



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika (IFU)

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

## EV11 (MECOM) Breakapart Probe



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO



Dalsze informacje oraz dokumenty w innych językach są dostępne pod adresem [ogt.com/IFU](http://ogt.com/IFU)

### Przeznaczenie

Produkt CytoCell® EV11 (MECOM) Breakapart Probe to jakościowy, niezautomatyzowany test wykonywany metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (Fluorescence In Situ Hybridisation, FISH) przeznaczony do detekcji chromosomowych rearanżacji zachodzących z udziałem regionu 3q26.2 chromosomu 3 w utrwalonych w roztworze Carnoya (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1) zawiesinach komórek pochodzenia hematologicznego pobranych od pacjentów z rozpoznaniem lub podejrzeniem ostrej białaczki szpikowej (Acute Myeloid Leukaemia, AML) z rearanżacją genu *MECOM* lub nowotworu mielodysplastycznego (MDS).

### Wskazania do stosowania

Ten wyrób zaprojektowano jako produkt uzupełniający inne testy kliniczne i histopatologiczne wykonywane w ramach przyjętych ścieżek diagnostycznych i opieki klinicznej, w przypadku których znajomość statusu rearanżacji genu *MECOM* w istotny sposób wpływałaby na postępowanie kliniczne.

### Ograniczenia

Ten wyrób jest przeznaczony do wykrywania rearanżacji z miejscami złamań w regionach, do których wiążą się czerwone, zielone i błękitne klony zawarte w tym zestawie sond, a które obejmują region genu *MECOM* (zielona sonda), region położony telomerycznie względem genu *MECOM* (czerwona sonda) i region położony centromerycznie względem genu *MECOM* (błękitna sonda). Wyrób ten może nie umożliwić wykrycia miejsc złamań, do których doszło poza tymi regionami, lub wariantowych rearanżacji całkowicie zawierających się w tym regionie.

Ten wyrób nie jest przeznaczony do użytku jako samodzielny test diagnostyczny, jako towarzyszący test diagnostyczny, do badań prenatalnych, populacyjnych badań przesiewowych, badań przyłóżkowych ani do samotestowania.

Ten wyrób nie został zatwierdzony do stosowania dla typów próbek, chorób ani celów innych niż określone w części dotyczącej przeznaczenia.

Produkt ten należy traktować jako uzupełnienie innych diagnostycznych testów laboratoryjnych. Z tego względu nie należy inicjować żadnych działań terapeutycznych wyłącznie na podstawie wyniku uzyskanego metodą FISH. Raportowanie i interpretacja wyników metody FISH powinny być przeprowadzane przez personel posiadający odpowiednie kwalifikacje, zgodnie z profesjonalnymi standardami praktyki i dokonywane z uwzględnieniem innych istotnych wyników testów, informacji klinicznych i diagnostycznych.

Ten wyrób jest przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego w laboratorium. Nieprzestrzeganie protokołu może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.

### Zasady działania testu

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence In Situ Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które

hybrydują do całych chromosomów lub pojedynczych unikalnych sekwencji, i stanowi istotne uzupełnienie cytogenetycznej analizy prążków G. Technika ta może być obecnie wykorzystywana jako kluczowe narzędzie diagnostyczne w chromosomalnych analizach prenatalnych, hematologicznych i guzów litych. Docelowa sekwencja DNA, po utrwaleniu i denaturacji, staje się dostępna do przyłączenia do zdenaturowanej w podobny sposób, fluorescencyjnie wyznakowanej sondy DNA o sekwencji komplementarnej. Po hybrydyzacji niezwiązane i nieswoiście związane sondy DNA są usuwane, a DNA jest barwiony kontrastowo w celu jego uwidocznienia. Sondy zhybrydyzowane do materiału docelowego można następnie obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym.

### Informacje o sondzie

Onkogen *MECOM* (MDS1 and EV11 complex locus) zlokalizowany w regionie 3q26.2 często ulega rearanżacjom w przypadku nowotworów złośliwych układu krwiotwórczego pochodzenia mieloidalnego, w tym nowotworów mielodysplastycznych (MDS) i ostrej białaczki szpikowej (Acute Myeloid Leukaemia, AML) z rearanżacją genu *MECOM*. Ekspresja w nowotworowych komórkach mieloidalnych zakłóca różnicowanie mieloidalne, regulację cyklu komórkowego i szlaki sygnałowe komórek<sup>1</sup>.

Do zaburzeń ekspresji zwykle dochodzi w wyniku rearanżacji chromosomowej zachodzącej z udziałem regionu 3q26.2, przy czym dwie najczęściej wykrywane aberracje (~40%) to translokacja t(3;3)(q21;q26.2) i inwersja inv(3)(q21q26.2)<sup>1</sup>. W przypadku regionu 3q26.2 opisano ponad 30 dodatkowych rearanżacji, większość z nich scharakteryzowano na poziomie molekularnym<sup>1</sup>.

Miejsca złamań biorące udział w traslokacjach i inwersjach istotnie się różnią. Rearanżacje zachodzące z udziałem genu *MECOM* są bardzo zróżnicowane i mogą być trudne do wykrycia konwencjonalnymi metodami cytogenetycznymi, co sprawia, że technika FISH jest przydatnym narzędziem umożliwiającym identyfikację tych nieprawidłowości. Regiony miejsc złamań dla wariantowych translokacji t(3;v)(q26.2;v) mogą rozciągać się od proksymalnego końca 3' genu *MECOM* do dystalnego końca 5' promotora genu MDS1-EV11, obejmowanego przez zieloną sondę. Z tego względu oczekiwany wzorzec sygnału dla tych translokacji różni się w zależności od położenia miejsca złamania<sup>2</sup>. Badanie pod kątem rearanżacji genu *MECOM* jest zalecane zarówno w przypadku MDS, jak i AML<sup>3</sup>.

AML z rearanżacją genu *MECOM* to agresywna choroba o krótkim czasie przeżycia niezależnie od odsetka blastów, w przypadku której nie odnotowuje się różnic między rozpoznaniem z inwersją inv(3)/t(3;3) a rearanżacjami genu *MECOM* z innymi genami partnerskimi<sup>1</sup>. Stratyfikacja ryzyka wystąpienia MDS uwzględnia zmienne, takie jak wiek, nasilenie cytopenii i wyniki badań cytogenetycznych<sup>1</sup>.

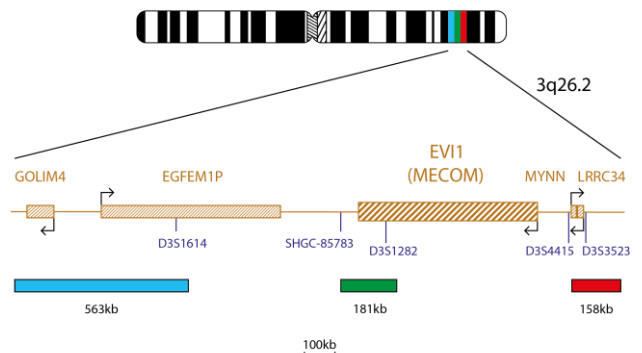
### Specyfikacja sondy

EV11, 3q26.2, kolor czerwony

EV11, 3q26.2, kolor zielony

EV11, 3q26.2, kolor błękitny

CMP-H021 v008.00



Czerwony składnik mieszaniny sond EV11 zawiera sondę o długości 158 kb położoną telomerycznie względem markera D3S4415, obejmującą gen *LRRC34*. Zielony składnik mieszaniny obejmuje region o długości 181 kb, w tym centromeryczną część genu *EV11* (*MECOM*), i rozciąga się poza marker D3S1282. Błękitny składnik mieszaniny obejmuje region o długości 563 kb, położony centromerycznie względem genu *EV11*, zawierający marker D3S1614.

### Dostarczone materiały

**Sonda:** 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)

Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydyzacyjnym (formamid <65%; siarczan dekstranu <20 mg; 20x stężony roztwór soli fizjologicznej i cytrynianu sodu (SSC) <10%) i są gotowe do użycia.

**Barwnik kontrastowy:** 150 µl na fiolkę (15 testów)

Barwnikiem kontrastowym jest odczynnik DAPI Antifade ES (0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol) w środku do zamykania na bazie glicerolu).

### Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego w laboratorium.
- Mieszaniny sond zawierają formamid, który wykazuje działanie teratogenne; nie wdychać oparów i nie dopuszczać do kontaktu ze skórą. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny.
- Zachować ostrożność podczas pracy z barwnikiem DAPI; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny.

DS1063/CE-pl v001.00/2024-02-05 (CMP-H021 V008)


Strona 1 z 6

- Nie używać produktu, jeśli folka jest uszkodzona lub jej zawartość została w jakikolwiek sposób naruszona.
- W celu bezpiecznego usuwania tego produktu należy postępować zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi usuwania odpadów oraz zaleceniami zawartymi w karcie charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS). Dotyczy to również zawartości uszkodzonego zestawu do testów.
- Wszystkie zużyte odczynniki oraz wszelkie inne zanieczyszczone materiały jednorazowe należy usuwać zgodnie z procedurami obowiązującymi dla odpadów zakaźnych lub potencjalnie zakaźnych. Każde laboratorium jest odpowiedzialne za postępowanie z odpadami stałymi i płynnymi stosownie do ich właściwości i stopnia zagrożenia oraz przetwarzanie i usuwanie ich (lub zlecenie ich przetwarzania i usuwania) zgodnie z wszelkimi obowiązującymi przepisami.
- Operatorzy muszą być w stanie rozróżnić czerwony, niebieski i zielony kolor.
- Nieprzestrzeganie wskazanego protokołu oraz nieużywanie właściwych odczynników może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.
- Nie należy rozcieńczać sondy ani mieszać jej z innymi sondami.
- Niezastosowanie 10 µl sondy podczas fazy denaturacji wstępnej wykonywanej w ramach protokołu może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.
- Przed użyciem produktów należy poddać je walidacji.
- Kontrolę wewnętrzne należy przeprowadzać z wykorzystaniem populacji prawidłowych komórek dostępnych w badanych próbkach.

#### Definicje temperatur

- 20°C/stan zamrożony/w zamrażarce: od -25°C do -15°C
- 37°C: +37°C ±1°C
- 72°C: +72°C ±1°C
- 75°C: +75°C ±1°C
- Temperatura pokojowa: od +15°C do +25°C

#### Przechowywanie i postępowanie z produktem

 Zestaw należy przechowywać w zamrażarce w temperaturze od -25°C do -15°C do daty ważności wskazanej na etykiecie zestawu. Fiolki z sondami i barwnikiem kontrastowym należy przechowywać w ciemności.



Sonda do badań techniką FISH, barwnik kontrastowy DAPI Antifade ES oraz roztwór hybrydyzacyjny zachowują stabilność przez wszystkie cykle zamrażania i rozmrażania wykonywane podczas standardowego użytkowania produktów (jeden cykl jest definiowany jako wyjęcie fiołki z zamrażarki i ponowne umieszczenie jej w zamrażarce) — 5 cykli w przypadku fiołki zawierającej 50 µl (5 testów) sondy FISH, 10 cykli w przypadku fiołki zawierającej 100 µl (10 testów) sondy FISH i 15 cykli w przypadku fiołki zawierającej 150 µl (15 testów) barwnika kontrastowego. Należy zminimalizować i możliwie ograniczać ekspozycję produktów na światło. Przechowywać elementy zestawu w dostarczonym pojemniku nieprzepuszczającym światła. Użyte elementy zestawu, które przechowywano w warunkach innych niż wskazane na etykietach, mogą nie działać zgodnie z oczekiwaniami i negatywnie wpłynąć na wyniki oznaczenia. Należy dołożyć wszelkich starań, aby ograniczyć ekspozycję produktów na światło i zmiany temperatury.

#### Sprzęt i materiały wymagane, ale niedostarczane

Należy używać następującego skalibrowanego sprzętu:

- Płyta grzewcza (ze stabilną płytą i możliwością dokładnej kontroli temperatury do 80°C)
- Skalibrowane mikropipety i końcówki umożliwiające przenoszenie zmiennych objętości cieczy w zakresie 1–200 µl
- Łaźnia wodna z możliwością dokładnej kontroli temperatury na poziomie 37°C i 72°C
- Probówki mikrowirówkowe (0,5 ml)
- Mikroskop fluorescencyjny (patrz część „Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego”)
- Mikroskop z kontrastem fazowym
- Czyste barwiacze Coplina z tworzywa sztucznego, ceramiki lub szkła żaroodpornego
- Szczypczyki
- Skalibrowany pH-metr (lub papierki wskaźnikowe pH umożliwiające pomiar pH w zakresie 6,5–8,0)
- Pojemnik zapewniający dużą wilgotność powietrza
- Olejek imersyjny odpowiedni do obiektywów mikroskopowych klasy fluorescencyjnej
- Wirówka laboratoryjna
- Szkiełka mikroskopowe
- Szkiełka nakrywkowe o wymiarach 24x24 mm
- Stoper
- Inkubator nastawiony na temperaturę 37°C
- Klej kauczukowy
- Wytrząsarka
- Cylindry miarowe
- Mieszadło magnetyczne
- Skalibrowany termometr

#### Opcjonalny sprzęt niedostarczany

- Komora do suszenia próbek do badań cytogenetycznych

#### Odczynniki wymagane, ale niedostarczane

- Roztwór soli fizjologicznej i cytrynianu sodu (SSC), 20x
- Etanol, 100%
- Tween-20

- Wodorotlenek sodu (NaOH), 1 M
- Kwas solny (HCl), 1 M
- Woda oczyszczona

#### Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego

W celu optymalnej wizualizacji sondy zalecane jest używanie 100-watowej lampy rtęciowej lub równoważnej lampy i obiektywów planapochromatycznych umożliwiających stosowanie olejku imersyjnego przy powiększeniu 60/63x lub 100x. Fluorofory użyte w tym zestawie sond charakteryzują się następującymi długościami fal wzbudzenia i emisji:

Fluorofor	Wzbudzenie [nm] <sub>emaks.</sub>	Emisja [nm] <sub>emaks.</sub>
Błękitny	418	467
Zielony	495	521
Czerwony	596	615

Należy upewnić się, że w mikroskopie zamontowane są odpowiednie filtry wzbudzenia i emisji, które obejmują wymienione powyżej długości fal.

Do obserwacji widma błękitnego optymalnie nadaje się pojedynczy filtr pasmowo-przepustowy dla widma błękitnego, a do równoczesnej wizualizacji fluoroforów zielonych, czerwonych i błękitnych optymalnie nadaje się potrójny filtr pasmowo-przepustowy dla widma czerwonego/zielonego/błękitnego.

Przed użyciem mikroskopu fluorescencyjnego należy sprawdzić, czy działa on prawidłowo. Należy stosować olejek imersyjny odpowiedni do mikroskopii fluorescencyjnej o składzie odpowiednim do niskiej autofluorescencji. Należy unikać mieszania barwnika DAPI antifade z mikroskopowym olejkim imersyjnym, ponieważ spowoduje to zaciemnienie sygnałów. Należy przestrzegać zaleceń producenta dotyczących okresu żywotności lampy i wieku filtrów.

#### Przygotowanie próbek

Zestaw jest przeznaczony do stosowania na utrwalonych w roztworze Carnoya (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1) zawiesinach komórek pochodzenia hematologicznego pobranych od pacjentów z rozpoznaniem lub podejrzeniem ostrej białaczki szpikowej (AML) lub nowotworu mielodysplastycznego (MDS). Komórki należy przygotować zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w laboratorium lub placówce. Należy przygotować próbki suszone na powietrzu na szkiełkach mikroskopowych zgodnie ze standardowymi procedurami cytogenetycznymi. Podręcznik AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* zawiera zalecenia dotyczące pobierania próbek, prowadzenia hodowli komórek, zbierania komórek z hodowli oraz przygotowywania preparatów<sup>4</sup>.

#### Przygotowanie roztworów

##### Roztwory etanolu

Rozcieńczyć 100-procentowy etanol wodą oczyszczoną w określonych poniżej proporcjach i dokładnie wymieszać:

- 70-procentowy etanol — dodać 7 części 100-procentowego etanolu do 3 części wody oczyszczonej
- 85-procentowy etanol — dodać 8,5 części 100-procentowego etanolu do 1,5 części wody oczyszczonej

Przechowywać roztwory przez maksymalnie 6 miesięcy w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

##### 2x stężony roztwór SSC

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 9 częściami wody oczyszczonej; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

##### 0,4x stężony roztwór SSC

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 49 częściami wody oczyszczonej; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

##### 2x stężony roztwór SSC ze środkiem Tween-20 w stężeniu 0,05%

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 9 częściami wody oczyszczonej. Dodać 5 µl środka Tween-20 na 10 ml roztworu; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

#### Protokół FISH

(Uwaga: Należy możliwie ograniczać ekspozycję sondy i barwnika kontrastowego na światło w laboratorium).

#### Przygotowanie szkiełek

- Wkropić próbkę komórek na szkiełko mikroskopowe. Pozostawić do wyschnięcia. (Opcjonalnie, w przypadku korzystania z komory do suszenia próbek do badań cytogenetycznych: Komora powinna mieć temperaturę około 25°C i zapewniać wilgotność 50%, aby umożliwić optymalne naniesienie próbki komórek. Jeśli komora do suszenia próbek do badań cytogenetycznych nie jest dostępna, należy pozostawić próbki pod wyciągiem).
- Zanurzyć szkiełko w 2x stężonym roztworze SSC w temperaturze pokojowej na 2 minuty; nie wstrząsać.
- Odwodnić próbkę, korzystając z szeregu alkoholowego (etanol w stężeniu 70%, 85% i 100%); zanurzać szkiełko w każdym roztworze alkoholu na 2 minuty w temperaturze pokojowej.
- Pozostawić do wyschnięcia.

### Denaturacja wstępna

- Wyjąć roztwór sond z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej. Przed użyciem roztworu należy krótko odwirować próbówki.
- Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
- Pobrać 10 µl roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość do próbówki mikrowirówkowej. Bezwzględnie włożyć pozostały roztwór sond z powrotem do zamrażarki.
- Umieścić roztwór sond i szkiełko z próbką na płycie grzewczej o temperaturze 37°C (+/-1°C) na 5 minut w celu ich wstępnego ogrzania.
- Wkropić 10 µl mieszaniny sond na próbkę komórek i ostrożnie nanieść szkiełko nakrywkowe. Zakleić szkiełko klejem kauczukowym i poczekać na jego całkowite wyschnięcie.

### Denaturacja

- Denaturować jednocześnie próbkę i mieszaninę sond, ogrzewając szkiełko na płycie grzewczej o temperaturze 75°C (+/-1°C) przez 2 minuty.

### Hybrydyzacja

- Umieścić szkiełko w wilgotnym, światłoszczelnym pojemniku w temperaturze 37°C (+/-1°C) na noc.

### Płukania po hybrydyzacji

- Wyjąć barwnik DAPI z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej.
- Ostrożnie zdjąć szkiełko nakrywkowe i usunąć wszelkie pozostałości kleju.
- Zanurzyć szkiełko w 0,4x stężonym roztworze SSC (pH 7,0) w temperaturze 72°C (+/-1°C) na 2 minuty; nie wstrząsać.
- Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie zanurzyć je w 2x stężonym roztworze SSC ze środkiem Tween-20 w stężeniu 0,05% (pH 7,0) w temperaturze pokojowej na 30 sekund; nie wstrząsać.
- Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie nanieść 10 µl barwnika DAPI antyfade na każdą próbkę.
- Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić zajście reakcji barwnej.
- Obejrzyć pod mikroskopem fluorescencyjnym (patrz **Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego**).

### Zalecenia dotyczące procedury

- Wypiekanie lub postarzenie preparatów może zmniejszyć fluorescencję sygnału.
- Stosowanie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę Cytocell Ltd może mieć negatywny wpływ na warunki hybrydyzacji.
- Do pomiaru temperatury roztworów, łaźni wodnych i inkubatorów należy używać skalibrowanego termometru, ponieważ temperatury te są kluczowe dla optymalnego działania produktu.
- Stężenia, wartości pH i temperatury roztworów wykorzystywanych do płukania są istotne, gdyż mało surowe warunki mogą doprowadzić do nieswoistego wiązania sondy, a zbyt surowe warunki mogą spowodować brak sygnału.
- Niecałkowita denaturacja może spowodować brak sygnału, a nadmierna denaturacja może również doprowadzić do nieswoistego wiązania.
- Nadmierna hybrydyzacja może spowodować otrzymanie dodatkowych lub nieoczekiwanych sygnałów.
- Przed użyciem testu do celów diagnostycznych użytkownicy powinni zoptymalizować protokół dla własnych próbek.
- Suboptymalne warunki mogą prowadzić do nieswoistego wiązania sond, które może zostać błędnie zinterpretowane jako sygnał sondy.

### Interpretacja wyników

#### Ocena jakości preparatów

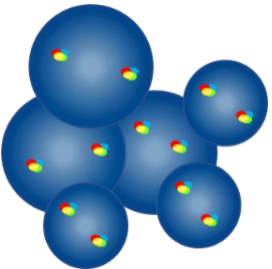
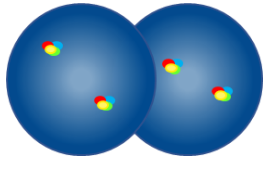
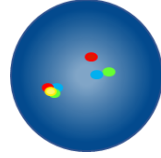
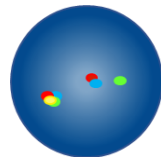
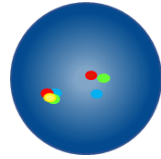
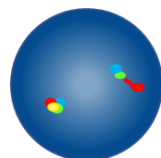
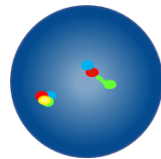
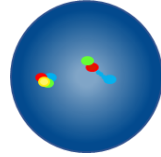
Preparatu nie należy oceniać w następujących przypadkach:

- Sygnały są zbyt słabe, aby można było analizować je w pojedynczych filtrach — do analizy można przystąpić jedynie, jeśli sygnały są jasne, wyraźne i łatwe do oceny.
- Widoczna jest duża liczba zlepionych/nakładających się na siebie komórek, co utrudnia analizę.
- W >50% komórek nie doszło do hybrydyzacji.
- Pomiędzy komórkami znajdują się liczne cząstki fluorescencyjne i/lub widoczne jest „zamglenie” fluorescencyjne, które zakłóca sygnały — w przypadku preparatów optymalnych do oceny tło powinno być ciemne lub czarne i klarowne.
- Nie można rozróżnić granic jąder komórkowych lub są one nieciągle.

### Wytyczne dotyczące analizy

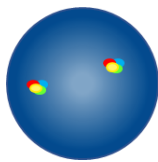
- Każda próbka powinna być analizowana i interpretowana przez dwóch analityków. Wszelkie rozbieżności powinny zostać rozwiązane w wyniku oceny dokonanej przez trzeciego analityka.
- Każdy analityk powinien posiadać odpowiednie kwalifikacje zgodne z normami krajowymi.
- Każdy analityk powinien dokonać niezależnej oceny 100 jąder dla każdej próbki. Pierwszy analityk powinien rozpocząć analizę od lewej strony preparatu, a drugi od prawej strony preparatu.
- Każdy analityk powinien zapisać własne wyniki w odrębnym arkuszu.
- Należy analizować wyłącznie nienaruszone jądra, nie wolno analizować jąder nakładających się na siebie, zlepionych, pokrytych resztkami cytoplazmy ani jąder wykazujących wysoki stopień autofluorescencji.
- Należy unikać obszarów, w których występuje nadmierna ilość resztek cytoplazmy lub nieswoista hybrydyzacja.
- Intensywność sygnału może się różnić nawet w obrębie jednego jądra. W takich przypadkach należy użyć filtrów pojedynczych i/lub wyregulować płaszczyznę ogniskowania.

- W warunkach suboptymalnych sygnały mogą wyglądać na rozlane. Jeśli dwa sygnały o tym samym kolorze stykają się ze sobą, odległość między nimi jest nie większa niż dwie szerokości sygnału lub istnieje cienkie pasmo łączące oba sygnały, należy zliczać je jako jeden sygnał.
- W przypadku analizy wyników uzyskanych za pomocą trzykolorowych sond wykrywających miejsca złamań: jeśli pomiędzy którymkolwiek z 3 sygnałów (czerwonym, zielonym, błękitnym) występuje przerwa nieprzekraczająca 2 szerokości sygnału, sygnał należy zliczyć jako brak rearanżacji/sygnał fuzyjny.
- W przypadku wątpliwości, czy komórka nadaje się do analizy, nie należy jej analizować.

Wytyczne dotyczące analizy	
	Nie zliczać — jądra są za blisko siebie, aby można było określić ich granice
	Nie zliczać jąder nakładających się na siebie — nie są widoczne całe obszary obu jąder
	Zliczyć jako 2 sygnały fuzyjne — przerwa widoczna między czerwonym a zielonym/błękitnym sygnałem jest mniejsza niż dwie szerokości sondy
	Zliczyć jako 2 sygnały fuzyjne — przerwa widoczna między zielonym a czerwonym/błękitnym sygnałem jest mniejsza niż dwie szerokości sondy
	Zliczyć jako 2 sygnały fuzyjne — przerwa widoczna między błękitnym a czerwonym/zielonym sygnałem jest mniejsza niż dwie szerokości sondy
	Zliczyć jako 2 sygnały fuzyjne — czerwony sygnał w górnej fuzyji po prawej stronie jest rozlany
	Zliczyć jako 2 sygnały fuzyjne — zielony sygnał w górnej fuzyji po prawej stronie jest rozlany
	Zliczyć jako 2 sygnały fuzyjne — błękitny sygnał w górnej fuzyji po prawej stronie jest rozlany

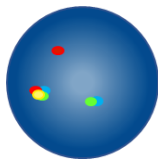
## Oczekiwane wyniki

### Oczekiwany wzorzec sygnału wskazujący na stan prawidłowy

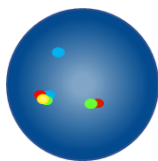


W komórce prawidłowej oczekiwane są dwa fuzyjne sygnały czerwone/zielone/błękitne (2CZB).

### Oczekiwane wzorce sygnału wskazujące na stan nieprawidłowy



W komórce z translokacją  $t(3;3)(q21;q26.2)$  lub translokacją  $t(3;v)(q26.2;v)$  z miejscami złamań położonymi dystalnie do zielonej sondy, oczekiwany wzorzec sygnału to jeden czerwony/zielony/błękitny sygnał fuzyjny, jeden czerwony/zielony sygnał fuzyjny i jeden sygnał błękitny (1CZB1ZB1C).



W komórce z inwersją  $inv(3)(q21q26.2)$  lub translokacją  $t(3;v)(q26.2;v)$  z miejscami złamań położonymi proksymalnie do zielonej sondy, oczekiwany wzorzec sygnału to jeden czerwony/zielony/błękitny sygnał fuzyjny, jeden czerwony/zielony sygnał fuzyjny i jeden sygnał błękitny (1CZB1ZB1C).

W przypadku próbek aneuploidalnych/z rearanżacją nie zrównoważoną mogą wystąpić inne wzorce sygnału.

### Znane istotne zakłócenia/substancje zakłócające

Brak znanych istotnych zakłóceń/substancji zakłócających.

Brak znanej reaktywności krzyżowej.

### Zgłaszanie poważnych incydentów

Dotyczy pacjentów/użytkowników/podmiotów trzecich w Unii Europejskiej i w krajach o identycznym reżimie regulacyjnym (Rozporządzenie (UE) 2017/746 w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro*): jeśli podczas używania tego wyrobu lub w wyniku jego używania doszło do poważnego incydentu, fakt ten należy zgłosić producentowi oraz właściwemu organowi krajowemu.

W przypadku wystąpienia poważnych incydentów w innych krajach fakt ten należy zgłosić producentowi oraz, jeśli ma to zastosowanie, właściwemu organowi krajowemu.

Adres producenta do kontaktu w sprawach dotyczących nadzoru nad produktami (ang. vigilance): [vigilance@ogt.com](mailto:vigilance@ogt.com)

Wykaz punktów kontaktowych ds. nadzoru nad produktami (ang. vigilance) dla krajowych właściwych organów w UE jest dostępny na stronie: [https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts\\_en](https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en)

### Specyficzne parametry skuteczności

#### Swoistość analityczna

Swoistość analityczna jest definiowana jako odsetek sygnałów, które hybrydują do właściwego locus i nie hybrydują do żadnej innej lokalizacji. Analizie poddano dwa loci chromosomowe w każdej z dwudziestu komórek metafazowych w pięciu próbkach, uzyskując łącznie 200 punktów danych na analizowany komponent. Zmapowano lokalizację każdej zhybrydowanej sondy i zarejestrowano liczbę sygnałów FISH chromosomu metafazowego, które hybrydowały do właściwego locus.

Swoistość analityczną każdej sondy zawartej w zestawie obliczono jako liczbę sygnałów FISH chromosomu metafazowego zhybrydowanych do prawidłowego locus podzieloną przez całkowitą liczbę zhybrydowanych sygnałów FISH chromosomu metafazowego, uzyskany wynik pomnożono przez 100, wyrażono jako odsetek i podano z 95-procentowym przedziałem ufności.

Tabela 1. Swoistość analityczna dla produktu EVI1 (MECOM) Breakapart Probe

Locus docelowe	Liczba chromosomów metafazowych, w których doszło do hybrydacji	Liczba loci, w których doszło do hybrydacji	Swoistość analityczna	95-procentowy przedział ufności
3q26.2	200	200	100%	98,12–100%
3q26.2	200	200	100%	98,12–100%
3q26.2	200	200	100%	98,12–100%

#### Czułość analityczna

Czułość analityczna to odsetek komórek interfazowych nadających się do oceny z oczekiwanym wzorcem sygnału wskazującym na stan prawidłowy. Dla każdej z 25 utrwalonych zawieszin komórek szpiku kostnego uznanych za ujemne pod kątem rearanżacji genu *MECOM* analizowano co najmniej 200 komórek interfazowych, uzyskując co najmniej 5000 jąder komórkowych poddanych ocenie dla każdego typu próbki. Dane dotyczące czułości przeanalizowano w oparciu o odsetek komórek wykazujących wzorzec sygnału wskazujący na stan prawidłowy i wyrażono jako odsetek z 95-procentowym przedziałem ufności.

Tabela 2. Czułość analityczna dla produktu EVI1 (MECOM) Breakapart Probe

Typ próbki	Kryterium czułości	Wynik czułości
Szpick kostny	>95%	99,14% (98,89–99,39%)

#### Charakterystyka wartości odcięcia dla stanu prawidłowego

Wartość odcięcia dla stanu prawidłowego jest definiowana jako odsetek komórek wykazujących fałszywie dodatni wzorzec sygnału, przy którym stan osoby należy uznać za prawidłowy i niezgodny z rozpoznaniem klinicznym. Dla każdej z 25 próbek szpiku kostnego uznanych za ujemne pod kątem rearanżacji genu *MECOM* analizowano co najmniej 200 komórek interfazowych, uzyskując co najmniej 5000 jąder komórkowych poddanych ocenie dla każdego typu próbki.

Wartość odcięcia ustalono przy użyciu funkcji  $\beta$ -odwrotności (BETAINV) w programie MS Excel. Obliczono ją jako odsetek komórek interfazowych wykazujących fałszywie dodatni wzorzec sygnału przy zastosowaniu górnej granicy jednostronnego 95-procentowego przedziału ufności rozkładu dwumianowego w prawidłowej próbce pacjenta.

Tabela 3. Charakterystyka wartości odcięcia dla stanu prawidłowego dla produktu EVI1 (MECOM) Breakapart Probe

Typ próbki	Wartość odcięcia
Szpick kostny	4%

Laboratoria muszą zweryfikować wartości odcięcia w oparciu o własne dane<sup>5,6</sup>.

#### Odtwarzalność

Przeprowadzono badania odtwarzalności w celu ustalenia następujących parametrów:

- odtwarzalność w ramach dnia (między próbkami) w 3 ośrodkach;
- odtwarzalność między dniami w 3 ośrodkach;
- odtwarzalność między 3 ośrodkami;
- odtwarzalność między seriami w jednym ośrodku.

Odtwarzalność ustalono na podstawie danych otrzymanych z 3 odrębnych laboratoriów, w których wykonywano testy na 12 zaślepionych próbkach, gdzie 6 próbek przypadła na wzorzec sygnału (2 próbki ujemne względem rearanżacji, 2 próbki nisko dodatnie, dla których odsetek komórek dodatnich był od 1 do 3 razy większy od wartości odcięcia, i 2 próbki wysoko dodatnie, które zawierały ponad 45% komórek dodatnich względem rearanżacji). Analizy prowadzono w ciągu 5 nienastępujących po sobie dni, wykonując po 2 powtórzenia dla każdej próbki.

We wszystkich 3 ośrodkach przeprowadzono badania odtwarzalności wyników w ramach dnia, między dniami i między ośrodkami przy użyciu tej samej serii sond, a w jednym z ośrodków przeprowadzono również badanie odtwarzalności wyników między seriami z użyciem 3 różnych serii sond.

Wyniki przedstawiono jako zgodność ogółem z przewidywaną klasą ujemną (dla próbek ujemnych) i przewidywaną klasą dodatnią (dla próbek dodatnich).

Tabela 4a. Odtwarzalność i precyzja dla produktu EVI1 (MECOM) Breakapart Probe — wzorzec sygnału w przypadku inwersji

Zmienna	Typ próbki	Zgodność
Odtwarzalność w ramach dnia (między próbkami), między dniami i między ośrodkami	Ujemne komórki szpiku kostnego	100%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego	63%
	Wysoko dodatnie komórki szpiku kostnego	100%
Odtwarzalność między seriami	Ujemne komórki szpiku kostnego	92%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego	67%
	Wysoko dodatnie komórki szpiku kostnego	100%

Tabela 4b. Odtwarzalność i precyzja dla produktu EVI1 (MECOM) Breakapart Probe — wzorzec sygnału w przypadku translokacji

Zmienna	Typ próbki	Zgodność
Odtwarzalność w ramach dnia (między próbkami), między dniami i między ośrodkami	Ujemne komórki szpiku kostnego	100%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego	98%
	Wysoko dodatnie komórki szpiku kostnego	100%
Odtwarzalność między seriami	Ujemne komórki szpiku kostnego	100%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego	100%
	Wysoko dodatnie komórki szpiku kostnego	100%

Przeprowadzono dodatkowe badanie odtwarzalności w celu uzupełnienia wyników nisko dodatnich dla wzorca sygnału w przypadku inwersji. W tym celu użyto 2 próbek o różnych poziomach nisko dodatnich (2-krotność i 4-krotność wartości odcięcia) oraz 1 próbki ujemnej w celu ustalenia następujących parametrów:

- odtwarzalność w ramach dnia (między próbkami) w jednym ośrodku;
- odtwarzalność między dniami w jednym ośrodku;
- odtwarzalność między operatorami w jednym ośrodku.

Odtwarzalność ustalono przy użyciu 1 serii sondy, oceniając po 2 powtórzenia dla każdej próbki w ciągu 5 nienastępujących po sobie dni. Analizę przeprowadzało 2 różnych operatorów.

Wyniki przedstawiono jako zgodność ogółem z przewidywaną klasą dodatnią (dla próbek dodatnich).

Tabela 4c. Dodatkowe dane potwierdzające odtwarzalność i precyzję dla produktu EVI1 (MECOM) Breakapart Probe — wzorzec sygnału w przypadku inwersji

Zmienna	Typ próbki	Zgodność
Odtwarzalność w ramach dnia (między próbkami), między dniami i między operatorami	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego (2-krotność wartości odcięcia)	100%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego (4-krotność wartości odcięcia)	100%

#### Skuteczność kliniczna

W celu zapewnienia, że produkt wykrywa rearanżacje, do których oceny jest przeznaczony, ustalono skuteczność kliniczną produktu na podstawie 3 badań wykonanych na reprezentatywnych próbkach docelowej populacji pacjentów, czyli utrwalonych w roztworze Carnoya (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1) zawieszonych komórek pochodzenia hematologicznego pobranych od pacjentów z rozpoznaniem lub podejrzeniem ostrej białaczki szpikowej (AML) lub nowotworu mielodysplastycznego (MDS). W przypadku tych badań wykorzystano łączną próbę wynoszącą sto osiemnaście (118) próbek, przy czym populacja docelowa liczyła siedem (7) próbek dodatnich względem translokacji i sto jedenaście (111) próbek ujemnych względem translokacji, oraz łączną próbę wynoszącą sto dziewiętnaście (119) próbek, w tym sto jedenaście (111) próbek ujemnych względem inwersji i osiem (8) próbek dodatnich względem inwersji. Wyniki porównano ze znanym statusem próbek. Poziomy zgodności/rozbieżności wyników spełniały kryteria akceptacji ustalone dla badania.

Uzyskane wyniki testów przeanalizowano w celu obliczenia czułości klinicznej, swoistości klinicznej i odsetka wyników fałszywie dodatnich (False Positive Rate, FPR) dla sygnałów dodatnich, stosując podejście jednowymiarowe.

Tabela 5. Skuteczność kliniczna dla produktu EVI1 (MECOM) Breakapart Probe — translokacja

Zmienna	Wynik
Czułość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie dodatnich (True Positive Rate, TPR))	99,94%
Swoistość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie ujemnych (True Negative Rate, TNR))	99,97%
Odsetek wyników fałszywie dodatnich (False Positive Rate, FPR) = 1 – swoistość	0,03%

Tabela 6. Skuteczność kliniczna dla produktu EVI1 (MECOM) Breakapart Probe — inwersja

Zmienna	Wynik
Czułość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie dodatnich (True Positive Rate, TPR))	96,26%
Swoistość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie ujemnych (True Negative Rate, TNR))	99,28%

Odsetek wyników fałszywie dodatnich (False Positive Rate, FPR) = 1 – swoistość	0,72%
--	-------

#### Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności (SSP)

Dokument SSP jest udostępniany publicznie za pośrednictwem europejskiej bazy danych o wyrobach medycznych (Eudamed), w której powiązany jest z kodem Basic UDI-DI.

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

Kod Basic UDI-DI: 50558449LPH036JL

Jeśli baza danych Eudamed nie jest w pełni funkcjonalna, dokument SSP jest udostępniany publicznie na żądanie przesłane na adres e-mail [SSP@oqt.com](mailto:SSP@oqt.com).

#### Dodatkowe informacje

W celu uzyskania dodatkowych informacji na temat produktu należy skontaktować się z działem wsparcia technicznego firmy CytoCell.

Tel.: +44 (0)1223 294048


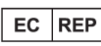











E-mail: [techsupport@cytozell.com](mailto:techsupport@cytozell.com)

Strona WWW: [www.oqt.com](http://www.oqt.com)

#### Piśmiennictwo

1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Haematolymphoid tumours* [Internet; beta version ahead of print]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2022 [cited 2023 December 21]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 11). Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
2. Ottema et al. Atypical 3q26/MECOM rearrangements genocopy inv(3)t(3;3) in acute myeloid leukemia. *Blood* (2020)136(2):224–234.
3. Rack et al., *Leukemia* (2019) 33:1851–1867
4. Arsham, MS., Barch, M.J. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
5. Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. *Genet Med*. 2011;13(7):667-675.
6. Wiktor AE, Dyke DL, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. *Genetics in Medicine*. 2006;8(1):16–23.

#### Glosariusz symboli

EN ISO 15223-1:2021 — „Wyroby medyczne — Symbole do stosowania wraz z informacjami dostarczonymi przez producenta — Część 1: Wymagania ogólne” (© International Organization for Standardization)		
Symbol	Nazwa	Numer referencyjne
	pl: Producent	5.1.1
	pl: Autoryzowany przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej/Unii Europejskiej	5.1.2
	pl: Użyć do daty	5.1.4
	pl: Kod partii	5.1.5
	pl: Numer katalogowy	5.1.6
	pl: Trzymać z dala od światła słonecznego	5.3.2
	pl: Dopuszczalna temperatura	5.3.7
	pl: Zajrzyj do instrukcji użytkownika	5.4.3
	pl: Zajrzyj do elektronicznej instrukcji używania	5.4.3
	pl: Ostrzeżenie	5.4.4
	pl: Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro	5.5.1
	pl: Zawartość wystarczająca do <n> testów	5.5.5
	pl: Niepowtarzalny kod identyfikacyjny wyrobu	5.7.10

Symbole EDMA dla odczynników i składników IVD, wersja: październik 2009 r.		
Symbol	Nazwa	Numery referencyjne
CONT	pl: Zawartość (lub „zawiera”)	ND.

#### Patenty i znaki towarowe

CytoCell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy CytoCell Limited.



#### CytoCell Limited

Oxford Gene Technology  
418 Cambridge Science Park  
Milton Road  
CAMBRIDGE  
CB4 0PZ  
WIELKA BRYTANIA

Tel.: +44 (0)1223 294048

Faks: +44 (0)1223 294986

E-mail: [probes@cytoCell.com](mailto:probes@cytoCell.com)

Strona WWW: [www.ogt.com](http://www.ogt.com)



#### Sysmex Europe SE

Bornbarch 1  
22848 Norderstedt  
NIEMCY

Tel.: +49 40 527260

Strona WWW: [www.sysmex-europe.com](http://www.sysmex-europe.com)

#### Historia wersji dokumentu IFU

V001 2024-02-05: Nowy dokument IFU zgodny z Rozporządzeniem (UE) 2017/746