



A Sysmex Group Company



## Instrukcja użytkownika (IFU)

REF: LPH 095 / LPH 095-S

### Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO



www.cytocell.com

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

#### Przeznaczenie

Produkt CytoCell® Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe to jakościowy, niezautomatyzowany test wykonywany metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) przeznaczony do detekcji chromosomowych delecji w regionach 5p15.3, 5q31.2 i 5q32-q33.1 chromosomu 5. w 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 (Acute Myeloid Leukaemia, AML) lub zespołu mielodysplastycznego (Myelodysplastic Syndrome, MDS).

#### Wskazania do stosowania

Ten produkt zaprojektowano jako produkt uzupełniający inne testy kliniczne i histopatologiczne wykonywane w ramach przyjętych ścieżek diagnostycznych i opieki klinicznej, w przypadku których znajomość statusu delecji regionu 5p15.3, 5q31.2 lub 5q32-q33.1 w istotny sposób wpływałaby na postępowanie kliniczne.

#### Ograniczenia

Ten wyrób jest przeznaczony do wykrywania ubytków genomowych większych niż region obejmujący regiony 5p15.3, 5q31.2 i 5q32-q33.1, obejmowany przez błękitne, czerwone i zielone klony zawarte w tym zestawie sond. Produkt ten może nie umożliwić wykrycia ubytków genomowych, do których doszło poza tym regionem, lub częściowych ubytków, do których doszło 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 cyto-genetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują do całych chromosomów lub pojedynczych unikalnych sekwencji, i stanowi istotne uzupełnienie cyto-genetycznej 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 dostępną 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 zhybrydowane do materiału docelowego można obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym.

#### Informacje o sondzie

Delecje długiego ramienia chromosomu 5. to jedne z najczęściej występujących nieprawidłowości kariotypowych występujących w zespołach mielodysplastycznych (MDS) i ostrej białaczce szpikowej (AML) ze zmianami związanymi z mielodysplazją<sup>1,2</sup>.

Podgrupa pacjentów z MDS, u których jedyną nieprawidłowością cyto-genetyczną jest delecja del(5q) lub dodatkowo występuje pojedyncza nieprawidłowość nieobejmująca chromosomu 7., charakteryzuje się typowym zestawem cech klinicznych, nazywanym zespołem 5q<sup>-1</sup>. Jest to jedyny podtyp MDS zdefiniowany pod względem cyto-genetycznym w systemie klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia. Ta jednostka kliniczna z odsetkiem blastów <5% ma korzystniejsze rokowanie. U pacjentów z delecją del(5q), u których występują dodatkowe nieprawidłowości cyto-genetyczne lub nadmierna liczba blastów, obserwowana jest jednak gorsza przeżywalność<sup>2,3</sup>.

W przeciwieństwie do zespołów MDS powstających de novo, rokowanie w białaczkach AML z delecją del(5q) jest ogólnie niekorzystne, zwłaszcza gdy nieprawidłowość ta występuje jako część kariotypu złożonego<sup>4</sup>. Delecja regionu 5q jest również często wykrywana w zależności od terapii t-MDS i t-AML, a rokowanie w tych przypadkach jest szczególnie złe<sup>1</sup>.

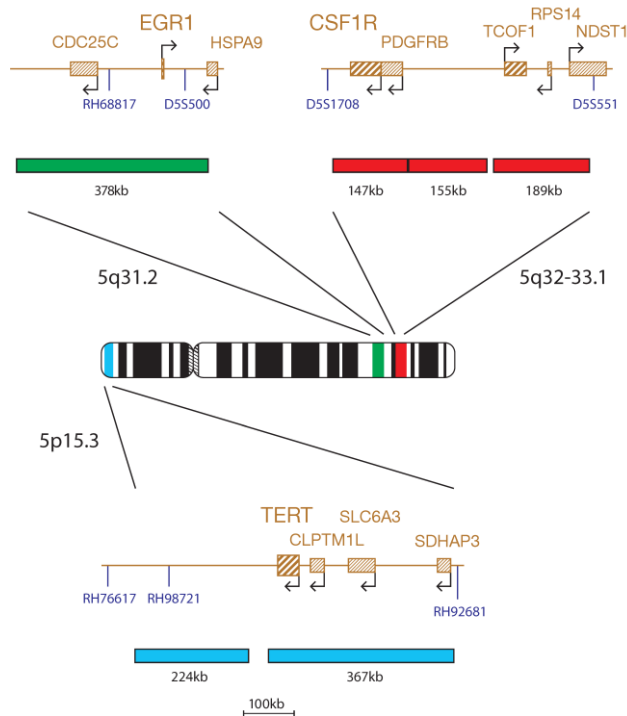
Na chromosomie 5q zmapowano dwa regiony chromosomalne powiązane z zespołem MDS i białaczką AML. Jeden region, który często ulega delecji, jest zlokalizowany w obszarze 5q33 i powiązany go z zespołem 5q-. Kolejny, położony bardziej proksymalnie region, zlokalizowany w regionie 5q31, powiązany z bardziej agresywną postacią zespołu MDS i białaczki AML i często towarzyszą mu dodatkowe nieprawidłowości cyto-genetyczne, a także gorsze rokowanie<sup>1,3,5</sup>.

Produkt CytoCell Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe umożliwia wykrycie delecji genu EGR1 (early growth response 1), który jest genem supresorowym nowotworu zlokalizowanym w regionie 5q31. Wykazano, że rozwój MDS/AML jest inicjowany w wyniku haploinsuficencji genu EGR1<sup>6</sup>. Sonda umożliwia również wykrycie delecji genu RPS14 (ribosomal protein S14) w regionie 5q33.1. U pacjentów z MDS z delecją del(5q) obserwowana jest haploinsuficjenca genu RPS14, która prowadzi do upośledzenia biogenezy rybosomów i wpływa na translację genów oraz aktywację białek zaangażowanych procesy różnicowania i apoptozy<sup>4</sup>. Sonda swoista względem genu TERT (telomerase reverse transcriptase) zlokalizowanego w regionie 5p15.3 ułatwi odróżnienie przypadków z delecją del(5q) od przypadków z monosomią chromosomu 5.

#### Specyfikacja sondy

TERT, 5p15.3, kolor błękitny  
EGR1, 5q31.2, kolor zielony  
CSF1R, 5q32-33.1, kolor czerwony

CMP-H122 v001.00



Mieszanka sond Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe zawiera trzy odrębne zestawy sond. Sonda wyznakowana zielonym fluoroforem (378 kZ) obejmuje geny CDC25C i EGR1 oraz ich regiony flankujące, które zawierają markery RH68817 i D5S500. Zestaw sond wyznakowanych czerwonym fluoroforem (147 kZ, 155 kZ i 189 kZ) obejmuje region między markerami D5S1708 i D5S551 oraz geny CSF1R, PDGFRB, TCOF1 i RPS14. Zestaw sond wyznakowanych błękitnym fluoroforem (224 kZ i 367 kZ) obejmuje region między markerami RH76617 i RH92681 oraz geny TERT, CLPTM1L, SLC6A3 i SDHAP3.

## 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; siarczan dekstranu; roztwór soli fizjologicznej i cytrynianu sodu (SSC)) 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).

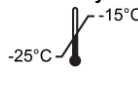
## Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego w laboratorium.
- Mieszanki 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.
- DAPI jest potencjalnym czynnikiem rakotwórczym. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny.
- Nie używać produktu, jeśli fiolka 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 (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.
- 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.



Sondy do badań techniką FISH, barwnik kontrastowy DAPI Antifade ES oraz roztwór hybrydizacyjny 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). 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:

- Płyta grzewcza (ze stabilną płytą i możliwością dokładnej kontroli temperatury do 80°C)
- Skalibrowane mikropipety i końcówki umożliwiające przenoszenie różnych objętości cieczy w zakresie 1–200 µl
- Łażnia 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

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 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 <sub>maks.</sub> [nm]	Emisja <sub>maks.</sub> [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 mieszania 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 zaprojektowano do użytku 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 preparatów<sup>7</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

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 próbki.
- Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
- Pobrać 10 µl roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość do próbki mikrowirowkowej. 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 rozwój barw.
- 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

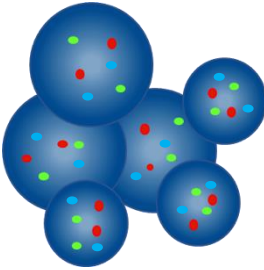
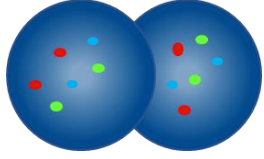
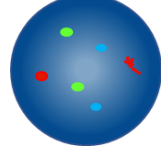
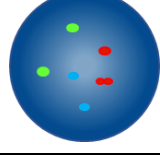
Preparatu nie należy oceniać w następujących przypadkach:

- 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 jądra komórkowego lub są one nieciągłe.

##### Wytyczne dotyczące analizy

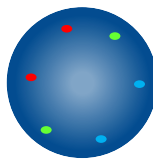
- Każda próbka powinna być analizowana i interpretowana przez dwóch analityków. Wszelkie rozbieżności powinny zostać rozwiązane w wyniku oceny dokonanej przez trzeciego analityka.
- Każdy analityk powinien posiadać odpowiednie kwalifikacje zgodne z normami krajowymi.

- 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 sygnały czerwone, dwa sygnały błękitne i dwa sygnały zielone — jeden z dwóch sygnałów czerwonych jest rozlany
	Zliczyć jako dwa sygnały czerwone, dwa sygnały błękitne i dwa sygnały zielone — przerwa widoczna w jednym sygnale czerwonym jest mniejsza niż dwie szerokości sygnału

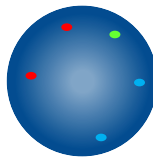
#### Wyniki oczekiwane

Oczekiwany wzorec sygnału wskazujący na stan prawidłowy



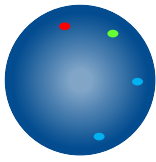
Oczekiwany wzorec sygnału w komórce prawidłowej to dwa sygnały błękitne, dwa sygnały zielone i dwa sygnały czerwone (2B2Z2C).

Oczekiwane wzorce sygnału wskazujące na stan nieprawidłowy

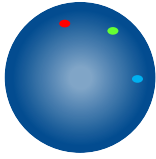


Oczekiwany wzorec sygnału w komórce z hemizygotyczną delecją regionu 5q31.2 to dwa sygnały błękitne, jeden sygnał zielony i dwa sygnały czerwone (2B1Z2C).





Oczekiwany wzorec sygnału w komórce z hemizygotyczną delecją regionu 5q to dwa sygnały błękitne, jeden sygnał zielony i jeden sygnał czerwony (2B1Z1C).



Oczekiwany wzorec sygnału w komórce z monosomią chromosomu 5. to jeden sygnał błękitny, jeden sygnał zielony i jeden sygnał czerwony (1B1Z1C).

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

Brak znanej reaktywności krzyżowej.

#### Zgłaszanie poważnych incydentów

Dotyczy pacjentów/użytkowników/podmiotów trzecich w Unii Europejskiej i w krajach o identycznym reżimie regulacyjnym (Dyrektywa 98/79/WE / 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](mailto:vigilance@ogt.com)

Wykaz punktów kontaktowych ds. nadzoru nad produktami (ang. vigilance) dla krajowych właściwych organów w UE jest dostępny na stronie: [https://ec.europa.eu/health/md\\_sector/contact\\_en](https://ec.europa.eu/health/md_sector/contact_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 6 loci chromosomowe w każdej z 20 komórek metafazowych w 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 Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe

Locus docelowe	Liczba chromosomów metafazowych, w których doszło do hybrydyzacji	Liczba loci, w których doszło do prawidłowej hybrydyzacji	Swoistość analityczna	95-procentowy przedział ufności
5q32-33.1	200	200	100%	98,12–100%
5q31.2	200	200	100%	98,12–100%
5p15.33	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 ze szpiku kostnego analizowano co najmniej 200 komórek interfazowych, uzyskując łącznie co najmniej 5000 jąder 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 Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe

Typ próbki	Kryterium czułości	Wynik czułości
Szpiczek kostny	>95%	98,9% (98,50–99,30%)

#### 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 ze szpiku kostnego analizowano co najmniej 200 komórek interfazowych, uzyskując łącznie co najmniej 5000 jąder 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 wzorec 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 Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe

Typ próbki	Wzorec sygnału	Wartość odcięcia
Szpiczek kostny	1A1G1R	2,34%
	2A1G2R	2,34%
	2A1G1R	6,26%

Laboratoria muszą zweryfikować wartości odcięcia w oparciu o własne dane<sup>8,9</sup>.

#### 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 4 próbki: 1 próbka ujemnego szpiku kostnego oraz 3 próbki nisko dodatniego szpiku kostnego.

W celu ustalenia precyzji między dniami i w ramach dnia próbki poddawano ocenom w okresie 5 następujących po sobie dni, a w celu ustalenia precyzji pomiędzy seriami 3 serie produktu poddawano ocenie poprzez wykonanie 4 powtórzeń dla tej samej próbki. Wyniki przedstawiono jako zgodność ogółem z przewidywaną klasą ujemną (dla próbek ujemnych).

Tabela 4. Odtwarzalność i precyzja dla produktu Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe

Zmienna	Typ próbki	Zgodność
Odtwarzalność w ramach dnia (między próbkami) oraz między dniami	Ujemne komórki szpiku kostnego	100%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego (1B1Z1C)	100%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego (2A1G1R)	100%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego (2A1G2R)	60%
Odtwarzalność między seriami	Ujemne komórki szpiku kostnego	100%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego (1B1Z1C)	100%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego (2A1G1R)	100%
	Nisko dodatnie komórki szpiku kostnego (2A1G2R)	58,3%

#### Skuteczność kliniczna

W celu zapewnienia, że produkt wykrywa rearanżacje, do których oceny został przeznaczony, skuteczność kliniczną produktu ustalono w ramach trzech badań prowadzonych retrospektywnie w ośrodkach zewnętrznych na reprezentatywnych próbkach docelowej populacji pacjentów, korzystając z materiału utrwalonego za pomocą roztworu metanol/kwas octowy w stosunku 3:1. Łączna wielkość próby dla tych trzech badań wyniosła 45 próbek, w tym 13 próbek dodatnich i 32 próbki ujemne. Ze wszystkich próbek usunięto dane umożliwiające identyfikację pacjentów i poddano je randomizacji, aby uniknąć obciążenia systematycznego analizy. Wyniki porównano ze znanym statusem próbki.

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 Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe

Zmienna	Wynik
Czułość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie dodatnich (True Positive Rate, TPR))	99,17%
Swoistość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie ujemnych (True Negative Rate, TNR))	99,65%
Odsetek wyników fałszywie dodatnich (False Positive Rate, FPR) = 1 – swoistość	0,35%

#### 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@cytoCELL.com](mailto:techsupport@cytoCELL.com)

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

## Piśmiennictwo

1. Ebert BL. Best Pract Res Clin Haematol. 2010;23(4):457-461.
2. Swerdlow, et al. (eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, France, 4th edition, IARC, 2017
3. Fang J, Barker B, Bolanos L, et al. Cell Rep. 2014;8(5):1328-1338.
4. Kanehira K, Ketterling RP, Van Dyke DL. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2010;14(3):314-316.
5. Boultonwood J, Pellagatti A, McKenzie ANJ, et al. Blood;116(26):5803-5811.
6. Joslin JM, Fernald AA, Tennant TR, et al. Blood;110(2):719-726.
7. Arsham, MS, Barch, MJ and Lawce HJ. (eds.) (2017) The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
8. 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.
9. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16-23.

## Glosariusz symboli

ISO 15223-1:2016 — „Wyroby medyczne — Symbole do stosowania na etykietach wyrobów medycznych, w ich oznakowaniu i w dostarczanych z nimi informacjach — Część 1: Wymagania ogólne” (© International Organization for Standardization)		
Symbol	Tytuł	Numery referencyjne
	pl: Wytwórca	5.1.1
	pl: Autoryzowany przedstawiciel we Wspólnocie 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: 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
<b>Symbole EDMA dla odczynników i składników IVD, wersja: październik 2009 r.</b>		
Symbol	Tytuł	Numery referencyjne
	pl: Zawartość (lub „zawiera”)	ND.

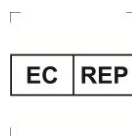
## Patenty i znaki towarowe

CytoCell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy CytoCell Limited.



**Cytocell Limited**  
Oxford Gene Technology  
418 Cambridge Science Park  
Milton Road  
CAMBRIDGE  
CB4 0PZ  
UNITED KINGDOM

Tel.: +44 (0)1223 294048  
Faks.: +44 (0)1223 294986  
E-mail: [probes@cytoCell.com](mailto:probes@cytoCell.com)  
Strona WWW: [www.oqt.com](http://www.oqt.com)



## Sysmex Europe GmbH

Bornbarch 1  
22848 Norderstedt  
GERMANY

Tel.: +49 40 527260

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

## Historia wersji dokumentu IFU

wer. 001.00 2021-10-01: Utworzenie dokumentu IFU dla nowego produktu