A Sysmex Group Company

CytoCell

Kasutusjuhend

REF: CE-LPH 064-S / CE-LPH 064

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

CE IVD
2797

AINULT ERIALASEKS KASUTAMISEKS

ogt.com/IFU

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

Kasutusotstarve
Sond CytoCell® *FAST* PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe on kvalitatiivne, mitteautomaatne, fluorestsents *in situ* hübridisatsiooni (FISH) uuring, mida kasutatakse 15. kromosoomi 15q24 piirkonna ja 17. kromosoomi 17q21.1-q21.2 piirkonna vaheliste kromosomaalsete ümberkorralduste tuvastamiseks Carnoy lahuses (3:1 metanool/atseethape) fikseeritud hematoloogiliselt tuletatud rakususpensioonides, mis pärinevad kinnitatud või kahtlustatud ägeda müeloidse leukeemia (AML) patsientidelt.

Näidustus
See seade on loodud täiendusena teistele kliinilistele ja histopatoloogilistele uuringutele tunnustatud diagnostilistes ja kliinilistes raviteedes, kus teadmised *PML::RARA* translokatsiooni oleku kohta on kliinilise ravi seisukohalt olulised.

Piirangud
Seade on loodud tuvastama murdepunktidega ümberkorraldusi sondikomplekti punase ja rohelise klooniga kaetud piirkonnas, mis sisaldab *PML* ja *RARA* piirkondi. Piirkonnast väljajäävaid murdepunkte või alternatiivseid ümberkorralduste variante, mis jäävad selle piirkonna sisse, ei pruugita selle seadmega tuvastada.
See seade pole ette nähtud kasutamiseks iseseisva diagnostilise vahendina, diagnostilise abivahendina, prenataalseks analüüsimiseks, populatsioonipõhiseks skriininguks, patsiendilähedaseks analüüsimiseks või iseendal analüüsimiseks.
Seda seadet ei ole valideeritud kasutamiseks muude proovitüüpide ega haigustüüpide korral ega muuks kasutusotstarbeks, peale selle, mis on kasutusotstarbes täpsustatud.
Seade on ette nähtud muude laboratoorsete analüüside täiendamiseks ja ravi ei tohiks alustada, põhinedes vaid FISH-i tulemustel.
FISH-i tulemusi peab tõlgendama ja nendest teavitama vastava kvalifikatsiooniga personal vastavalt erialastele kutsestandarditele ja võttes arvesse muid asjakohaseid analüüsitulemusi ning muud kliinilist ja diagnostilist teavet.
See seade on ette nähtud vaid erialaseks laboratoorseks kasutamiseks.
Protokolli järgimata jätmine võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/negatiivseid tulemusi.

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

Sondi teave
PML (*promüelotsüütne leukeemia*) geen on asukohas 15q24.1 ja *RARA* (*retinoolhappe retseptor alfa*) geen on asukohas 17q21.2. Translokatsioon t(15;17)(q24;q21) põhjustab *PML::RARA* fusioonigeeni ja see on ägeda promüelotsüütse leukeemia (APL) diagnostiline tunnus.

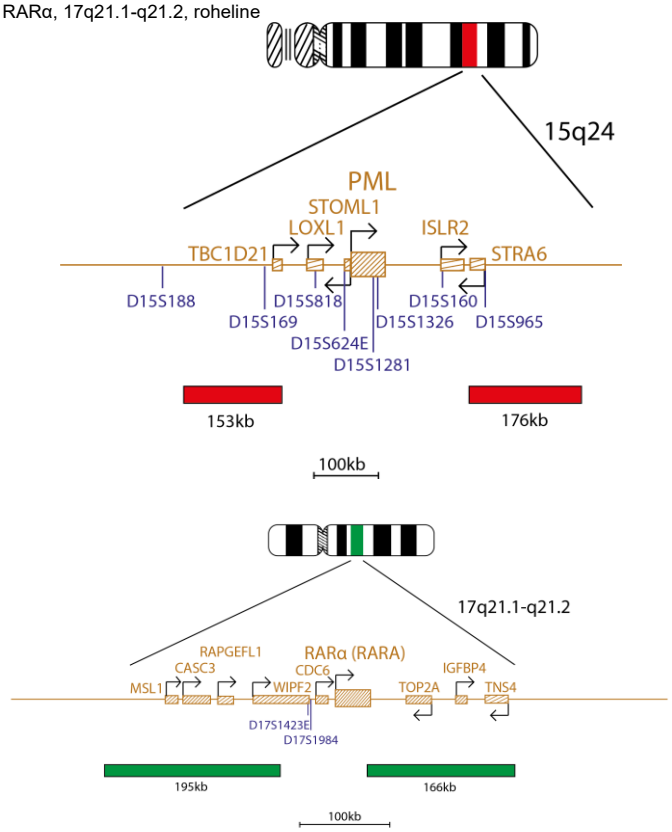
FAST PML/RARα FISH-i sond võimaldab ümberkorraldusi kiiresti tuvastada, nii et hübridisatsiooniks kulub ainult üks tund.

PML::RARA fusioonigeen tekib t(15;17)(q24;q21) translokatsiooniga, mida esineb üle 90% APL-i juhtudest, mis on leukeemia liik, mis hõlmab 5–8% ägeda müeloidse leukeemia juhtudest (AML)[1,2]. Juhtumite alamrühmas on leitud ka variantseid *RARA* translokatsioone. Tuntud fusioonipartnerid on *NPM1* at 5q35, *NUMA1* asukohas 11q13, *ZBTB16* (*PLZF*) asukohas 11q23, *STAT5B* asukohas 17q21, *PRKAR1A* asukohas 17q24, *FIP1L1* asukohas 4q12 ja *BCOR* asukohas Xp11[3,4,5].

PML ja *RARA* mõlemad on seotud normaalse hematopoeesiga. *PML*-l on kasvusupressor ja proapoptotootiline aktiivsus, kusjuures *RARA* on transkriptsioonifaktor, mis vahendab retinoolhappe toimet kindlate vastuelementide juures[6]. PML::RARA fusioonivalk käitub muutunud retinoolhappe retseptorina, mis on võimeline edastama onkogeenseid signaale[7].

APL-iga patsientide puhul on kohene ravi kriitilise tähtsusega seoses diagnoosi fataalsete koagulatsioonihäirete ja eluohtlike verejooksudega. Haigusel oli enne all-trans-retinoolhappe (ATRA) ja arseentrioksiidi (ATO) lisamist APL-i raviprotokollidesse halb prognoos, kuid pärast uute ravimite lisamist on üldine elulemus oluliselt paranenud, nii et 90%[5] patsientidest tervistuvad. Variantsete *RARA* translokatsioonidega patsientide ravitundlikkus on varieeruv ja mõne patsiendi puhul esineb raviprotokollide suhtes resistentsus[3,5]. Seetõttu on oluline eristada *PML::RARA* fusiooniga APL-iga patsiente ja variantsete *RARA* translokatsioonidega patsiente.

Sondi spetsifikatsioon
PML, 15q24, punane
RARα, 17q21.1-q21.2, roheline



Punasega märgistatud PML sondisegu hõlmab *PML* geeni suhtes tsentromeerset 153 kb sondi, mis hõlmab markerit D15S169, ja *PML* geeni suhtes telomeerset 176 kb sondi, mis hõlmab markerit D15S965. Rohelisega märgistatud *RARα* (*RARA*) sondisegu hõlmab *RARα* (*RARA*) geeni suhtes tsentromeerset 195 kb sondi, sh *CASC3* geen, ja 166 kb sondi, mis hõlmab *RARα* (*RARA*) geeni telomeerset otsa ja ka *TOP2A*, *IGFBP4* ja *TNS4* geene.

Tarnitavad materjalid
Sond: 50 µl viaali kohta (5 analüüsi), 100 µl viaali kohta (10 analüüsi)
Sondid tarnitakse hübridiseerimislahusega eelsegatuna (< 65% formamiid; < 20mg dekstraansulfaat; < 10% 20-kordne naatriumtsitraadi soolalahus (saline-sodium citrate, SSC)) ja on valmis kasutamiseks.

Vastandvärv: 150 µl viaali kohta (15 analüüsi)
Vastandvärv on pleekimisvastane DAPI ES (sisaldus 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenüülindool) glütserooli põhises kinnituskeskkonnas).

Hoiatused ja ettevaatusabinõud

1. Kasutamiseks *in vitro* diagnostikas. Ette nähtud vaid erialaseks laboratoorseks kasutamiseks.
2. Sondi segud sisaldavad formamiidi, mis on teratogeenne; ärge hingake sisse aure ning vältige kontakti nahaga. Käsitsege ettevaatlikult; kasutage kindaid ja laborikitlit.
3. Käsitsege DAPI-t ettevaatlikult; kasutage kindaid ja laborikitlit.
4. Ärge kasutage, kui viaal(id) on kahjustatud või kui viaali sisu on mistahes viisil rikutud.
5. Tootejäätmete ohutuks käitlemiseks järgige kohalikke jäätmekäitluseeskirju ja kemikaali ohutuskaardil toodud soovitusi. See kehtib ka kahjustatud analüüsikomplekti sisule.
6. Vabanege kõigist kasutatud reaktiividest ja muudest saastunud ühekordseks kasutuseks ette nähtud vahenditest nakkusohtlike või potentsiaalselt nakkusohtlike jäätmete käitlemise eeskirjade kohaselt. Iga labor peab ise vedelaid ja tahkeid jäätmeid käitlema vastavalt nende loomusele ja ohtlikkuse tasemele ning tagama nende käitlemise ja kõrvaldamise (või laskma need käidelda ja kõrvaldada) vastavalt kehtivatele eeskirjadele.
7. Kasutajad peavad olema suutelised eristama punast, sinist ja rohelist värvi.
8. Esitatud protokolli ja reaktiivide järgimata jätmine võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.
9. Sondi ei tohiks lahjendada ega segada teiste sondidega.
10. Kui denatureerimise eeletapis ei kasutata 10 µl sondi, nagu on protokollis ette nähtud, siis võib see mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.
11. Kõiki tooteid tuleb enne kasutamist valideerida.
12. Sisemised kontrollid tuleb läbi viia kontrollproovidega, mis sisaldavad mõjutamata rakupopulatsioone.

Temperatuuri määratlused

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

Säilitamine ja käsitsemine

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

FISH-i sond, pleekimisvastane DAPI ES vastandvärv ja hübridiseerimislahus säilitavad stabiilsuse normaalse kasutamise ajal esinevate sulatamise ja külmutamise tsüklite kestel (kus üks tsükkel kestab sondi eemaldamisest külmikust kuni sinna tagasipanekuni)–5 tsüklit 50 µl (5 analüüsi) FISH-i sondi viaali puhul, 10 tsüklit 100 µl (10 analüüsi) FISH-i sondi viaali puhul ja 15 tsüklit 150 µl (15 analüüsi) vastandvärvi viaali puhul. Kokkupuudet valgusega tuleb piirata ja võimaluse korral alati vältida. Hoidke komponente kaasas olevas valguskindlas mahutis. Siltidel märgitutest erinevatel tingimustel säilitatud ja kasutatud komponendid ei pruugi oodatud viisil toimida ja võivad mõjutada analüüsitulemusi. Piirake iga hinna eest kokkupuudet valgusega ja temperatuurimuutustega.

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

Kasutada tuleb kalibreeritud seadmeid.

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

Valikulised seadmed, mida ei tarnita

1. Tsütogeneetiline kuivatuskamber

Vajalikud reaktiivid, mida ei tarnita

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

Fluorestsentsmikroskoobi soovitused

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

Fluorofoor	Eksitatsioon$_{max}$ [nm]	Emissioon$_{max}$ [nm]
Roheline	495	521
Punane	596	615

Veenduge, et asjakohased eksitatsiooni- ja emissioonifiltrid, mis hõlmavad eespool esitatud lainepikkusi, on mikroskoopi paigaldatud. Kasutage kolme spektri läbilaskevõimega DAPI/rohelise spektri/punase spektri filtrit või kahe spektri läbilaskevõimega rohelise spektri/punase spektri filtrit rohelise ja punase fluorofoori samaaegseks optimaalseks visualiseerimiseks.
Kontrollige enne kasutamist fluorestsentsmikroskoopi, et veenduda selle korrasolekus. Kasutage immersioonõli, mis on fluorestsentsmikroskoopiaks sobiv ja on madala autofluorestsentsiga. Vältige pleekimisvastase DAPI segamist immersioonõliga, kuna see segab signaali. Järgige tootja soovitusi lambi tööea ja filtrite vanuse kohta.

Proovi ettevalmistamine

Komplekt on loodud kasutamiseks Carnoy lahuses (3:1 metanool/atseethape) fikseeritud hematoloogiliselt tuletatud rakususpensioonidega, mis on ette valmistatud vastavalt labori või asutuse eeskirjadele. Valmistage ette õhu käes kuivatatud mikroskoobi alusklaasid vastavalt tsütogeneetika standardprotseduuridele. AGT *Tsütogeneetika laborijuhend* sisaldab soovitusi proovi kogumise, kultuuri istutamise, kogumise ja slaidi tegemise kohta[8].

Lahuse ettevalmistamine

Etanooli lahused

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

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

Säilitage lahuseid kuni 6 kuud toatemperatuuril õhukindlas nõus.

2-kordne SSC lahus

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

0,4-kordne SSC lahus

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

2-kordne SSC, 0,05% Tween-20 lahus

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

***FAST* FISH-i protokoll – üks (1) tund hübridiseerimist**

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

Slaidi ettevalmistamine

1. Tilgutage rakuproov mikroskoobi klaasist alusklaasile. Laske kuivada. (**Tsütogeneetilise kuivatuskambri kasutamisel võite toimida järgmiselt**: optimaalseks slaidi valmistamiseks tuleks kambrit kasutada temperatuuril ligikaudu 25 °C ja õhuniiskusel 50%. Kui tsütogeneetiline kuivatuskamber ei ole kättesaadav, kasutage alternatiivina tõmbekappi).
2. Kastke slaidid toatemperatuuril 2 minutiks 2-kordsesse SSC lahusesse ilma segamata.
3. Dehüdrateerige etanoolilahuste seerias (70%, 85% ja 100%), igas 2 minutit toatemperatuuril.
4. Laske kuivada.

Enne denaturatsiooni

5. Eemaldage sond külmikust ja laske sel soojeneda toatemperatuurile. Tsentrifuugige katsuteid lühidalt enne kasutamist.
6. Veenduge, et sondi lahus on ühtlaselt segunenud, kasutades pipetti.
7. Eemaldage 10 µl sondi analüüsi kohta ja viige see mikrotsentrifuugi katsutisse üle. Tagastage ülejäänud sond kiiresti külmikusse.
8. Asetage sond ja proovislaid 5 minutiks kuumutusplaadile eelsoojenema temperatuurile 37 °C (+/-1 °C).
9. Tilgutage 10 µl sondisegu rakuproovile ja asetage ettevaatlikult katteklaas. Lisage katteklaasi liim ja laske liimil täielikult kuivada.

Denaturatsioon

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

Hübridisatsioon

11. Asetage slaid niiskesse valguskindlasse kambrisse üheks (1) tunniks temperatuurile 37 °C (+/–1 °C).

Hübridisatsioonijärgsed pesud

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

Harilik FISH-i protokoll – üleöö hübridiseerimine
(Märkus. Veenduge, et sondi ja vastandvärvi kokkupuude labori valgustusega oleks kogu aeg piiratud).

Slaidi ettevalmistamine

1. Tilgutage rakuproov mikroskoobi klaasist alusklaasile. Laske kuivada. (**Tsütogeneetilise kuivatuskambri kasutamisel võite toimida järgmiselt**: optimaalseks slaidi valmistamiseks tuleks kambrit kasutada temperatuuril ligikaudu 25 °C ja õhuniiskusel 50%. Kui tsütogeneetiline kuivatuskamber ei ole kättesaadav, kasutage alternatiivina tõmbekappi).
2. Kastke slaidid toatemperatuuril 2 minutiks 2-kordsesse SSC lahusesse ilma segamata.
3. Dehüdrateerige etanoolilahuste seerias (70%, 85% ja 100%), igas 2 minutit toatemperatuuril.
4. Laske kuivada.

Enne denaturatsiooni

5. Eemaldage sond külmikust ja laske sel soojeneda toatemperatuurile. Tsentrifuugige katsuteid lühidalt enne kasutamist.
6. Veenduge, et sondi lahus on ühtlaselt segunenud, kasutades pipetti.
7. Eemaldage 10 µl sondi analüüsi kohta ja viige see mikrotsentrifuugi katsutisse üle. Tagastage ülejäänud sond kiiresti külmikusse.
8. Asetage sond ja proovislaid 5 minutiks kuumutusplaadile eelsoojenema temperatuurile 37 °C (+/-1 °C).
9. Tilgutage 10 µl sondisegu rakuproovile ja asetage ettevaatlikult katteklaas. Lisage katteklaasi liim ja laske liimil täielikult kuivada.

Denaturatsioon

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

Hübridisatsioon

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

Hübridisatsioonijärgsed pesud

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

Protseduuri soovitused

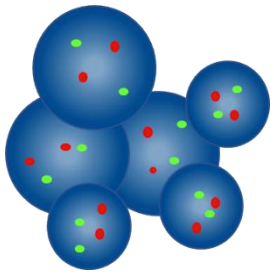
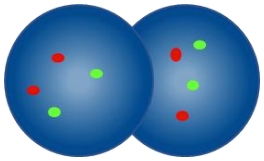
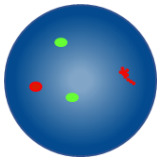
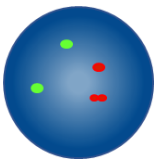
1. Slaidide keetmine või aegumine võib fluorestsentssignaali nõrgendada.
2. Cytocell Ltd poolt toodetud või soovitatud reaktiivide asemel muude reaktiivide kasutamine võib ebasoodsalt mõjutada hübridiseerimistingimusi.
3. Kasutage lahuste, vesivannide ja inkubaatorite temperatuuri mõõtmisel kalibreeritud termomeetrit, sest need temperatuurid on toote optimaalseks toimimiseks kriitilise tähtsusega.
4. Pesukontsentratsioonid, pH ja temperatuurid on olulised, kuna vähene rangus võib põhjustada sondi ebaspetsiifilist sidumist ja liiga suur rangus võib põhjustada signaali puudumist.
5. Mittetäielik denatureerimine võib põhjustada signaali puudumist ja üleliigne denatureerimine võib samuti põhjustada ebaspetsiifilist seondumist.
6. Üleliigne hübridiseerimine võib põhjustada täiendavaid või ootamatuid signaale.
7. Kasutajad peaksid enne analüüsi kasutamist diagnostilisel eesmärgil protokolli oma proovidega optimeerima.
8. Suboptimaalsed tingimused võivad põhjustada ebaspetsiifilist seondumist, mida võidakse ekslikult sondi signaalina tõlgendada.

Tulemuste tõlgendamine
Slaidi kvaliteedi hindamine
Slaidi ei tohiks analüüsida, kui

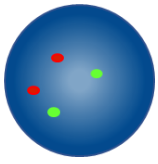
- signaalid on ühe filtriga analüüsimiseks liiga nõrgad–analüüsi jätkamiseks peaksid signaalid olema eredad, selged ja lihtsalt hinnatavad;
- liiga palju kokkukleepunud/kattuvaid rakke segavad analüüsimist;
- üle 50% rakkudest pole hübridiseeritud;
- rakkude vahel on üleliigsed fluorestsentsosakesed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

Analüüsi eeskirjad

- Igat proovi peaks analüüsima ja tõlgendama kaks analüütikut. Kõik lahknevused tuleks lahendada kolmanda analüütiku hinnanguga.
- Analüütikud peaks olema riiklikult tunnustatud standardite kohase väljaõppega.
- Iga analüütik peaks hindama eraldi 100 tuuma iga proovi kohta. Esimene analüütik peaks alustama slaidi vasakult küljelt ja teine analüütik paremalt küljelt.
- Iga analüütik peaks oma tulemused üles märkima eraldi andmekandjale.
- Analüüsige vaid terviklikke tuumi, mitte kattuvaid või kokkukleepunud või tsütoplasma jääkidega kaetud ega autofluorestseerivaid tuumi.
- Vältige alasid, kus esineb liigseid tsütoplasma jääke või ebaspetsiifilist hübridiseerimist.
- Signaali tugevus võib vahelduda, isegi ühe tuuma piires. Sellistel juhtudel kasutage üksikfiltreid ja/või kohandage fokaaltasandit.
- Suboptimaalsete tingimuste korral võivad signaalid hajuda. Kui kaks sama värvi signaali puutuvad kokku või nendevaheline kaugus ei ole suurem kui kaks signaalipikkust või signaale ühendab ähmane niit, lugege signaalid üheks.
- Kui kahevärvilise lahutatavate sondide analüüsimisel ei ole punase ja rohelise signaali vahel tühimik suurem kui 2 signaalipikkust, lugege see ümber korraldamata / sulandunud signaaliks
- Kui kolmevärviliste lahutatavate sondide analüüsimisel ei ole mistahes 3 signaali (punane, roheline ja sinine) vahel tühimik suurem kui 2 signaalipikkust, lugege see ümber korraldamata / sulandunud signaaliks.
- Kui kahtlete, kas proov on analüüsimiseks sobiv, siis ärge analüüsige seda.

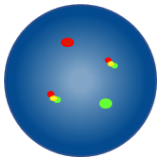
Analüüsi eeskirjad	
	Mitte lugeda, kui tuumad on piiride määramiseks üksteisele liiga lähedal
	Mitte lugeda kattuvaid tuumasid, sest mõlema tuumi kõik alasid ei ole näha
	Lugeda kahe punase signaalina ja kahe rohelise signaalina, kui üks kahest punasest signaalist on difuusne
	Lugeda kahe punase signaalina ja kahe rohelise signaalina, kui ühe punase signaali tühimik on kahest signaalipikkusest väiksem

Eeldatavad tulemused
Eeldatav normaalne signaalimuster



Normaalse raku eeldatav tulemus on kaks punast ja kaks rohelist signaali (2P2R).

Eeldatavad ebanormaalsed signaalimustrid



Translokatsiooniga t(15;17)(q24.1;q21) rakus on eeldatav signaalimuster üks punane, üks roheline ja kaks fusioonisignaali (1P1R2F).

Aneuploidsete/tasakaalustamata proovides võivad esineda teised signaalimustrid.

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

Teadaolev ristreaktiivsus
Teadaolev ristreaktiivsus puudub.

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

Spetsiifilised toimivuskarakteristikud
Analüütiline spetsiifilisus
Analüütiline spetsiifilisus on määratletud kui üksnes õige lookusega hübridiseeritud signaalide protsentarv. Analüüsiti nelja kromosomaalset lookust kõigi viie proovi kõigis kahekümnes metafaasi rakus, saades 400 andmepunkti. Iga hübridiseeritud sondi asukoht kaardistati ja õige lookusega hübridiseeritud metafaasi kromosoomi FISH-i signaalide arv salvestati.

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

Tabel 1. Sondi *FAST* PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe analüütiline spetsiifilisus

Sihtmärk	Hübridiseeritud metafaasi kromosoomide arv	Õigesti hübridiseeritud lookuste arv	Analüütiline spetsiifilisus	95% usaldusvahemik
15q24.1	200	200	100%	98,12–100%
17q21.1–17q21.2	200	200	100%	98,12–100%

Analüütiline tundlikkus
Analüütiline tundlikkus on hinnatavate interfaasi rakkude protsent eeldatava normaalse signaalimustri suhtes. Analüüsiti vähemalt 100 interfaasi rakku iga 25 fikseeritud luuüdirakususpensiooni ja 25 fikseeritud perifeerse vere rakususpensiooni kohta, kasutades kiiret hübridisatsiooni meetodit, ja 25 fikseeritud luuüdirakususpensiooni kohta, kasutades üleöö hübridisatsiooni meetodit. Tulemuseks saadi vähemalt 2500 tuuma perifeerse vere proovide jaoks ja 5000 tuuma luuüdiproovide jaoks. Tundlikkuse andmeid analüüsiti normaalse eeldatava signaalimustriga rakkude protsendi alusel ja väljendati protsendina 95% usaldusvahemikuga.

Tabel 2. Sondi *FAST* PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe analüütiline tundlikkus

Proovi tüüp	Tundlikkuse kriteeriumid	Tundlikkuse tulemus
Luuüdi kiire hübridisatsioon	>95%	98,80% (97,96–99,63%)
Luuüdi üleöö hübridisatsioon	>95%	98,52% (97,76–99,28%)
Perifeerse vere kiire hübridisatsioon	>95%	99,31% (98,66–100,00%)

Normaalse väljaarvamise piirväärtuste kirjeldus
Normaalne väljaarvamine määratletakse nende rakkude protsendina, mis näitavad valepositiivset signaalimustrit, mille korral isik loetaks normaalseks ja kliinilisele diagnoosile mittevastavaks. Analüüsiti vähemalt 100 interfaasi rakku iga 25 fikseeritud luuüdirakususpensiooni ja 25 fikseeritud perifeerse vere rakususpensiooni kohta, kasutades kiiret hübridisatsiooni meetodit, ja 25 fikseeritud luuüdirakususpensiooni kohta, kasutades üleöö hübridisatsiooni meetodit. Tulemuseks saadi vähemalt 2500 tuuma perifeerse vere proovide jaoks ja 5000 tuuma luuüdiproovide jaoks.

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

Tabel 3. Sondi *FAST* PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe normaalse väljaarvamise piirväärtuste kirjeldus

Proovi tüüp	Väljaarvamise tulemus
Luuüdi – kiire hübridisatsioon	2,71%
Luuüdi – üleöö hübridisatsioon	3,44%
Perifeerne veri – kiire hübridisatsioon	4,36%

Laborid peavad oma andmete põhjal väljaarvamise piirväärtused kinnitama[9,10].

Täpsus
Selle toote täpsus on mõõdetud päevasisese täpsusena (proov-prooviga), päevadevahelise täpsusena (päev-päevaga) ja ühe asutuse partiidevahelise täpsusena (partii-partiiga).

Toote täpsuse hindamisel kasutati iga hübridiseerimise meetodi jaoks kaht proovi: negatiivset luuüdiproovi ja nõrgalt positiivset luuüdiproovi. Nõrgalt positiivse luuüdiproovi (2–4-kordne toote väljaarvamine) loomiseks väärindati normaalset luuüdiproovi teadaoleva positiivse luuüdiprooviga, mida kasutati toote testimisel kindlaks tehtud väljaarvamise kontrollimiseks.

Päevadevahelise ja päevasisese täpsuse kindlaks tegemiseks hinnati proove kümnel mittejärjestikusel päeval ning partii-partiiga täpsuse kindlaks tegemiseks hinnati toote kolme partiid sama proovi kolme replikaadiga. Tulemused esitati üldise ühilduvusena prognoositud negatiivse klassiga (negatiivsete proovide korral).

Tabel 4. Sondi *FAST* PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe reprodutseeritavus ja täpsus

Muutuja	Proovi tüüp	Ühilduvus
Päevasisene (proov-prooviga) ja päevadevaheline (päev-päevaga) reprodutseeritavus	Luuüdi, negatiivne	100%
	Luuüdi, nõrgalt positiivne	100%
Partii-partiiga reprodutseeritavus	Luuüdi, negatiivne	100%
	Luuüdi, nõrgalt positiivne	100%

Kliiniline toimivus
Tagamaks, et toode tuvastab ettenähtud ümberkorraldused, tehti toote kliiniline toimivus kindlaks toote sihtpopulatsiooni esindusproove hõlmava ühe uuringuga, milles kasutati metanooli/atseethappega fikseeritud hematoloogiliselt tuletatud jääkmaterjali. Proovide hulk oli 136 proovi, mille populatsiooni moodustas 43 positiivset proovi ja 93 negatiivset proovi. Tulemusi võrreldi proovi teadaoleva olekuga, mis tuvastati võrdlusmeetodiga. Tulemuste ühilduvuse/ebakõla tulemused vastasid selle uuringu vastuvõetavuskriteeriumidele.

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

Tabel 5. Sondi *FAST* PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe kliiniline toimivus

Muutuja	Tulemus
Kliiniline tundlikkus (true positive rate, TPR) (tõeselt positiivsete määr)	98,93%
Kliiniline spetsiifilisus (true negative rate, TNR) (tõeselt negatiivsete määr)	99,58%
Valepositiivsete määr (false positive rate, FPR) = 1–spetsiifilisus	0,42%

Ohutuse ja toimivuse kokkuvõte (OTK)
OTK tehakse avalikkusele ligipääsetavaks Euroopa meditsiiniseadmete andmebaasi (Eudamed) kaudu, kus see on seotud põhi-UDI-DI-ga.
Eudamedi URL: https://ec.europa.eu/tools/eudamed
Põhi-UDI-DI: 50558449LPH064JR

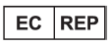
Kui Eudamed ei toimi täielikult, tehakse OTK avalikkusele ligipääsetavaks nõudmisel meili teel SSP@ogt.com.

Lisateave
Lisateavet saate kontakteerudes ettevõtte CytoCell tehnilise toe osakonnaga.
Tel: +44 (0)1223 294048
E-post: techsupport@cytocell.com
Veebisait: www.ogt.com

Viited

1. Swerdlow, *et al* (toim.). 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. ja Lawce HJ. (toim.). (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.

Sümbolite sõnastik

EN ISO 15223-1:2021–„Meditsiiniseadmed–Sümbolid, mida kasutatakse koos tootja poolt esitatava teabega–1. osa: Üldnõuded” (© Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon)		
Sümbol	**Pealkiri**	**Viitenumber (-numbrid)**
	et: Tootja	5.1.1
	**et:** Volitatud esindaja Euroopa Ühenduses / Euroopa Liidus	5.1.2
	et: Kõlblik kuni	5.1.4
	et: Partii number	5.1.5
	et: Kataloogi number	5.1.6
	et: Hoidke päikesevalguse eest kaitstult	5.3.2
	et: Temperatuuripiirang	5.3.7
	et: Vt kasutusjuhised	5.4.3
ogt.com/IFU	**et:** Lugege elektroonilist kasutusjuhendit	5.4.3
	et: Hoiatus!	5.4.4
	et: *In vitro* diagnostikameditsiiniseade	5.5.1
	et: Sisaldus piisav <n> analüüsi jaoks	5.5.5
	et: Seadme unikaalne identifikaator	5.7.10

IVD reaktiivide ja komponentide EDMA sümbolid, 2009. a oktoobri väljaanne		
Sümbol	**Pealkiri**	**Viitenumber (-numbrid)**
	et: Sisaldus (või sisaldab)	Ei kohaldata

Patendid ja kaubamärgid
CytoCell on ettevõtte Cytocell Limited registreeritud kaubamärk.

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

Tel: +44 (0)1223 294048
Faks: +44 (0)1223 294986
E-post: probes@cytocell.com
Veebisait: www.ogt.com

Sysmex Europe SE
Bornbarch 1
22848 Norderstedt
SAKSAMAA

Tel: +49 40 527260
Veebisait: www.sysmex-europe.com

Kasutusjuhendi versiooniajalugu
V001 2023-01-11: Uus kasutusjuhend kooskõlas määrusega (EL) 2017/746
V002 2025-08-29: UKCA märgi eemaldamine