



A Sysmex Group Company



## Kasutusjuhend

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

## Sond EV11 (MECOM) Breakapart Probe



AINULT ERIALASEKS KASUTUSEKS



Lisateave ja muud keeled on saadaval aadressil [ogt.com/IFU](http://ogt.com/IFU)

### Kasutusotstarve

Sond CytoCell® EV11 (MECOM) Breakapart Probe on kvalitatiivne, mitteautomaatne, fluorestsents *in situ* hübriidatsiooni (FISH) uuring, mida kasutatakse 3. kromosoomi 3q26.2 piirkonna kromosomaalse ümberkorralduste tuvastamiseks Carnoy lahuses (3:1 metanool/atseethape) fikseeritud hematoloogiliselt tuletatud rakususpensioonides, mis pärinevad kinnitatud või kahtlustatud MECOM-i ümberkorraldusega ägeda müeloidse leukeemia (AML) või müelodüplastilise kasvaja (MDS) patsientidelt.

### Näidustused

See seade on loodud täiendusena teistele kliinilistele ja histopatoloogilistele uuringutele tunnustatud diagnostilistes ja kliinilistes raviteedes, kus teadmised MECOM-i ümberkorralduse oleku kohta on kliinilise ravi seisukohalt olulised.

### Piirangud

See seade on loodud selles sondide komplektis punaste, roheliste ja rohekassiniste kloonidega piiritletud piirkondade murdepunktidega ümberkorralduste tuvastamiseks, mis sisaldab MECOM-i piirkonda (roheline sond), MECOM-i geeni suhtes telomeerset piirkonda (punane sond) ja MECOM-i geeni suhtes tsentromeerset piirkonda (rohekassinine sond). Nendest piirkondadest 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.

See seade on sobimatu 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 ainult erialaseks laboratoorseteks kasutamiseks.

Protokoll järgimata jätmine võib mõjutada analüüsi jõudlust ja põhjustada valepositiivseid/negatiivseid tulemusi.

### Analüüsi põhimõte

Fluorestsents *in situ* hübriidatsioon (FISH) on meetod DNA järjestuste tuvastamiseks metafasi kromosoomides või fikseeritud tsütogeneetiliste proovide interfaasi tuumades. Meetod kasutab DNA sonde, mis hübriidseeritakse 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 esmatahtsa uuringu tööriistana. Pärast fikseeritud ja denatureeritud sihtmärk-DNA on saadaval sarnase denatureeritud, fluorestsentsmarkeriga DNA sondiga paardumiseks, millel on komplementaarne järjestus. Peale hübriidatsiooni eemaldatakse seondumata ja ebaspetsiifiliselt seotud DNA sond ning DNA

visualiseeritakse vastandvärvimisega. Seejärel võimaldab fluorestsentsmikroskoopia hübriidseeritud sondi visualiseerimist sihtmärkmaterjalil.

### Sondi teave

MECOM (MDS1 ja EV11 komplekslookus) onkogeen asukohas 3q26.2 on sageli ümberkorraldatud müeloidset päritolu hematoloogiliste pahaloomuliste protsesside puhul, sealhulgas müelodüplastiliste neoplasmide (MDS) ja MECOM-i ümberkorraldusega ägeda müeloidse leukeemia (AML) puhul. Selle ekspressioon neoplasti müeloidi rakkudes häirib müeloidi diferentseerumist, rakutsükli regulatsiooni ja raku signaaliedastuse teid<sup>1</sup>.

Reguleerimata ekspressioon on sageli põhjustatud 3q26.2 hõlmavast kromosomaalsest ümberkorraldusest, kusjuures kõige sagedasemad (~40%) aberratsioonid on t(3;3)(q21;q26.2) ja inv(3)(q21q26.2)<sup>1</sup>. Kirjeldatud on rohkem kui 30 täiendavat 3q26.2 ümberkorraldust, enamikku neist kirjeldatakse molekulaartasemel<sup>1</sup>.

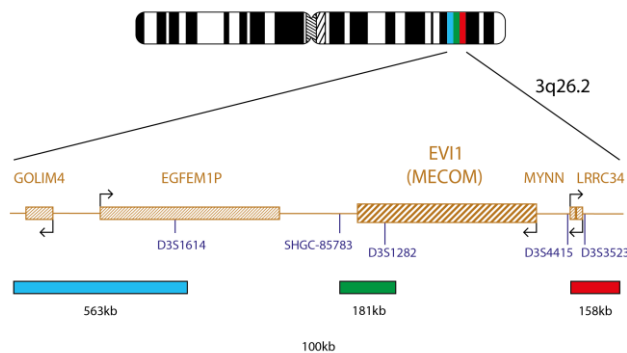
Translokatsioonide ja inversioonide murdepunktid võivad oluliselt varieeruda. MECOM-i ümberkorraldused on väga heterogeensed ja võib olla raske tuvastada tavapäraste tsütogeneetiliste meetoditega, mistõttu on FISH nende tuvastamisel kasulik tööriist. Variandi t(3;v)(q26.2;v) murdepunkti piirkonda saab pikendada 3 tolli võrra MECOM-ist proksimaalselt kuni 5 tolli võrra MDS1-EV11 promootorit distaalselt, mida katab roheline sond. Seetõttu erineb nende translokatsioonide laiendatud signaalimuster sõltuvalt murdepunkti asukohast<sup>2</sup>. MECOM-i ümberpaigutuste testimine on soovitatav nii MDS-i kui ka AML-i korral<sup>3</sup>.

AML koos MECOM-i ümberkorraldustega on agressiivne haigus, mille elulemus on lühike, sõltumata blasti protsendist, ning mille tulemusel ei esine erinevusi inv(3)/t(3;3) juhtumites, võrreldes MECOM-i ümberkorraldusi muude partnerite omadega<sup>1</sup>. MDS-i riski stratifikatsioon sisaldab muutujaid, nagu vanus, tsütopeniate raskusaste ja tsütogeneetilised leiud<sup>1</sup>.

### Sondi spetsifikatsioon

EV11, 3q26.2, punane  
EV11, 3q26.2, roheline  
EV11, 3q26.2, rohekassinine

CMP-H021 v008.00



EV11 sondisegu punane komponent sisaldab 158 kb sonni, mis on markeri D3S4415 suhtes telomeerne ja sisaldab LRRC34 geeni. Roheline komponent hõlmab 181 kb piirkonda, mis sisaldab EV11 (MECOM) geeni tsentromeerset osa ja ulatub üle markeri D3S1282. Rohekassinine komponent hõlmab 563 kb EV11 geeni suhtes tsentromeerset piirkonda, mis sisaldab markerit D3S1614.

### Tarnitavad materjalid

**Sond:** 50 µl viali kohta (5 analüüsi) või 100 µl viali kohta (10 analüüsi)  
Sondid tarnitakse hübriidatsioonilahusega eelsegatuna (< 65% formamiid; < 20 mg dekstraansulfaat; < 10% 20-kordne naatriumsitraadi soolalahus (saline-sodium citrate, SSC)) ja on valmis kasutamiseks.

### Vastandvärv:

150 µl viali kohta (15 analüüsi)  
Vastandvärv on pleekimisvastane DAPI ES (sisaldus 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) glütseroolipõhises kinnituskeskonnas).

### Hoiatused ja ettevaatusabinõud

- Kasutamiseks *in vitro* diagnostikas. Ainult erialaseks laboratoorseteks kasutamiseks.
- Sondi segud sisaldavad formamiidi, mis on teratogeenne; ärge hingake sisse auru ning vältige kontakti nahaga. Käsitsege ettevaatlikult; kasutage kindaid ja laborikitiit.
- Käsitsege DAPI-t ettevaatlikult; kasutage kindaid ja laborikitiit.
- Ärge kasutage, kui vial(id) on kahjustatud või kui viali sisu on mistahes viisil rikutud.
- Tootejäätmete ohutuks käitlemiseks järgige kohalikke jäätmekäitluseeskirju ja kemikaali ohutuskaardil toodud soovitusi. See kehtib ka kahjustatud analüüsikomplekti sisule.
- Vabaneged kõigist kasutatud reaktiividest ja muudest saastunud ühekordseks kasutuseks ette nähtud vahenditest nakkusohutike või potentsiaalselt nakkusohutike jäätmekäitlemise eeskirjade kohaselt. Iga labor peab ise vedelaid ja tahkeid jäätmekäitlema vastavalt nende loomusele ja ohtlikkuse tasemele ning tagama nende käitlemise ja kõrvaldamise (või laskma need käidelda ja kõrvaldada) vastavalt kehtivatele eeskirjadele.
- Kasutajad peavad olema suutelised eristama punast, sinist ja rohelist värvi.
- Esitatud protokoll ja reaktiivide järgimata jätmine võib mõjutada analüüsi jõudlust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.

- Sondi ei tohiks lahjendada ega segada teiste sondidega.
- Kui enne denaturatsiooni ei kasutata 10 µl sondi, nagu on protokollis ette nähtud, siis võib see mõjutada analüüsi jõudlust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.
- Kõiki tooteid tuleb enne kasutamist valideerida.
- 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 kehtivusaaja lõpuni, mis on esitatud toote etiketil. Sondi ja vastandvärvi vialale tuleb säilitada pimedas.



FISH-i sond, pleekimisvastane DAPI ES vastandvärv ja hübriidsatsioonilahus säilitavad stabiilsuse normaalse kasutamise ajal esinevate sulatamise ja külmutamise tsüklite kestel (kus üks tsüklil kestab sondi eemaldamisest külmikust kuni sinna tagasipanekuni) – 5 tsüklit 50 µl (5 analüüsi) FISH-i sondi viala puhul, 10 tsüklit 100 µl (10 analüüsi) FISH-i sondi

viala puhul ja 15 tsüklit 150 µl (15 analüüsi) vastandvärvi viala puhul. Kokkupuudet valgusega tuleb piirata ja võimaluse korral alati vältida. Hoidke komponente kaasas olevas valguskindlas mahutis. Siltidel märgitud erinevatel tingimustel säilitatud ja kasutatud komponendid ei pruugi oodatud viisil toimida ja võivad ebasoodsalt mõjutada analüüsitulemusi. Piirake iga hinna eest kokkupuudet valgusega ja temperatuurimuutustega.

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

Kasutada tuleb kalibreeritud seadmeid.

- Kuumutusplaat (täisplaadi ja täpse temperatuuriregulaatoriga kuni 80 °C)
- Kalibreeritud erineva mahuga mikropipetid ja otsikud vahemikus 1–200 µl
- Vesivann, täpse temperatuuriregulaatoriga 37 °C ja 72 °C juures
- Mikrotsentrifuugi katsutid (0,5 ml)
- Florestsentsmikroskoop (vt jaotist Florestsentsmikroskoobi soovitusel)
- Faasikontrastmikroskoop
- Läbipaistvast plastist, keraamilised või kuumakindlast klaasist Coplini anumad
- Pintsetid
- Kalibreeritud pH-meeter (või pH indikaatorribad vahemikus pH 6,5–8,0)
- Niiskuskamber
- Florestsentsmikroskoobi immersioonõli
- Lauatsentrifuug
- Mikroskoobi alusklaasid
- 24×24 mm katteklasaadid
- Taimer
- 37 °C inkubaator
- Katteklaasi liim
- Vortex-segisti
- Gradueeritud silindrid
- Magnetsegisti
- Kalibreeritud termomeeter

#### Valikulised seadmed, mida ei tarnita

- Tsütogeneetiline kuivatuskamber

#### Vajalikud reaktiivid, mida ei tarnita

- 20-kordne naatriumsitraadi soolalahus (SSC)
- 100% etanool
- Tween-20
- 1M naatriumhüdroksiid (NaOH)
- 1M vesinikloriid (HCl)
- Destilleeritud vesi

#### Florestsentsmikroskoobi soovitusel

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

Fluorfoor	Eksitatsioon <sub>max</sub> [nm]	Emissioon <sub>max</sub> [nm]
Rohekassinine	418	467
Roheline	495	521
Punane	596	615

Veenduge, et asjakohased eksitatsiooni- ja emissioonifiltrid, mis hõlmavad eespool esitatud lainepikkusi, on mikroskoopi paigaldatud.

Kasutage ühe rohekassinise spektri läbilaskevõimega filtrit rohekassinise spektri optimaalseks visualiseerimiseks või kolme spektri läbilaskevõimega punase spektri/roheline spektri/sinise spektri filtrit roheline, punase ja rohekassinise fluorofoori samaaegselt visualiseerimiseks.

Kontrollige enne kasutamist florestsentsmikroskoopi, et veenduda selle korrasolekus. Kasutage immersioonõli, mis on florestsentsmikroskoopi jaoks sobiv ja on madala autoflorestsentsiga. 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/atseetahape) fikseeritud hematoloogiliselt tuletatud rakuspensioonides, mis pärinevad kinnitatud või kahtlustatud ägeda müeloidse leukeemia (AML) või müelodüsplastiliste neoplasmidega (MDS) patsientidelt, ja ette valmistatud vastavalt labori või asutuse eeskirjadele. Valmistage ette õhu käes kuivatatud proovid mikroskoobi alusklaasidel vastavalt tsütogeneetika standardprotseduuridele. AGT *Tsütogeneetika laborijuhend* sisaldab soovitusi proovi kogumise, kultuuri istutamise, kogumise ja alusklaasi tegemise kohta.<sup>4</sup>

#### Lahuse ettevalmistamine

##### Etanooli lahused

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

- 70%-line etanool – 7 osa 100% etanooli suhtes 3 osa destilleeritud vett
  - 85%-line etanool – 8,5 osa 100% etanooli suhtes 1,5 osa destilleeritud vett
- Säilitage lahuseid kuni 6 kuud toatemperatuuril õhukindlas nõus.

##### 2-kordne SSC lahust

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 lahust

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 lahust

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.

#### FISH-i protokoll

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

#### Alusklaasi ettevalmistamine

- Tiigutage rakuproov mikroskoobi klaasist alusklaasile. Laske kuivada. (**Valikuline, kui kasutatakse tsütogeneetilist kuivatuskambrit:** rakuproovi optimaalseks valmistamiseks tuleks kambrit kasutada temperatuuril ligikaudu 25 °C ja õhuniiskusel 50%. Kui tsütogeneetiline kuivatuskamber ei ole kättesaadav, kasutage alternatiivina tõmbekappi).
- Kastke alusklaasid toatemperatuuril 2 minutiks 2-kordsesse SSC lahusesse ilma segamata.
- Dehüdreerige etanoolilahuste seerias (70%, 85% ja 100%), igas 2 minutit toatemperatuuril.
- Laske kuivada.

#### Enne denaturatsiooni

- Eemaldage sond külmikust ja laske sellel soojeneda toatemperatuuril. Tsentrifugeerige katsuteid lühidalt enne kasutamist.
- Veenduge, et sondi lahust on ühtlaselt segunenud, kasutades pipetti.
- Eemaldage 10 µl sondi analüüsi kohta ja viige see mikrotsentrifuugi katsutisse üle. Pange ülejäänud sond kiiresti külmikusse tagasi.
- Asetage sond ja proovislaadid 5 minutiks kuumutusplaadile eelsoojenema temperatuuril 37 °C (+/- 1 °C).
- Tiigutage 10 µl sondisegu rakuproovile ja asetage ettevaatlikult katteklasaad. Lisage katteklasaadi liim ja laske liimil täielikult kuivada.

#### Denaturatsioon

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

#### Hübriidsatsioon

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

#### Hübriidsatsioonijärgsed pesud

- Eemaldage DAPI külmikust ja laske soojeneda toatemperatuuril.
- Eemaldage ettevaatlikult katteklasaadid ja kõik liimijäljed.
- Kastke slaidid 2 minutiks ilma segamata 0,4-kordsesse SSC lahusesse (pH 7,0) temperatuuril 72 °C (+/- 1 °C).
- Kuivatage slaid ja kastke see 30 sekundiks ilma segamata 2-kordsesse SSC lahusesse, 0,05% Tween-20 lahusesse, toatemperatuuril (pH 7,0).
- Kuivatage slaid ja lisage igale proovile 10 µl pleekimisvastast DAPI-d.
- Katke katteklasaadiga, eemaldage mullid ja laske värvil pimedas kujuneda 10 minutit.
- Vaadake florestsentsmikroskoobiga (vt **Florestsentsmikroskoobi soovitusel**).

#### Protseduuri soovitusel

- Slaidide keetmine või aegumine võib florestsentssignaali nõrgendada.
- Cytocell Ltd. poolt toodetud või soovitatud reaktiivide asemel muude reaktiivide kasutamine võib ebasoodsalt mõjutada hübriidsatsioonitingimusi.

- Kasutage lahuste, vesivannide ja inkubaatorite temperatuuri mõõtmisel kalibreeritud termomeetrit, sest need temperatuurid on toote optimaalseks jõudluseks kriitilise tähtsusega.
- Pesukontsentratsioonid, pH ja temperatuurid on olulised, kuna vähene rangus võib põhjustada sondi ebaspetsiifilist sidumist ja liiga suur rangus võib põhjustada signaali puudumist.
- Mittetäielik denatureerimine võib põhjustada signaali puudumist ja üleliigne denatureerimine võib samuti põhjustada ebaspetsiifilist seondumist.
- Üleliigne hübridisatsioon võib põhjustada täiendavaid või ootamatuid signaale.
- Kasutajad peaksid enne analüüsi kasutamist diagnostilisel eesmärgil protokollid oma proovidega optimeerima.
- Suboptimaalsed tingimused võivad põhjustada ebaspetsiifilist seondumist, mida võidakse ekslikult sondi signaalina tõlgendada.

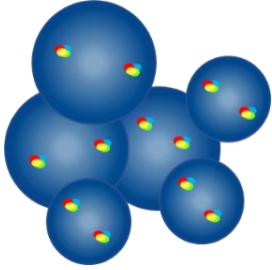
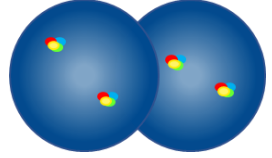
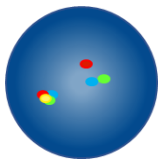
#### Tulemuste tõlgendamine Slaidi kvaliteedi hindamine

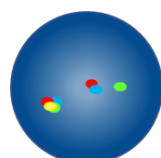
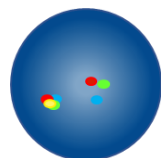
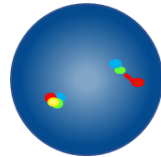
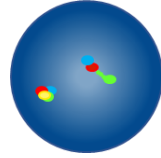
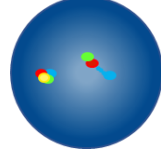
Slaidi ei tohiks analüüsida, kui:

- signaalid on ühe filtriga analüüsimiseks liiga nõrgad – analüüsi jätkamiseks peaksid signaalid olema eredad, selged ja lihtsalt hinnatavad;
- liiga palju kokkukleepunud/kattuvasid 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 teravilised.

#### Analüüsi eeskirjad

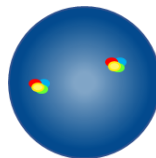
- Igat proovi peaks analüüsima ja tõlgendama kaks analüütikut. Kõik lahknemused tuleks lahendada kolmanda analüütiku hinnanguga.
- Analüütikud peaksid olema riiklikult tunnustatud standardite kohase väljaõppega.
- Iga analüütik peaks hindama eraldi 100 tuuma iga proovi kohta. Esimene analüütik peaks alustama slaidi vasakult küljelt ja teine analüütik paremalt küljelt.
- Iga analüütik peaks oma tulemused üles märkima eraldi andmekandjale.
- Analüüsige vaid teravilikke tuumi, mitte kattuvasid või kokkukleepunud või tsütöplasma jääkidega kaetud ega tugevasti autofluorestseerivaid tuumi.
- Vältige alasid, kus esineb liigseid tsütöplasma jääke või ebaspetsiifilist hübridisatsiooni.
- Signaali tugevus võib vahelduda, isegi ühe tuuma piires. Sellistel juhtudel kasutage üksikfiltrid 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 kui kaht signaali ühendab ähmane niit, lugege signaalid üheks.
- Kui kolmevärviliste lahutatavate sondide analüüsimisel ei ole mistahes 3 signaali (punane, roheline, rohekassinine) 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 tuuma kõiki alasid ei ole näha
	Lugeda 2 fusioonsignaalina, kui punase ja rohelise/rohekassinise signaali vaheline tühimik on kahest sondi pikkusest väiksem

	Lugeda 2 fusioonsignaalina, kui rohelise ja punase/rohekassinise signaali vaheline tühimik on kahest sondi pikkusest väiksem
	Lugeda 2 fusioonsignaalina, rohekassinine ja punase/rohelise signaali vaheline tühimik on kahest sondi pikkusest väiksem
	Lugeda 2 fusioonsignaalina, punane signaal on ülemises parempoolses fusioonis difuusne
	Lugeda 2 fusioonsignaalina, roheline signaal on ülemises parempoolses fusioonis difuusne
	Lugeda 2 fusioonsignaalina, rohekassinine signaal on ülemises parempoolses fusioonis difuusne

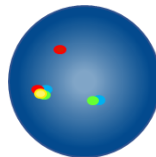
#### Eeldatavad tulemused

##### Eeldatav normaalne signaalimuster

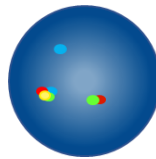


Normaalse raku eeldatav tulemus on kaks punast/rohelist/rohekassinist fusioonsignaali (2PRRo).

##### Eeldatavad ebanormaalsed signaalimustrid



Aberratsioon  $t(3;3)(q21;q26.2)$  või  $t(3;v)(q26.2;v)$  rakus, mille murdepunkt on rohelise sondi suhtes distaalne, eeldatav signaalimuster on üks punane/roheline/rohekassinine fusioonsignaali, üks roheline/rohekassinine fusioon ja üks punane signaal (1PRRo1RRo1P).



Aberratsioon  $inv(3)(q21q26.2)$  või  $t(3;v)(q26.2;v)$  rakus, mille murdepunkt on rohelise sondi suhtes proksimaalsed, eeldatav signaalimuster on üks punane/roheline/rohekassinine fusioonsignaali, üks punane/roheline fusioon ja üks rohekassinine signaal (1PRRo1PR1Ro).

Aneuploidsete/tasakaalustamata proovides võivad esineda teised signaalimustrid.

## Teadaolevad asjakohased segajad / segavad ained

Teadaolevaid asjakohaseid segajaid / segavaid aineid pole teada.

Teadaolev ristreaktiivsus puudub.

## Teavitamine tõsisest juhtumist

Patsientidele / kasutajatele / kolmandatele osapooltele Euroopa Liidus ja identsete eeskirjadega riikides (määrus (EU) 2017/746 *In vitro* diagnostikameditsiiniseadmete kohta): kui seadme kasutamise käigus või seoses selle kasutamisega on leitud 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](mailto:vigilance@ogt.com)

Järelevalvet teostavate EU riiklike pädevate ametiasutuste loend on esitatud lehel: [https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts\\_en](https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en)

## Spetsiifilised toimivuskarakteristikud

### Analüütiline spetsiifilisus

Analüütiline spetsiifilisus on määratletud kui üksnes õige lookusega hübriidiseeritud signaalide protsentarv. Analüüsiti kaht kromosomaalset lookust viie proovi kõigis kahekümnes metafaasi rakus, saades 200 andmepunkti komponendi kohta. Iga hübriidiseeritud sondi asukoht kaardistati ja õige lookusega hübriidiseeritud metafaasi kromosoomi FISH-i signaalide arv salvestati.

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

Tabel 1. Sondi EV11 (MECOM) Breakapart Probe analüütiline spetsiifilisus

Sihimärk	Hübriidiseeritud metafaasi kromosoomide arv	Õigesti hübriidiseeritud lookuste arv	Analüütiline spetsiifilisus	95% usaldusvahemik
3q26.2	200	200	100%	98,12–100%
3q26.2	200	200	100%	98,12–100%
3q26.2	200	200	100%	98,12–100%

### Analüütiline tundlikkus

Analüütiline tundlikkus on hinnatavate interfaasi rakkude protsent eeldatava normaalse signaalimustris suhtes. Iga 25 fikseeritud luuüdirakuspensiooni korral tunnistati MECOM-i ümberkorralduse suhtes negatiivseks, analüüsiti vähemalt 200 interfaasi raku, saades tulemuseks vähemalt 5000 tuuma iga proovi tüübi kohta. Tundlikkuse andmeid analüüsiti normaalse eeldatava signaalimustriga rakkude protsendi alusel ja väljendati protsendina 95% usaldusvahemikuga.

Tabel 2. Sondi EV11 (MECOM) Breakapart Probe analüütiline tundlikkus

Proovi tüüp	Tundlikkuse kriteeriumid	Tundlikkuse tulemus
Luuüdi	> 95%	99,14% (98,89%...99,39%)

### Normaalse väljaarvamise piirväärtuste kirjeldus

Normaalne väljaarvamine määratletakse nende rakkude protsendina, mis näitavad valepositiivset signaalimustrit, mille korral isik loetakse normaalseks ja kliinilisele diagnoosile mitteavastavaks. Iga 25 luuüdi proovi korral, mis tunnistati MECOM-i ümberkorraldus kustutamise suhtes negatiivseks, analüüsiti vähemalt 200 interfaasi raku, saades tulemuseks vähemalt 5000 tuuma iga proovi tüübi kohta.

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

Tabel 3. Sondi EV11 (MECOM) Breakapart Probe normaalse väljaarvamise piirväärtuste kirjeldus

Proovi tüüp	Väljaarvamise tulemus
Luuüdi	4%

Laborid peavad oma andmete põhjal kinnitama väljaarvamise piirväärtused<sup>5,6</sup>.

### Reprodutseeritavus

Tehti järgmised reprodutseeritavuse uuringud:

- 3 uuringukoha päevisine reprodutseeritavus (proov-prooviga)
- 3 uuringukoha päevadevaheline reprodutseeritavus (päev-päevaga)
- 3 uuringukoha uuringukohtadevaheline reprodutseeritavus (uuringukoht-uuringukohaga)
- ühe uuringukoha partiidevaheline reprodutseeritavus (partii-partiiga)

Reprodutseeritavus tehti kindlaks 3 eraldi labori poolt, kes testisid 12 pimedat proovi, 6 signaalimustrit kohta (2 ümberkorralduse suhtes negatiivset, 2 nõrgalt positiivset proovi, mis ületasid piirväärtust 1–3 korda, ja 2 tugevalt positiivset proovi, mis sisaldasid üle 45% ümberkorralduse suhtes positiivseid rakke). Analüüs viidi läbi iga proovist 2 replikaadiga 5 mittejärjestikusel päeval.

Kõik 3 asutust viisid läbi päevisese, päevadevahelise ja uuringukohtadevahelise testimise, kasutades ühte ja sama sondi partiid, samas kui üks asutus teostas ka partiidevahelise reprodutseeritavuse testimise, kasutades 3 erinevat sondi partiid.

Tulemused esitati üldise ühilduvusena prognoositud negatiivse klassiga (negatiivsete proovide korral) ja prognoositud positiivse klassiga (positiivsete proovide korral).

Tabel 4a. Sondi EV11 (MECOM) Breakapart Probe reprodutseeritavus ja täpsus – inversiooni signaalimuster

Muutuja	Proovi tüüp	Ühilduvus
Päevisine (proov-prooviga), päevadevaheline (päev-päevaga) ja uuringukohtadevaheline reprodutseeritavus (uuringukoht-uuringukohaga)	Luuüdi, negatiivne	100%
	Luuüdi, nõrgalt positiivne	63%
	Luuüdi, tugevalt positiivne	100%
Partiidevaheline (partii-partiiga) reprodutseeritavus	Luuüdi, negatiivne	92%
	Luuüdi, nõrgalt positiivne	67%
	Luuüdi, tugevalt positiivne	100%

Tabel 4b. Sondi EV11 (MECOM) Breakapart Probe reprodutseeritavus ja täpsus – translokatsiooni signaalimuster

Muutuja	Proovi tüüp	Ühilduvus
Päevisine (proov-prooviga), päevadevaheline (päev-päevaga) ja uuringukohtadevaheline reprodutseeritavus (uuringukoht-uuringukohaga)	Luuüdi, negatiivne	100%
	Luuüdi, nõrgalt positiivne	98%
	Luuüdi, tugevalt positiivne	100%
Partiidevaheline (partii-partiiga) reprodutseeritavus	Luuüdi, negatiivne	100%
	Luuüdi, nõrgalt positiivne	100%
	Luuüdi, tugevalt positiivne	100%

Viidi läbi reprodutseeritavuse lisauuring inversiooni signaalimustris nõrgalt positiivsete tulemuste täiendamiseks, kasutades 2 erinevat nõrgalt positiivsete tasemetega proovi (2x ja 4x piirväärtus) ja 1 negatiivset proovi, et teha kindlaks:

- ühe uuringukoha päevisine reprodutseeritavus (proov-prooviga);
- ühe uuringukoha päevisine reprodutseeritavus (päev-päevaga);
- ühe uuringukoha kasutajasisene reprodutseeritavus (kasutaja-kasutajaga).

Reprodutseeritavuse kindlaks tegemiseks kasutati 1 sondi partiid, hinnati iga proovi 2 replikaati ning testiti 2 erineva kasutaja poolt 5 mittejärjestikusel päeval.

Tulemused esitati üldise ühilduvusena prognoositud positiivse klassiga (positiivsete proovide korral).

Tabel 4c. Sondi EV11 (MECOM) Breakapart Probe reprodutseeritavuse ja täpsuse täiendavad toetavad andmed – inversiooni signaalimuster

Muutuja	Proovi tüüp	Ühilduvus
Päevisine (proov-prooviga), päevadevaheline (päev-päevaga) ja kasutajatevaheline reprodutseeritavus (kasutaja-kasutajaga)	Luuüdi, nõrgalt positiivne (2x piirväärtus)	100%
	Luuüdi, nõrgalt positiivne (4x piirväärtus)	100%

### Kliiniline toimivus

Tagamaks, et toode tuvastab ettenähtud ümberkorraldused, tehti toote kliiniline toimivus kindlaks toote sihtpopulatsiooni esindusproove hõlmava 3 uuringuga: Carnoy lahuses (3:1 metanool/atseethape) fikseeritud hematoloogiliselt tuletatud rakuspensioonides mis pärinevad kinnitatud või kahtlustatud ägeda müeloidse leukeemia (AML) või müelodüsplastilise neoplaskasvaja (MDS) patsientidelt. Uuringutes kombineeriti sajakaheksateistkümnest (118) proovist koosnevat valimi suurust, mille sihtpopulatsioon oli seitse (7) translokatsiooni positiivset ja sadaüksteist (111) translokatsiooni negatiivset ning kombineeritud sajaühksateistkümnest (119), mille hulka kuulusid sadaüksteist (111) inversiooni negatiivset ja kaheksa (8) inversiooni positiivset proovi. Tulemusi võrreldi proovi teadaoleva olekuga. Tulemuste ühilduvuse/ebakõla tulemused vastasid selle uuringu vastuvõetakriteeriumidele.

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



Tabel 5. Sondid EVI1 (MECOM) Breakapart Probe kliiniline toimivus – translokatsioon

Muutuja	Tulemus
Kliiniline tundlikkus (true positive rate, TPR) (tõeselt positiivsete määr) (tõeselt positiivsete määr)	99,94%
Kliiniline spetsiifilisus (true negative rate, TNR) (tõeselt negatiivsete määr)	99,97%
Valepositiivsete määr (false positive rate, FPR) = 1–spetsiifilisus	0,03%

Tabel 6. Sondid EVI1 (MECOM) Breakapart Probe kliiniline toimivus – inversioon

Muutuja	Tulemus
Kliiniline tundlikkus (true positive rate, TPR) (tõeselt positiivsete määr)	96,26%
Kliiniline spetsiifilisus (true negative rate, TNR) (tõeselt negatiivsete määr)	99,28%
Valepositiivsete määr (false positive rate, FPR) = 1–spetsiifilisus	0,72%

#### Ohutuse ja toimivuse kokkuvõte (SSP)

SSP 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: 50558449LPH036JL

Kui Eudamed ei toimi täielikult, tehakse OTK avalikkusele ligipääsetavaks nõudmisel meili teel [SSP@ogt.com](mailto:SSP@ogt.com).









#### Lisateave







Lisateavet saate, kui võtate ühendust ettevõtte CytoCell tehnilise toe osakonnaga. Tel: +44 (0)1223 294048 E-post: [techsupport@cytozell.com](mailto:techsupport@cytozell.com) Veebisait: [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

#### Viited

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 H.J. (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.

#### Sümbolite sõnastik

EN ISO 15223-1:2021 – „Meditsiiniseadmed – Sümbolid, mida kasutatakse koos tootja poolt esitatava teabega – 1. osa: Üldnõuded“ (© International Organization for Standardization)		
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

	et: Lugege elektroonilist kasutusjuhendit	5.4.3
	et: Hoiatus!	5.4.4
	et: <i>In vitro</i> diagnostikameditsiiniseade	5.5.1
	et: Sisaldus piisav <n> analüüsi jaoks	5.5.5
	et: Seadme unikaalne identifikaator	5.7.10
<b>IVD reaktiivide ja komponentide EDMA sümbolid, 2009. a oktoobri väljaanne</b>		
Sümbol	Pealkiri	Viitenumber (-numbrid)
	et: Sisu (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@cytozell.com](mailto:probes@cytozell.com)  
Veebisait: [www.ogt.com](http://www.ogt.com)



#### Sysmex Europe SE

Bornbarch 1  
22848 Norderstedt  
SAKSAMAA

Tel: +49 40 527260  
Veebisait: [www.sysmex-europe.com](http://www.sysmex-europe.com)

#### Kasutusjuhendi versioonialalugu

V001 2024-02-05: Uus kasutusjuhend kooskõlas määrusega (EL) 2017/746