



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika (IFU)

REF: CE-LPH 038-S / CE-LPH 038

BCR/ABL (ABL1) Plus Translocation, Dual Fusion Probe



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO



Dalsze informacje oraz dokumenty w innych językach są dostępne pod adresem ogt.com/IFU

Przeznaczenie

Produkt CytoCell® BCR/ABL (ABL1) Plus Translocation, Dual Fusion Probe to jakościowy, nieautomatyzowany test wykonywany metodą fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ* (Fluorescence In Situ Hybridisation, FISH) przeznaczony do detekcji chromosomowych rearanżacji zachodzących między regionem 9q34.1 zlokalizowanym na chromosomie 9. a regionem 22q11.2 zlokalizowanym na chromosomie 22., wraz z towarzyszącymi im (lub nie) delecjami części genu *ASS1* zlokalizowanej w regionie 9q34.1 na chromosomie 9., w utrwalonych w roztworze Carnoya (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1) zawiesinach komórek pochodzenia hematologicznego pobranych od pacjentów z rozpoznaniem lub podejrzeniem przewlekłej białaczki szpikowej (Chronic Myeloid Leukaemia, CML), ostrej białaczki szpikowej (Acute Myeloid Leukaemia, AML) lub ostrej białaczki limfoblastycznej (Acute Lymphoblastic Leukaemia, ALL).

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 translokacji *BCR::ABL1* i delecji genu *ASS1* w istotny sposób wpływałaby na postępowanie kliniczne.

Ograniczenia

Ten wyrób jest przeznaczony do wykrywania rearanżacji z miejscami złamań w regionie objętym czerwonymi i zielonymi klonami lub delecji w regionie objętym błękitnymi klonami zawartymi w tym zestawie sond. Regiony te obejmują geny *ABL1*, *BCR* i *ASS1*. Wyrób ten może nie umożliwić wykrycia miejsc złamań, do których doszło poza tymi regionami, wariantowych rearanżacji całkowicie zawierających się w tych regionach lub częściowych ubytków tych regionów. 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, zgodne 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 hybrydizacja *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 hybrydizacji niezwiązane i nieswoiście związane sondy DNA są usuwane, a DNA jest barwiony kontrastowo w celu jego uwidocznienia. Sondy zhybrydowane do materiału docelowego można następnie obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Informacje o sondzie

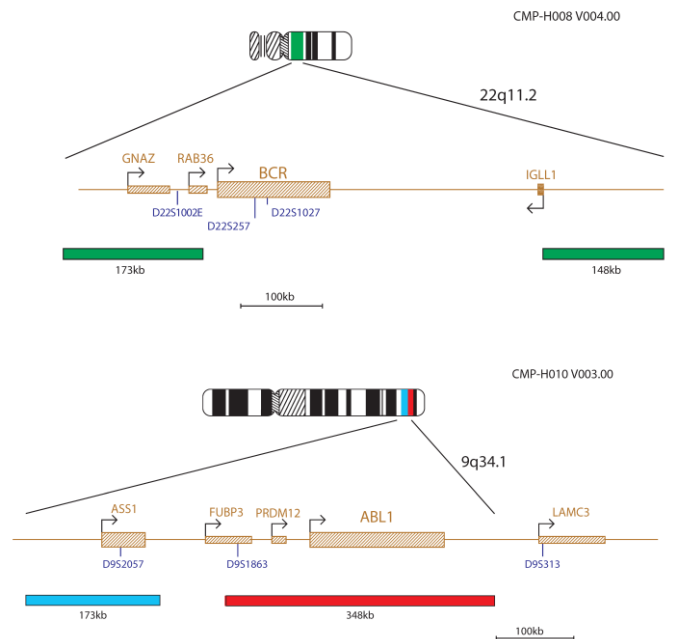
Gen *BCR* (BCR activator of RhoGEF and GTPase) jest zlokalizowany w regionie 22q11.2, gen *ABL1* (ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase) jest zlokalizowany w regionie 9q34.1, a gen *ASS1* (*argininosuccinate synthase 1*) jest zlokalizowany w regionie 9q34.1. Translokacja między genami *BCR* i *ABL1* powoduje powstanie genu fuzyjnego *BCR::ABL1*. Obecność fuzji *BCR::ABL1* ma istotne znaczenie diagnostyczne i prognostyczne w wielu chorobach układu krwiotwórczego.

Translokacja t(9;22)(q34.1;q11.2) jest cechą charakterystyczną przewlekłej białaczki szpikowej (CML) i jest wykrywana w około 90–95% przypadków tej choroby. W pozostałych przypadkach występuje wariantowa translokacja lub utrojona translokacja między regionami 9q34.1 i 22q11.2, których nie można zidentyfikować w ramach rutynowej analizy cytogenetycznej¹. Fuzje *BCR::ABL1* są również wykrywane w 25% przypadków ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) u dorosłych i w 2–4% przypadków ALL u dzieci¹. Rearanżacja ta jest również obserwowana w rzadkich przypadkach ostrej białaczki szpikowej (AML)².

Translokacji zachodzącej między chromosomem 9. a chromosomem 22. może towarzyszyć ubytek sekwencji proksymalnych pochodnego chromosomu 9., w tym regionu genu *ASS1* (*argininosuccinate synthase 1*)³.

Specyfikacja sondy

ASS1, 9q34.1, kolor błękitny
ABL1, 9q34.1, kolor czerwony
BCR, 22q11.2, kolor zielony



Mieszanina sond wyznakowanych zielonym fluoroforem zawiera sondę o długości 173 kZ, położoną centromerycznie względem genu *BCR*, obejmującą geny *GNAZ* i *RAB36*. Druga sonda wyznakowana zielonym fluoroforem obejmuje region o długości 148 kZ, położony telomerycznie względem genu *BCR* i zawierający część genu *IGLL1*.

Mieszanina sond wyznakowanych czerwonym i błękitnym fluoroforem zawiera sondę wyznakowaną czerwonym fluoroforem o długości 348 kZ, obejmującą gen *ABL1*, oraz sondę wyznakowaną błękitnym fluoroforem o długości 173 kZ, obejmującą gen *ASS1*.

Dostarczone materiały

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

Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydizacyjnym (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

1. Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego w laboratorium.
2. 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.
3. Zachować ostrożność podczas pracy z barwnikiem DAPI; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny.
4. Nie używać produktu, jeśli fiolka jest uszkodzona lub jej zawartość została w jakikolwiek sposób naruszona.
5. W celu bezpiecznego usuwania tego produktu należy postępować zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi usuwania odpadów oraz zaleceniami zawartymi w karcie charakterystyki (SDS). Dotyczy to również zawartości uszkodzonego zestawu do testów.
6. 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.
7. Operatorzy muszą być w stanie rozróżnić czerwony, niebieski i zielony kolor.
8. Nieprzestrzeganie wskazanego protokołu oraz nieużywanie właściwych odczynników może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.
9. Nie należy rozcieńczać sondy ani mieszać jej z innymi sondami.
10. 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.
11. Przed użyciem produktów należy poddać je walidacji.
12. Kontrole 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 hybrydacyjny zachowują stabilność przez wszystkie cykle zamrażania i rozmrażania wykonywane podczas standardowego użytkowania produktów (jeden cykl jest definiowany jako wyjęcie fiolki z zamrażarki i ponowne umieszczenie jej w zamrażarce) — 5 cykli w przypadku fiolki

zawierającej 50 µl (5 testów) sondy FISH, 10 cykli w przypadku fiolki zawierającej 100 µl (10 testów) sondy FISH i 15 cykli w przypadku fiolki zawierającej 150 µl (15 testów) barwnika kontrastowego. Należy zminimalizować i możliwie ograniczyć 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:

1. Płyta grzewcza (ze stabilną płytą i możliwością dokładnej kontroli temperatury do 80°C)
2. Skalibrowane mikropipety i końcówki umożliwiające przenoszenie różnych objętości cieczy w zakresie 1–200 µl
3. Łażnia wodna z możliwością dokładnej kontroli temperatury na poziomie 37°C i 72°C
4. Probówki mikrowirówkowe (0,5 ml)
5. Mikroskop fluorescencyjny (patrz część „Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego”)
6. Mikroskop z kontrastem fazowym
7. Czyste barwiacze Coplina z tworzywa sztucznego, ceramiki lub szkła żaroodpornego
8. Szczypczyki
9. Skalibrowany pH-metr (lub papierki wskaźnikowe pH umożliwiające pomiar pH w zakresie 6,5–8,0)
10. Pojemnik zapewniający dużą wilgotność powietrza
11. Olejek imersyjny odpowiedni do obiektów mikroskopowych klasy fluorescencyjnej
12. Wirówka laboratoryjna
13. Szkiełka mikroskopowe
14. Szkiełka nakrywkowe o wymiarach 24x24 mm
15. Stoper
16. Inkubator nastawiony na temperaturę 37°C
17. Klej kauczukowy

18. Wytrząsarka
19. Cylindry miarowe
20. Mieszadło magnetyczne
21. Skalibrowany termometr

Opcjonalny sprzęt niedostarczany

1. Komora do suszenia próbek do badań cytogenetycznych

Odczynniki wymagane, ale niedostarczane

1. Roztwór soli fizjologicznej i cytrynianu sodu (SSC), 20x
2. Etanol, 100%
3. Tween-20
4. Wodorotlenek sodu (NaOH), 1 M
5. Kwas solny (HCl), 1 M
6. Woda oczyszczona

Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego

W celu optymalnej wizualizacji sondy zalecane jest używanie 100-watowej lampy rтciennej lub równoważnej lampy i obiektów 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 _{maks.} [nm]	Emisja _{maks.} [nm]
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 mieszanina barwnika DAPI antifade z mikroskopowym olejkim imersyjnym, ponieważ spowoduje to zaciemnienie sygnałów. Należy przestrzegać zaleceń wytwórcy 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. 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 preparatów⁴.

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 ograniczyć ekspozycję sondy i barwnika kontrastowego na światło w laboratorium).

Przygotowanie szkiełek

1. 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 probówkę.
- Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
- Pobrać 10 µl roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość do probówki 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 antyfady na każdą próbkę.
- Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić zajście reakcji barwnej.
- Obejrzeć pod mikroskopem fluorescencyjnym (patrz **Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego**).

Zalecenia dotyczące procedury

- Wypiekanie lub postarzanie 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

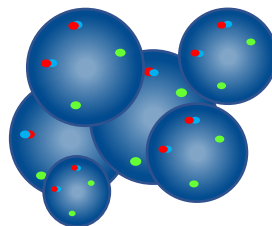
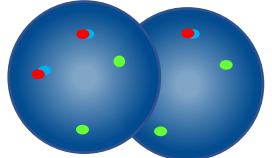
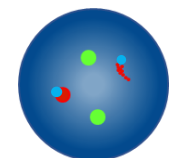
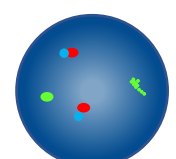
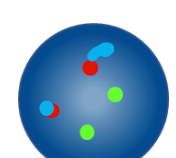
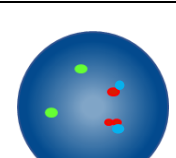
Preparatu nie należy oceniać w następujących przypadkach:

- 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 nieciągłe.

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 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 dwa fuzyjne sygnały czerwone/błękitne i dwa sygnały zielone — jeden z dwóch sygnałów czerwonych jest rozlany
	Zliczyć jako dwa fuzyjne sygnały czerwone/błękitne i dwa sygnały zielone — jeden z dwóch sygnałów zielonych jest rozlany
	Zliczyć jako dwa fuzyjne sygnały czerwone/błękitne i dwa sygnały zielone — jeden z dwóch sygnałów błękitnych jest rozlany
	Zliczyć jako dwa fuzyjne sygnały czerwone/błękitne i dwa sygnały zielone — przerwa widoczna w przypadku jednego sygnału czerwonego jest mniejsza niż dwie szerokości sondy

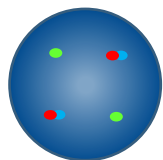


Zliczyć jako dwa fuzyjne sygnaly czerwone/błękitne i dwa sygnaly zielone — przerwa widoczna między sygnalami czerwonymi a sygnalami błękitnymi jest mniejsza niż dwie szerokości sondy

Wyniki oczekiwane

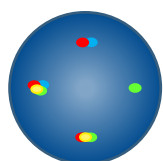
Oczekiwany wzorec sygnału wskazujący na stan prawidłowy

Trzykolorowe sondy Dual Fusion Probe

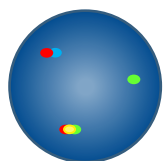


W komórce prawidłowej oczekiwane są dwa fuzyjne sygnaly czerwone/błękitne i dwa sygnaly zielone (2CB2Z).

Oczekiwane wzorce sygnału wskazujące na stan nieprawidłowy



Oczekiwany wzorec sygnału w komórce z rearanżacją t(9;22)(q34.1;q11.2) to jeden fuzyjny sygnal czerwony/błękitny, jeden sygnal zielony, jeden fuzyjny sygnal czerwony/zielony i jeden fuzyjny sygnal czerwony/zielony/błękitny (1CB1Z1CZ1CZB).



Oczekiwany wzorec sygnału w komórce z rearanżacją t(9;22)(q34.1;q11.2) i z delecją proksymalnej części regionu 9q i dystalnej części regionu 22q to jeden fuzyjny sygnal czerwony/błękitny, jeden sygnal zielony i jeden fuzyjny sygnal czerwony/zielony (1CB1Z1CZ).

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

Znane istotne zakłócenia/substancje zakłócające

Brak znanych istotnych zakłóceń/substancji zakłócających.

Znana reaktywność krzyżowa

Zielona dystalna sonda BCR może wykazywać 2 sygnaly w regionie 7q11.2 zlokalizowanym na chromosomie 7.

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 wytwórcy oraz właściwemu organowi krajowemu.

W przypadku wystąpienia poważnych incydentów w innych krajach fakt ten należy zgłosić wytwórcy oraz, jeśli ma to zastosowanie, właściwemu organowi krajowemu. Adres wytwórcy do kontaktu w sprawach dotyczących nadzoru nad produktami (ang. vigilance): 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

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 trzy (3) loci chromosomowe w każdej ze 100 komórek metafazowych w pięciu (5) próbkach, uzyskując łącznie 600 punktów danych. 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 BCR/ABL (ABL1) Plus Translocation, Dual Fusion Probe

Locus docelowe	Liczba chromosomów metafazowych, w których doszło do hybrydacji	Liczba loci, w których doszło do hybrydacji	Swoistość analityczna	95-procentowy przedział ufności
9q34.1	200	200	100%	98,12–100%
22q11.2	200	200	100%	98,12–100%
9q34.1	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 translokacji BCR::ABL1 i delecji genu ASS1 analizowano co najmniej 100 komórek interfazowych, uzyskując łącznie co najmniej 2500 jąder komórkowych poddanych ocenie dla każdego typu próbki. Dane dotyczące czułości przeanalizowano w oparciu o odsetek komórek wykazujących wzorec sygnału wskazujący na stan prawidłowy i wyrażono jako odsetek z 95-procentowym przedziałem ufności.

Tabela 2. Czułość analityczna dla produktu BCR/ABL (ABL1) Plus Translocation, Dual Fusion Probe

Typ próbki	Kryterium czułości	Wynik czułości
Szpiczek kostny	>95%	100,0% (± ND.)

Charakterystyka wartości odcięcia dla stanu prawidłowego

Wartość odcięcia dla stanu prawidłowego jest definiowana jako odsetek komórek wykazujących fałszywie dodatni wzorec sygnału, przy którym stan osoby należy uznać za prawidłowy i niezgodny z rozpoznaniem klinicznym. Dla każdej z 25 utrwalonych zawieszin komórek szpiku kostnego uznanych za ujemne pod kątem translokacji BCR::ABL1 analizowano co najmniej 100 komórek interfazowych, uzyskując łącznie co najmniej 2500 jąder komórkowych poddanych ocenie dla każdego typu próbki.

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

Tabela 3. Charakterystyka wartości odcięcia dla stanu prawidłowego dla produktu BCR/ABL (ABL1) Plus Translocation, Dual Fusion Probe

Typ próbki	Wzorec sygnału	Wartość odcięcia
Szpiczek kostny	1CB1Z1CZ	2,95%
	1CB1Z1CZ1CZB	2,95%

Laboratoria muszą zweryfikować wartości odcięcia w oparciu o własne dane^{5,6}.

Precyzja

Precyzję tego produktu zmierzono w kategoriach precyzji w ramach dnia (między próbkami), precyzji między dniami oraz precyzji między seriami w jednym ośrodku.

Do oceny precyzji tego produktu wykorzystano trzy próbki — pozostałości materiału utrwalonego za pomocą roztworu metanol/kwas octowy w stosunku 3:1 z próbek szpiku kostnego, z których usunięto dane umożliwiające identyfikację, pozyskanych z banku próbek utrwalonych komórek Cytocell. Wielkość próby wynosiła trzy (3) próbki obejmujące oczekiwany zakres wyników prawidłowych i nisko dodatnich.

W celu ustalenia precyzji między dniami i w ramach dnia próbki poddawano ocenie w dziesięciu (10) nienastępujących po sobie dniach, a w celu ustalenia precyzji między seriami trzy (3) serie produktu poddawano ocenie poprzez wykonanie trzech (3) powtórzeń dla tej samej próbki. Wyniki przedstawiono jako zgodność ogółem z przewidywaną klasą ujemną (dla próbek ujemnych).

Tabela 4. Odtwarzalność i precyzja dla produktu BCR/ABL (ABL1) Plus Translocation, Dual Fusion Probe

Zmienna	Typ próbki	Zgodność
Odtwarzalność w ramach dnia (między próbkami) i między dniami	Ujemne komórki szpiku kostnego	96,7%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego 1CB1Z1CZ	96,7%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego 1CB1Z1CZ1CZB	83,3%
Odtwarzalność między seriami	Ujemne komórki szpiku kostnego	100,0%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego 1CB1Z1CZ	100,0%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego 1CB1Z1CZ1CZB	77,8%

Skuteczność kliniczna

W celu zapewnienia, że produkt wykrywa rearanżacje, do których oceny jest przeznaczony, ustalono skuteczność kliniczną produktu w oparciu o dwa badania wykonane na reprezentatywnych próbkach docelowej populacji pacjentów, czyli próbkach utrwalonych w roztworze Carnoya (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1) zawieszonych komórek pochodzenia hematologicznego pobranych od pacjentów z rozpoznaniem lub podejrzeniem przewlekłej białaczki szpikowej (CML), ostrej białaczki szpikowej (AML) lub ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL), przygotowanych zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w laboratorium lub placówce. Badania obejmowały łącznie 125 próbek, w tym 99 próbek ujemnych względem translokacji BCR::ABL1 i 26 próbek dodatnich względem translokacji BCR::ABL1. Wyniki porównano ze znanym statusem próbki. Produkt zawierający sondy umożliwił prawidłową identyfikację statusu próbek we wszystkich przypadkach.

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 BCR/ABL (ABL1) Plus Translocation, Dual Fusion Probe

Zmienna	Wynik
Czułość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie dodatnich (True Positive Rate, TPR))	98,97%
Swoistość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie ujemnych (True Negative Rate, TNR))	99,73%
Odsetek wyników fałszywie dodatnich (False Positive Rate, FPR) = 1 – swoistość	0,27%

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: 50558449LPH038JQ

Jeśli baza danych Eudamed nie jest w pełni funkcjonalna, dokument SSP jest udostępniany publicznie na żądanie przesłane na adres e-mail SSP@ogt.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

Strona WWW: www.ogt.com

Piśmiennictwo

- 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 March 29]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 11). Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
- Soupir et al., Am J Clin Pathol 2007;127:642-650
- Robinson et al., Leukemia 2005;19(4):564-71
- Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. Genet Med. 2011;13(7):667-675.
- Wiktor AE, Dyke DLV, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16–23.

Glosariusz symboli

EN ISO 15223-1:2021 — „Wyroby medyczne — Symbole do stosowania wraz z informacjami dostarczanymi przez producenta — Część 1: Wymagania ogólne” (© International Organization for Standardization)		
Symbol	Tytuł	Numery referencyjne
	pl: Wytwórca	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: Zatrzyj do instrukcji używania	5.4.3
	pl: Zatrzyj do elektronicznej instrukcji używania ogt.com/IFU	5.4.3
	pl: Ostrzeżenie	5.4.4
	pl: Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>	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	Tytuł	Numery referencyjne
	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@cytozell.com

Strona WWW: www.ogt.com



Sysmex Europe SE

Bombarch 1
22848 Norderstedt
NIEMCY

Tel.: +49 40 527260

Strona WWW: www.sysmex-europe.com

Historia wersji dokumentu IFU

V001 2023-06-13: Nowy dokument IFU zgodny z Rozporządzeniem (UE) 2017/746.