce (vai pH indikatora strēmeles, ar kurām var veikt mērījumus pH 6,5–8,0 diapazonā)
- Konteiners ar mitru vidi
- Luminiscencei atbilstoša mikroskopa objektīva iegremdēšanas eļļa
- Galda centrifūga
- Mikroskopa priekšmetstikliņi
- 24x24 mm segstikliņi
- Taimeris
- 37 °C inkubators
- Gumijas līme
- Virpuļmaisītājs
- Mērcilindri
- Magnētiskais maisītājs
- Kalibrēts termometrs

Papildaprīkojums, kas nav ietverts komplektācijā

- Citoģenētiskā žāvēšanas kamera

Nepieciešamie reagenti, kas nav ietverti komplektācijā

- 20x citrāta fizioloģiskais šķīdums (saline-sodium citrate — SSC)
- 100% etanols
- Tween-20
- 1M nātrija hidroksīds (NaOH)
- 1M sālsskābe (HCl)
- Attīrīts ūdens

Uz luminiscences mikroskopu attiecināmie ieteikumi

Lai nodrošinātu optimālu vizualizāciju, izmantojiet 100 W dzīvsudraba spuldzi vai ekvivalentu gaismas avotu un eļļā iegremdējamus 60/63x vai 100x objektīvus. Šajā

zonzu komplektā izmantotie fluorofoori tiks ierosināti un izstaros tālāk norādītā garuma viļņos.

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

Nodrošiniet, lai mikroskops būtu aprīkots ar iepriekš norādītajiem viļņa garumiem atbilstošiem ierosmes un izstarošanas filtriem. Lai nodrošinātu optimālu zaļo un sarkano fluoroforu vienlaicīgu vizualizāciju, izmantojiet trīsjoslu DAPI/zaļā spektra/sarkanā spektra filtru vai divjoslu zaļā spektra/sarkanā spektra filtru. Pirms lietošanas pārbaudiet luminiscences mikroskopu, lai pārliecinātos, vai tas darbojas pareizi. Izmantojiet iegremdēšanas eļļu, kas piemērota luminiscences mikroskopijai un nodrošina zemu autoluminiscences līmeni. Izvairieties no DAPI luminiscences uzturēšanas šķīduma sajaukšanās ar mikroskopa iegremdēšanas eļļu, jo pretējā gadījumā radīsies signāla traucējumi. Rīkojieties atbilstoši ražotāja ieteikumiem attiecībā uz lampas un filtru kalpošanas ilgumu.

Paraugu sagatavošana

Šis komplekts ir paredzēts izmantošanai ar hematoloģiski iegūtām šūnu suspensijām, kas fiksētas Karnuā (3:1 metanols/etiķskābe) šķīdumā un ir sagatavotas atbilstoši laboratorijā vai iestādē spēkā esošajam vadlīnijām. Sagatavojiet gaisā nožāvētus paraugus uz mikroskopa priekšmetstikliņiem atbilstoši standarta citoģenētiskajām procedūrām. AGT *citoģenētiskās laboratorijas rokasgrāmata* ir ietverti ieteikumi par paraugu ņemšanu, kultūrēšanu, ievākšanu un priekšmetstikliņu sagatavošanu⁸.

Šķīdumu sagatavošana

Etanola šķīdumi

Atšķaidiet 100% etanolu ar attīrītu ūdeni atbilstoši tālāk norādītajām proporcijām un rūpīgi samaisiet.

- 70% etanols — 7 daļas 100% etanola un 3 daļas attīrīta ūdens
 - 85% etanols — 8,5 daļas 100% etanola un 1,5 daļas attīrīta ūdens
- Glabājiet šķīdumus līdz pat 6 mēnešiem istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

2xSSC šķīdums

Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 9 daļām attīrīta ūdens un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 nedēļu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

0,4xSSC šķīdums

Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 49 daļām attīrīta ūdens un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 nedēļu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

2xSSC, 0,05% Tween-20 šķīdums

Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 9 daļām attīrīta ūdens. Pievienojiet 5 µl Tween-20 uz 10 ml un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 nedēļu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

FAST luminiscentās in situ hibridizācijas protokols (FISH) — vienas (1) stundas hibridizācija

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

Priekšmetstikliņa sagatavošana

- Novietojiet šūnu paraugu uz mikroskopa priekšmetstikliņa, kas izgatavots no stikla. Ļaujiet nožūt. (Pēc izvēles, ja izmanto citoģenētisko žāvēšanas kameru: Lai nodrošinātu optimālu šūnu parauga sagatavošanu, kamera jādarbina, iestatot aptuveni 25 °C temperatūru un 50% mitruma. Ja citoģenētiskā žāvēšanas kamera nav pieejama, kā alternatīvu var izmantot gāzu nosūcēju).
- Iegremdējiet priekšmetstikliņu 2xSSC šķīdumā istabas temperatūrā uz 2 minūtēm, neveicot maisīšanu.
- Veiciet dehidrēšanas etanolā sērijas (70%, 85% un 100%), katru 2 minūtes istabas temperatūrā.
- Ļaujiet nožūt.

Priekšdenaturēšana

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

Denaturēšana

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

Hibridizācija

- Ievietojiet priekšmetstikliņu gaismu necaurlaidīgā konteinerā 37 °C (+/- 1 °C) temperatūrā uz vienu (1) stundu.

Skalošana pēc hibridizācijas

- 12. Izņemiet DAPI no saldētavas un ļaujiet tam sasilt līdz istabas temperatūrai.
- 13. Noņemiet segstikliņu un rūpīgi notīriet visas līmes atliekas.
- 14. Iegremdējiet priekšmetstikliņu 0,4xSSC (pH 7,0) 72 °C (+/- 1 °C) temperatūrā uz 2 minūtēm nemaisot.
- 15. Noteciniet šķidrumu no priekšmetstikliņa un iegremdējiet to 2xSSC, 0,05% Tween-20 šķīdumā istabas temperatūrā (pH 7,0) uz 30 sekundēm nemaisot.
- 16. Noteciniet šķidrumu no priekšmetstikliņa un katram paraugam pievienojiet 10 µl DAPI luminiscences uzturēšanas līdzekli.
- 17. Uzlieciet segstikliņu, likvidējiet burbuļus un ļaujiet krāsai tumsā attīstīties 10 minūtes.
- 18. Skatiet luminiscences mikroskopā (sk. **Uz luminiscences mikroskopu attiecināmie ieteikumi**).

Standarta luminiscentās in situ hibridizācijas protokols (FISH) — hibridizācija nakts laikā
(Piezīme. Nodrošiniet, lai zonde un kontrasta krāsviela pēc iespējas mazāk tiktu pakļauta laboratorijas apgaismojuma iedarbībai.)

Priekšmetstikliņa sagatavošana

- 1. Novietojiet šūnu paraugu uz mikroskopa priekšmetstikliņa, kas izgatavots no stikla. Ļaujiet nožūt. (**Pēc izvēles, ja izmanto citoģenētisko žāvēšanas kameru:** Lai nodrošinātu optimālu šūnu parauga sagatavošanu, kamera jādarbina, iestatot aptuveni 25 °C temperatūru un 50% mitruma. Ja citoģenētiskā žāvēšanas kamera nav pieejama, kā alternatīvu var izmantot gāzu nosūcēju).
- 2. Iegremdējiet priekšmetstikliņu 2xSSC šķīdumā istabas temperatūrā uz 2 minūtēm, neveicot maisīšanu.
- 3. Veiciet dehidrēšanas etanolā sērijas (70%, 85% un 100%), katru 2 minūtes istabas temperatūrā.
- 4. Ļaujiet nožūt.

Priekšdenaturēšana

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

Denaturēšana

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

Hibridizācija

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

Skalošana pēc hibridizācijas

- 12. Izņemiet DAPI no saldētavas un ļaujiet tam sasilt līdz istabas temperatūrai.
- 13. Noņemiet segstikliņu un rūpīgi notīriet visas līmes atliekas.
- 14. Iegremdējiet priekšmetstikliņu 0,4xSSC (pH 7,0) 72 °C (+/- 1 °C) temperatūrā uz 2 minūtēm nemaisot.
- 15. Noteciniet šķidrumu no priekšmetstikliņa un iegremdējiet to 2xSSC, 0,05% Tween-20 šķīdumā istabas temperatūrā (pH 7,0) uz 30 sekundēm nemaisot.
- 16. Noteciniet šķidrumu no priekšmetstikliņa un katram paraugam pievienojiet 10 µl DAPI luminiscences uzturēšanas līdzekli.
- 17. Uzlieciet segstikliņu, likvidējiet burbuļus un ļaujiet krāsai tumsā attīstīties 10 minūtes.
- 18. Skatiet luminiscences mikroskopā (sk. **Uz luminiscences mikroskopu attiecināmie ieteikumi**).

Ieteikumi attiecībā uz procedūru

- 1. Priekšmetstikliņu karsēšana vai novecošana var samazināt signāla luminiscenci.
- 2. Tādu reaģentu izmantošana, kas nav uzņēmuma Cytocell Ltd. nodrošinātie vai ieteiktie reaģenti, var nelabvēlīgi ietekmēt hibridizācijas apstākļus.
- 3. Šķīdumu, ūdens vannu un inkubatoru temperatūras mērīšanai jāizmanto kalibrēts termometrs, jo norādītās temperatūras ievērošana ir kritiski svarīga produkta optimālas veiktspējas nodrošināšanai.
- 4. Skalošanas šķīdumu koncentrācijas, pH vērtības un temperatūras vērtības ir svarīgas, jo pārāk lielas pielādes gadījumā iespējama nespecifiska sasaiste, savukārt pārāk mazas pielādes gadījumā iespējama signāla nepietiekamība.
- 5. Nepilnīga denaturēšana var izraisīt signāla nepietiekamību, savukārt pārmērīga denaturēšana arī var izraisīt nespecifisku sasaisti.
- 6. Pārmērīgas hibridizācijas dēļ iespējami papildu vai neparedzēti signāli.
- 7. Pirms testa izmantošanas diagnostikas nolūkiem lietotajiem ir jāveic protokola optimizācija atbilstoši saviem paraugiem.
- 8. Ja apstākļi nav pietiekami optimāli, iespējama nespecifiska sasaiste, kas var tikt nepareizi interpretēta kā zondes signāls.

Rezultātu interpretēšana

Sagatavotā priekšmetstikliņa ar paraugu kvalitātes novērtēšana

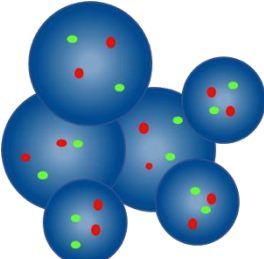
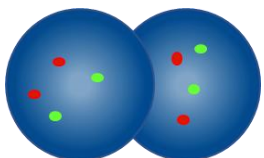
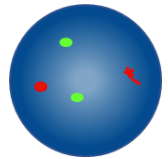
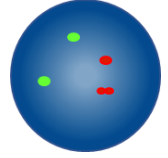
Paraugu nedrīkst analizēt tālāk norādītajos gadījumos.

- Signāli ir pārāk vāji analizēšanai atsevišķos filtros — lai veiktu analīzi, signāliem jābūt spilgtiem, labi izšķiramiem un viegli novērtējamiem.
- Ir daudz salīpušu/pārkļājošu šūnu, kas traucē veikt analīzi.

- >50% šūnu nav hibridizētas.
- Starp šūnām atrodas pārāk daudz luminiscējošo daļiņu un/vai luminiscējošs aizmiglojums, kas rada signāla traucējumus, — optimālā priekšmetstiklīnā ar paraugu fonam jābūt tumšam vai melnam un tīram.
- Šūnu kodolu robežas nav izšķiramas un nav veselas.

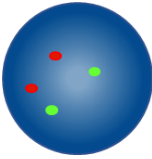
Uz analīzi attiecināmās vadlīnijas

- Katra parauga analīzi un interpretēšanu ir jāveic diviem laboratorijas speciālistiem. Visas neatbilstības ir jānovērš, novērtēšanu veicot trešajam laboratorijas speciālistam.
- Katram laboratorijas speciālistam jābūt attiecīgi kvalificētam atbilstoši spēkā esošajiem valsts līmeņa standartiem.
- Katram laboratorijas speciālistam neatkarīgi jāveic novērtēšana 100 kodoliem no katra parauga. Pirmajam laboratorijas speciālistam jāsāk analīze no priekšmetstikliņa kreisās puses, savukārt otram laboratorijas speciālistam — no priekšmetstikliņa labās puses.
- Katram laboratorijas speciālistam jādokumentē savi rezultāti atsevišķās lapās.
- Ir jāanalizē tikai veseli kodoli, nevis pārkļājošie kodoli, sablīvējušies kodoli vai kodoli, kurus sedz citoplazmatiskās atliekas vai augsta līmeņa autoluminiscence.
- Jāizvairās no zonām ar pārmērīgu citoplazmatisko atlieku apjomu vai nespecifisku hibridizāciju.
- Signāla intensitāte var būt mainīga, pat vienā kodolā. Šādos gadījumos izmantojiet atsevišķus filtrus un/vai pielāgojiet fokālo plakni.
- Ja apstākļi nav pietiekami optimāli, signāli var šķist izkļaidēti. Ja divi vienādas krāsas signāli savstarpēji saskaras vai attālums starp tiem nepārsniedz divus signāla platumus, vai arī abus signālus savieno tikko redzams pavediens, šie signāli ir uzskatāmi par vienu signālu.
- Analizējot divkrāsu sadalīšanās zondes, ja attālums starp sarkano un zaļo signālu nepārsniedz 2 signāla platumus, signāls ir uzskatāms par nepārkārtotu/saplūdušu signālu.
- Analizējot trīskrāsu sadalīšanās zondes, ja attālums starp 3 signāliem (sarkano, zaļo, zilo) nepārsniedz 2 signālu platumu, signāls ir uzskatāms par nepārkārtotu/saplūdušu signālu.
- Ja pastāv šaubas, vai šūna ir analizējama, neveiciet tās analīzi.

Uz analīzi attiecināmās vadlīnijas	
	Neskaitīt — kodoli atrodas pārāk tuvu viens otram, lai varētu noteikt to robežas
	Neskaitīt pārkļājošos kodolus — nav redzamas visas abu kodolu zonas
	Skaitīt kā divus sarkanus signālus un divus zaļus signālus — viens no abiem sarkanajiem signāliem ir difūzs
	Skaitīt kā divus sarkanus signālus un divus zaļus signālus — atstarpe vienā sarkanajā signālā ir mazāka nekā divi signāla platumi

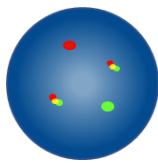
Paredzamie rezultāti

Paredzamais normālu signālu modelis



Normālā šūnā ir paredzami divi sarkani un divi zaļi signāli (2S2Z).

Paredzamie anormālo signālu modeļi



Šūnā ar t(15;17)(q24.1;q21) translokāciju paredzamais signālu modelis ir viens sarkans, viens zaļš un divas fūzijas (1S1Z2F).

Citi signālu modeļi ir iespējami aneiploīdos/nelīdzsvarotos paraugos.

Zināmie būtiskie traucējumi/traucējošās vielas

Nav zināmu būtisku traucējumu/traucējošu vielu.

Zināmā krusteniskā reakcija

Nav zināmas krusteniskās reakcijas.

Ziņošana par nopietniem negadījumiem

Pacientam/lietotājam/trešajai personai Eiropas Savienībā un valstīs ar identisku tiesisko regulējumu (Regula (ES) 2017/746 par *In vitro* diagnostikas medicīniskām ierīcēm); ja šīs ierīces lietošanas laikā vai tās lietošanas rezultātā ir noticis nopietns negadījums, lūdzu, ziņojiet par to ražotājam un valsts atbildīgajai iestādei.

Attiecībā uz nopietniem negadījumiem citās valstīs, lūdzu, ziņojiet par to ražotājam un, ja paredzēts, savas valsts atbildīgajai iestādei.

Ražotāja uzraudzības kontaktinformācija: vigilance@ogt.com

ES valstu kompetentajām iestādēm kontaktpersonu medicīnas ierīču kontroles jautājumos saraksts ir atrodams šajā vietnē:

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

Specifiskās veikspējas raksturlielumi

Analītiskais specifiskums

Analītiskais specifiskums tiek definēts kā to signālu procentuālā vērtība, kas hibridizējas uz pareizo lokusu un nekādu citu vietu. Katrā no divdesmit metafāzes šūnām katrā no pieciem paraugiem tika analizēti četri hromosomu lokusi, dodot 400 datu punktus. Katras hibridizētās zondes atrašanās vieta ir kartēta, un ir ierakstīts metafāzes hromosomu luminiscētās in situ hibridizācijas (Fluorescence in situ hybridisation — FISH) signālu skaits, kas hibridizējās uz pareizo lokusu.

Katras komplekta zondes analītiskais specifiskums tika aprēķināts kā metafāzes hromosomu FISH signālu skaits, kas hibridizējās uz pareizo lokusu, dalīts ar kopējo metafāzes hromosomu FISH signālu kopējo skaitu, šis rezultāts tika sareizināts ar 100, izteikts kā procentuālā vērtība un dots ar 95% ticamības intervālu.

1. tabula Zondes FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe analītiskais specifiskums

Mērķis	Hibridizēto metafāzes hromosomu skaits	Pareizi hibridizēto lokusu skaits	Analītiskais specifiskums	95% ticamības intervāls
15q24.1	200	200	100%	98,12%–100%
17q21.1–17q21.2	200	200	100%	98,12%–100%

Analītiskais jutīgums

Analītiskais jutīgums tiek izteikts kā novērtējamo interfāzes šūnu ar paredzamu normālo signālu modeli procentuālā vērtība. Katrai no 25 fiksētām kaula smadzeņu šūnu suspensijām un katrai no 25 fiksētām perifēro asiņu šūnu suspensijām, izmantojot ātrās hibridizācijas metodi, un 25 fiksētām kaula smadzeņu šūnu suspensijām, izmantojot hibridizāciju līdz nākamajai dienai, tika analizētas vismaz 100 starpfāzes šūnas. Rezultātā perifērajiem asins paraugiem tika iegūti vismaz 2500 kodoli, bet kaulu smadzeņu paraugiem — 5000 kodoli. Jutīguma dati tika analizēti, pamatojoties uz šūnu procentuālo vērtību, kas parāda parastu paredzamo signālu modeli un tiek izteikti kā procentuālā vērtība ar 95% ticamības intervālu.

2. tabula Zondes FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe analītiskais jutīgums

Parauga tips	Jutīguma kritēriji	Jutīguma rezultāts
Kaula smadzeņu parauga ātrā hibridizācija	>95%	98,80% (97,96–99,63%)
Kaula smadzeņu parauga hibridizācija līdz nākamajai dienai	>95%	98,52% (97,76–99,28%)
Perifēro asiņu parauga ātrā hibridizācija	>95%	99,31% (98,66–100,00%)

Normalitātes robežvērtību raksturojums

Normālo robežvērtību definē kā to šūnu procentuālo daļu, kurām ir kļūdaini pozitīvs signāla modelis, pie kura indivīda stāvoklis tiek uzskatīts par normālu un neatbilst klīniskajai diagnozei. Katrai no 25 fiksētām kaula smadzeņu šūnu suspensijām un katrai no 25 fiksētām perifēro asiņu šūnu suspensijām, izmantojot ātrās hibridizācijas metodi, un 25 fiksētām kaula smadzeņu šūnu suspensijām, izmantojot hibridizāciju līdz nākamajai dienai, tika analizētas vismaz 100 starpfāzes šūnas. Rezultātā perifērajiem asins paraugiem tika iegūti vismaz 2500 kodoli, bet kaulu smadzeņu paraugiem — 5000 kodoli.

Robežvērtība tika noteikta, programmā MS Excel izmantojot β inversijas (BETAINV) funkciju. Tā tika aprēķināta kā starpfāžu šūnu procentuālā vērtība, kas

uzrāda aplami pozitīvu signālu modeli, izmantojot binomiālās izplatības vienpusējās 95% ticamības intervāla augšējo robežu normalitātes pacienta paraugā.

3. tabula Normalitātes robežvērtību raksturojums zondei FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe

Parauga tips	Robežvērtības rezultāts
Kaula smadzenes — ātrā hibridizācija	2,71%
Kaula smadzenes — hibridizācija līdz nākamajai dienai	3,44%
Perifērās asinis — ātrā hibridizācija	4,36%

Laboratorijām jāveic robežvērtību verifikācija, izmantojot savus datus.^{9,10}

Precizitāte

Šī izstrādājuma precizitāte ir izmērīta dienas precizitātes (no parauga uz paraugu), starpdienu precizitātes (no dienas uz dienu) un vienas vietas starppartiju precizitātes (no partijas uz partiju) izteiksmē.

Lai novērtētu šā produkta precizitāti, izmantoja divus hibridizācijas metodes paraugus: negatīvu kaulu smadzeņu paraugu un nedaudz pozitīvu kaulu smadzeņu paraugu. Nedaudz pozitīvais kaulu smadzeņu paraugs (2–4x produkta robežvērtība) tika izveidots, parastajam kaulu smadzeņu paraugam pievienojot pārbaudīti pozitīvu kaulu smadzeņu paraugu, un to izmantoja, lai novērtētu produktu noteikto robežvērtību diapazonā.

Lai noteiktu starpdienu un dienas precizitāti, paraugi tika izvērtēti desmit neseģu datumu laikā, un, lai noteiktu precizitāti no partijas uz partiju, trīs produkta partijas tika novērtētas ar vienu un tā paša parauga trīs atkārtojumiem. Rezultāti tika pasniegti kā vispārēja konverģence ar prognozētu negatīvo klasi (negatīviem paraugiem).

4. tabula Reproducējamība un precizitāte zondei FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe

Mainīgais	Parauga tips	Konverģence
Dienas (paraugu līmeni) un starpdienu (dienas līmeni) reproducējamība	Kaula smadzenes, negatīvs	100%
	Kaula smadzenes, nedaudz pozitīvs	100%
Starpdaru reproducējamība	Kaula smadzenes, negatīvs	100%
	Kaula smadzenes, nedaudz pozitīvs	100%

Klīniskā veikspēja

Lai nodrošinātu to, ka produkts konstatē paredzētos pārkārtos, klīniskā veikspēja tika noteikta vienā pētījumā produktam paredzētās populācijas reprezentējošiem paraugiem: atlikušais metanolā/etiķskābē fiksētais, hematoloģiski iegūtais materiāls. Paraugu apjoms bija 136 paraugi, tostarp 43 pozitīvi paraugi un 93 negatīvi paraugi. Rezultātus salīdzināja ar zināmo parauga statusu, kas noteikts ar salīdzinājuma metodi. Tika konstatēts, ka rezultātu atbilstība/neatbilstība atbilst šā pētījuma akceptēšanas kritērijiem.

Šo testu rezultāti tika analizēti, lai nodrošinātu klīnisku jutīgumu, klīnisku specifiskumu un kļūdaini pozitīvo rezultātu rādītāja (false positive rate — FPR) vērtības pozitīviem signāliem, izmantojot viendimensijas pieeju.

5. tabula Klīniskā veikspēja zondei FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe

Mainīgais	Rezultāts
Klīniskais jutīgums (pareizi pozitīvo rezultātu rādītājs (true positive rate — TPR))	98,93%
Klīniskais specifiskums (pareizi negatīvo rezultātu rādītājs (true negative rate — TNR))	99,58%
Kļūdaini pozitīvo rezultātu rādītājs (false positive rate — FPR) = 1 – specifiskums	0,42%

Drošuma un veikspējas kopsavilkums (Summary of Safety and Performance — SSP)

SSP jābūt publiski pieejamam, izmantojot Eiropas medicīnisko ierīču datubāzi (Eudamed), kur tas ir saistīts ar pamata UDI-DI.

Eudamed URL: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Pamata UDI-DI: 50558449LPH064JR

Ja Eudamed nedarbojas pilnībā, SSP ir publiski pieejams pēc pieprasījuma pa e-pastu SSP@ogt.com.

Papildinformācija

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

Tālrunis: +44 (0)1223 294048

E-pasts: techsupport@cytozell.com

Timeklis: www.ogt.com

Atsauces

1. Swerdlow, *et al* (eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017

2. Campbell, *et al*. Biomed Research International. 2013;2013:1-5.

3. Creutzig, *et al*. Blood. 2012;120(16):3187-3205.

4. Zhang, *et al*. Blood Reviews. 2015;29(2):101-125.

5. Tomita, *et al*. International Journal of Haematology. 2013;97(6):717-725.

6. Grimwade, *et al*. Blood. 2000;96(4):1297-1308.

7. Lo-Coco, Hasa. Best practice & research. Clinical haematology. 2014;27(1):3-9.

8. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds). (2017) The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.

9. 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.

10. Wiktor AE, *et al*. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16–23.

Simbolu glosārijs

EN ISO 15223-1:2021 — “Medicīniskās ierīces — simboli, kas jāizmanto kopā ar ražotāja nodrošināto informāciju — 1. daļa. Vispārīgas prasības (© International Organization for Standardization)		
Simbols	Nosaukums	Atsauces numurs(-i)
	Iv: Ražotājs	5.1.1
	Iv: Pilnvarotais pārstāvis Eiropas Kopienā/Eiropas Savienībā	5.1.2
	Iv: Derīguma termiņš	5.1.4
	Iv: Partijas kods	5.1.5
	Iv: Kataloga numurs	5.1.6
	Iv: Sargāt no saules gaismas	5.3.2
	Iv: Temperatūras ierobežojums	5.3.7
	Iv: Skatīt lietošanas instrukciju	5.4.3
	Iv: Skatīt elektronisko lietošanas instrukciju	5.4.3
	Iv: Uzmanību!	5.4.4
	Iv: <i>In vitro</i> diagnostikas medicīniskā ierīce	5.5.1
	Iv: Saturs ir pietiekams <n> testiem	5.5.5
	Iv: Unikālais ierīces identifikators	5.7.10
EDMA simboli IVD reaģentiem un komponentiem, 2009. gada oktobra redakcija		
Simbols	Nosaukums	Atsauces numurs(-i)
	Iv: Sastāvs (vai satur)	N/p

Patenti un preču zīmes

CytoCell ir reģistrēta CytoCell Limited preču zīme.



Cytocell Limited
Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
APVIENOTĀ KARALISTE

Tālr.: +44 (0)1223 294048

Fakss: +44 (0)1223 294986
E-pasts: probes@cytoCell.com
Tīmeklī: www.oqt.com



Sysmex Europe SE
Bornbarch 1
22848 Norderstedt
VÄCLJA

Tālr.: +49 40 527260
Tīmeklī: www.sismex-europe.com

Lietošanas instrukcijas variantu vēsture
V001.00 2023-01-25: Jauna lietošanas instrukcija atbilstoši Regulai (ES) 2017/746
V002 2025-08-29: UKCA zīmes noņemšana