



A Sysmex Group Company



Brugsanvisning

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

FAST PML/RAR α (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe



KUN TIL ERHVERVSMÆSSIG BRUG



Yderligere information og andre sprog findes på ogt.com/IFU

Tilsigtet formål

CytoCell® FAST PML/RAR α (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe er en kvalitativ, ikke-automatiseret FISH-test (fluorescens *in situ*-hybridisering), der anvendes til at detektere kromosomale rearrangementer mellem 15q24-regionen på kromosom 15 og 17q21.1-q21.2-regionen på kromosom 17 ved brug af hæmatologisk-deriverede cellesuspensioner, der er fikseret i Carnoy's opløsning (3:1 methanol/eddikesyre), fra patienter med bekræftet eller mistænkt akut myeloid leukæmi (AML).

Indikation for brug

Denne enhed er designet som et supplement til andre kliniske og histopatologiske tests i anerkendte diagnostiske og kliniske plejeforløb, hvor viden om status af PML::RARA-translokation er vigtig for den kliniske håndtering.

Begrænsninger

Dette produkt er designet til at detektere rearrangementer med følsomhedsgrænser i den region, der dækkes af de røde og de grønne kloner i dette probesæt, som inkluderer PML- og RARA-regionerne. Følsomhedsgrænser uden for denne region, eller variante rearrangementer, som kun findes inde i denne region, kan muligvis ikke detekteres med denne enhed.

Denne enhed er ikke beregnet til: brug som det eneste diagnostiske værktøj, brug som supplerende diagnostisk værktøj, prænatal test, populationsbaseret screening, test i nærheden af patienter eller selvtestning.

Denne enhed er ikke valideret til prøvetyper, sygdomstyper eller formål ud over dem, der er angivet i det tilsigtede formål.

Den er beregnet til brug som supplement til andre diagnostiske laboratorietests, og en behandling bør ikke indledes udelukkende på grundlag af FISH-resultatet.

Rapportering og fortolkning af FISH-resultater skal udføres af tilstrækkeligt kvalificeret personale, være i overensstemmelse med professionel standardpraksis og bør tage hensyn til andre relevante testresultater, kliniske og diagnostiske informationer.

Denne enhed er udelukkende beregnet til brug af faguddannet laboratoriepersonale.

Hvis protokollen ikke overholdes, kan det have indflydelse på funktionsevnen og føre til falsk positive/negative resultater.

Testens principper

Fluorescens *in situ*-hybridisering (FISH) er en teknik, der gør det muligt at detektere DNA-sekvenser på metafasekromosomer eller interfasekerner i fikserede cytogenetiske prøver. Teknikken gør brug af DNA-prøver, som hybridiserer hele kromosomer eller enkelte unikke sekvenser, og er et stærkt supplement til cytogenetisk analyse med G-banding-teknik. Denne teknik kan nu anvendes som et essentielt investigativt værktøj i forbindelse med prænatal analyse, hæmatologiske analyser og kromosomanalyser af solide tumorer. Mål-DNA'et er, efter fiksering og denaturering, klar til hybridisering til en lignende denatureret, fluorescens-mærket DNA-probe med en komplementærsekvens. Efter hybridisering fjernes den ubundne og ikke-specifikt bundne DNA-probe, og DNA'et kontrastfarves med henblik på visualisering. Et fluorescensmikroskop gør det derefter muligt at visualisere den hybridiserede probe på mål-materialet.

Probe-information

PML-genet (*promyelocyt leukæmi*) befinder sig ved 15q24.1, og RARA-genet (*retinoic acid receptor-alpha*) befinder sig ved 17q21.2. Translokationen t(15;17)(q24;q21) forårsager PML::RARA-fusionsgenet og er det diagnostiske kendetegn på akut promyelocyt leukæmi (APL).

Denne FAST PML/RAR α FISH-probe gør hurtig detektion af rearrangementet mulig, da kun en times hybridisering er nødvendig.

PML::RARA-fusionsgenet dannes af t(15;17)(q24;q21)-translokationen, der findes i mere end 90 % af tilfældene med APL, en form for leukæmi, der omfatter 5-8 % af tilfældene med akut myeloid leukæmi (AML)^{1,2}. I en undergruppe af tilfælde kan der observeres variante RARA-translokationer. Kendte fusionspartnere omfatter NPM1 ved 5q35, NUMA1 ved 11q13, ZBTB16 (PLZF) ved 11q23, STAT5B ved 17q21, PRKAR1A ved 17q24, FIP1L1 ved 4q12 og BCOR ved Xp11^{3,4,5}.

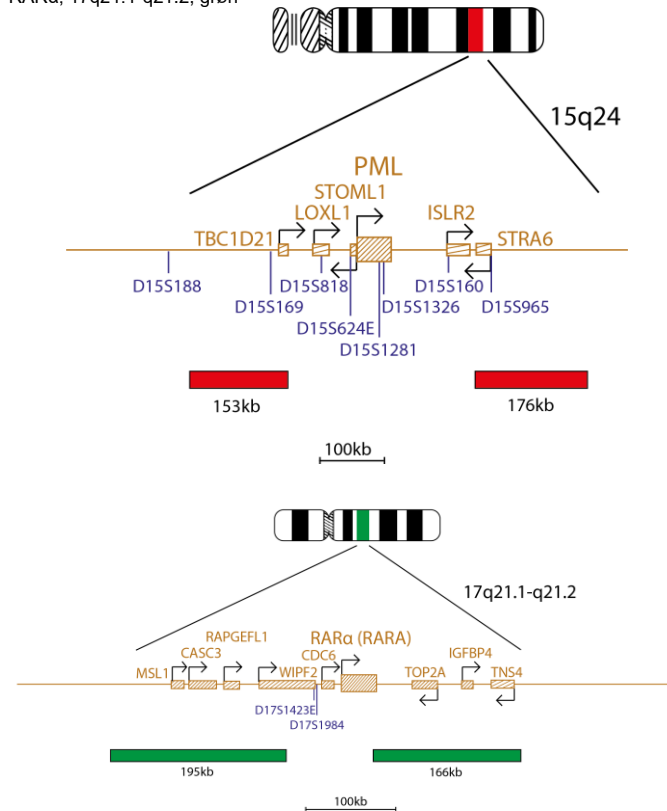
Både PML og RARA er blevet forbundet med normal hæmatopoiese. PML har vækstsuppressor og proapoptotisk aktivitet, hvorimod RARA er en transkriptionsfaktor, som medierer virkningen af retinsyre på et specifikt responselement⁶. PML::RARA-fusionsproteinet agerer som en forandret retinsyre-receptor med en evne til at transmittere onkogen signalering⁷.

Omgående behandling af APL-patienter er afgørende, da diagnosen omfatter fatale koagulationsforstyrrelser og livstruende hæmorrhagi. Før introduktionen af all-trans-retinsyre (ATRA) og arsentrioxid (ATO) til APL-behandlingsprotokoller havde sygdommen en dårlig prognose. Siden introduktionen af disse behandlinger er den samlede overlevelsesrate steget drastisk, og næsten 90 % af patienterne kureres. Patienter med variant RARA-translokationer viser variabel følsomhed over for behandlingen, og nogle patienter viser resistens over for behandlingerne^{3,5}. Det er derfor vigtigt at differentiere mellem APL-patienter med PML::RARA-fusion og de patienter, der har variante RARA-translokationer.

Probe-specifikation

PML, 15q24, rød

RAR α , 17q21.1-q21.2, grøn



PML-probe-blandingen, som er mærket med rødt, består af en 153 kb-probe, der er centromerisk til PML-genet, som omfatter markøren D15S169, og en 176 kb-probe, der er telomerisk til PML-genet, som omfatter markøren D15S965. RAR α (RARA)-probe-blandingen, som er mærket med grønt, består af en 195 kb-probe, som er centromerisk til RAR α (RARA)-genet, der dækker CASC3-genet, og en 166 kb-probe, som dækker både den telomeriske ende af RAR α (RARA)-genet og TOP2A-, IGFBP4- og TNS4-generne.

Medleveret materiale

Probe: 50 μ l pr. hætteglas (5 tests), 100 μ l pr. hætteglas (10 tests)

Proberne leveres i en færdigblandet hybridiserings-opløsning (<65 % formamid, <20 mg dextransulfat og < 10 % 20x saline-natriumcitrat (SSC)) og er klar til brug.

Kontrastfarvning: 150 μ l pr. hætteglas (15 tests)

Kontrastfarvningen er DAPI-antifade-opløsning ES (0,125 μ g/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) i glycerol-baseret monteringsmedie).

Advarsler og forsigtighedsregler

1. Til brug til *in vitro*-diagnostik. Må kun anvendes af faguddannet laboratoriepersonale.
2. Probe-blandinger indeholder formamid, som er teratogent: undgå hudkontakt og at indånde dampe. Håndter med omtanke, bær handsker og laboratoriekittel.
3. Håndter DAPI med omtanke, bær handsker og laboratoriekittel.
4. Må ikke anvendes, hvis hætteglasset/-glassene er beskadiget, eller deres indhold er kompromitteret på nogen måde.
5. Følg lokale bortskaffelsesregler for din lokalitet samt anbefalingerne i sikkerhedsdatabladet for at bestemme sikker bortskaffelse af dette produkt. Dette gælder også for indholdet af beskadigede testkits.
6. Bortskaf alle brugte reagenser og alle andre kontaminerede engangsmaterialer ved at følge procedurerne for infektiøst eller potentielt infektiøst affald. Det er det enkelte laboratoriums ansvar at håndtere fast og flydende affald i henhold til dets art og grad af farlighed og behandle og bortskaffe det (eller få det behandlet og bortskaffet) i overensstemmelse med gældende regler.
7. Brugerne skal kunne skelne mellem farverne rød, blå og grøn.
8. Hvis den beskrevne protokol og de beskrevne reagenser ikke overholdes, kan det have indflydelse på funktionsevnen og føre til falsk positive/negative resultater.
9. Proben må ikke fortyndes eller blandes med andre prøber.
10. Hvis der ikke anvendes 10 µl af proben under præ-denatureringen, som beskrevet i protokollen, kan det have indflydelse på funktionsevnen og føre til falsk positive/negative resultater.
11. Alle produkter bør valideres før brug.
12. Der bør udføres interne kontroller ved brug af upåvirkede cellepopulationer i testprøver.

Temperaturdefinitioner

- -20 °C/frossen/i fryseren: -25 °C til -15 °C
- 37 °C: +37 °C ± 1 °C
- 72 °C: +72 °C ± 1 °C
- 75 °C: +75 °C ± 1 °C
- Rumtemperatur (RT): +15 °C til +25 °C

Opbevaring og håndtering



Kittet skal opbevares mellem -25 °C og -15 °C i en fryser indtil den udløbsdag, der er anført på kittets etiket. Proben og hætteglas med kontrastfarve skal opbevares mørkt.



FISH-proben, DAPI Antifade ES-kontrastfarvning og Hybridisation Solution forbliver stabil under fryse-opvarmingscyklusser i forbindelse med normal brug (hvor en cyklus omfatter hætteglassets udtagning fra og genindsætning i fryseren) – 5 cyklusser for 50 µl (5 tests) hætteglas med FISH-probe, 10 cyklusser for 100 µl (10 tests) hætteglas med FISH-probe og 15 cyklusser for 150 µl (15 tests) hætteglas med kontrastvæske. Udsættelse for lys bør minimeres og undgås, hvor det er muligt. Opbevar komponenter i den medfølgende lysbestandige beholder. Komponent, som anvendes og opbevares under andre forhold end dem, der er angivet på mærkningen, fungerer muligvis ikke som forventet og kan påvirke analyseresultaterne negativt. Man skal bestræbe sig på at begrænse lyspåvirkning og temperaturforandringer.

Nødvendigt udstyr og materialer, som ikke medleveres

Der skal anvendes kalibreret udstyr:

1. Varmeplade (med en fast plade og nøjagtig temperaturkontrol op til 80 °C)
2. Kalibrerede mikropipetter med variabel volumen og spidser fra 1 µl til 200 µl
3. Vandbad med nøjagtig temperaturkontrol ved 37 °C og 72 °C
4. Mikrocentrifugerør (0,5 ml)
5. Fluorescensmikroskop (jf. anbefalingerne i kapitlet om fluorescensmikroskopi)
6. Fasekontrast-mikroskop
7. Rene plastik, keramiske eller varmeresistente Coplin-glas
8. Tænger
9. Kalibreret pH-Meter (eller pH-indikatorstrips, der kan måle pH 6,5-8,0)
10. Befugtningsbeholder
11. Immersionsolie til fluorescensmikroskoplinser
12. Bordcentrifuge
13. Mikroskop-objektglas
14. Dækglass på 24x24 mm
15. Timer
16. Inkubator på 37 °C
17. Gummiopløsning (til forsegling af objektglas)
18. Vortex-blander
19. Måleglas
20. Magnetomrører
21. Kalibreret termometer

Optionalt udstyr, der ikke medleveres

1. Cytogenetisk tørrekammer

Nødvendige reagenser, der ikke medleveres

1. 20x saltvand-natriumcitrat-(SSC)-opløsning
2. 100 % ethanol
3. Tween-20
4. 1M natriumhydroxid (NaOH)
5. 1M saltsyre (HCl)
6. Renset vand

Anbefalinger til fluorescensmikroskopi

Der bør anvendes en 100-Watt kviksløvlampe eller tilsvarende og olie-immersions-apochromat-objektiver, plan, 60/63 eller 100x for at opnå optimal visualisering. De fluorforer, der benyttes i denne probe, vil excitere og udsende lys ved følgende bølglængder:

Fluorforer	Excitation _{maks.} [nm]	Emission _{maks.} [nm]
Grøn	495	521
Rød	596	615

Sørg for, at mikroskopet har passende excitation- og emissionsfiltre, som dækker de ovenfor nævnte bølglængder. Benyt et tredobbelt båndpasfilter DAPI/grøn, spektrum/rød eller et dobbelt båndpasfilter grønt spektrum/rødt spektrum for at opnå optimal simultan visualisering af grønne og røde fluorforer.

Efterprøv før brug, at fluorescensmikroskopet virker korrekt. Benyt immersionsolie, der er beregnet til fluorescensmikroskopi og formuleret til lav automatisk fluorescens. Undgå at blande DAPI-antifade med mikroskopi-immersionsolie, da det vil sløre signalerne. Følg producentens anbefaling angående lampens levetid og filterens alder.

Prøveklargøring

Kittet er designet til brug på hæmatologisk-deriverede cellesuspensioner, der er fikseret i Carnoys opløsning (3:1 methanol/eddikesyre), som er klargjort i henhold til laboratoriets eller institutionens vejledninger. Præparer lufttørrede prøver på objektglas i henhold til cytogenetiske standardprocedurer. The AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* indeholder anbefalinger angående prøveindsamling, dyrkning, høst og præparering af objektglas⁸.

Klargøring af opløsning

Ethanolopløsninger

Fortynd 100 % ethanol med rensset vand ved at anvende følgende blandingsforhold, og bland omhyggeligt:

- 70 % ethanol – 7 dele 100 % ethanol til 3 dele rensset vand
- 85 % ethanol – 8,5 dele 100 % ethanol til 1,5 dele rensset vand

Opløsningerne kan opbevares i op til 6 måneder ved rumtemperatur i en lufttæt beholder.

2xSSC-opløsning

Fortynd 1 del 20xSSC-opløsning med 9 dele rensset vand, og bland omhyggeligt. Efterprøv pH-værdien, og juster til pH 7,0 ved at bruge NaOH eller HCl efter behov. Opløsningen kan opbevares i op til 4 uger ved rumtemperatur i en lufttæt beholder.

0.4xSSC-opløsning

Fortynd 1 del 20xSSC-opløsning med 49 dele rensset vand, og bland omhyggeligt. Efterprøv pH-værdien, og juster til pH 7,0 ved at bruge NaOH eller HCl efter behov. Opløsningen kan opbevares i op til 4 uger ved rumtemperatur i en lufttæt beholder.

2xSSC; 0,05 % Tween-20-opløsning

Fortynd 1 del 20xSSC-opløsning med 9 dele rensset vand. Tilsæt 5 µl Tween-20 pr. 10 ml, og bland omhyggeligt. Efterprøv pH-værdien, og juster til pH 7,0 ved at bruge NaOH eller HCl efter behov. Opløsningen kan opbevares i op til 4 uger ved rumtemperatur i en lufttæt beholder.

FAST FISH-protokol – En (1) times hybridisering

(Bemærk: Probens og kontrastfarvningens eksponering for laboratorielys skal hele tiden begrænses så meget som muligt).

Forberedelse af objektglas

1. Dryp celleprøven på et objektglas. Lad det tørre. (Valgfrit, hvis der anvendes et cytogenetisk tørrekabinet: Tørrekammeret bør anvendes ved cirka 25 °C og 50 % luftfugtighed for at få optimale celleprøver. Hvis der ikke er et cytogenetisk tørrekabinet til rådighed, kan der alternativt anvendes et stinkskab.)
2. Nedsænk objektglasset i 2xSSC i 2 minutter ved rumtemperatur (RT) uden omrystning.
3. Dehydrer i ethanol i stigende koncentrationer (70 %, 85 % og 100 %), hver i 2 minutter ved RT.
4. Lad det tørre.

Præ-denaturering

5. Tag proben ud af fryseren, og lad den opnå RT. Centrifuger kort rørene inden brug.
6. Sørg for, at probeopløsningen er ensartet blandet med en pipette.
7. Udtag 10 µl af proben pr. test, og transferer til et mikrocentrifugerør. Sæt hurtigt det resterende probemateriale tilbage i fryseren.
8. Sæt proben og prøveobjektglasset til opvarmning på en varmeplade ved 37 °C (+/- 1 °C) i 5 minutter.
9. Dryp 10 µl af probeblandingen på celleprøven, og dæk forsigtigt med et dækglass. Forsegl med gummiopløsning, og lad det tørre fuldstændigt.

Denaturering

10. Denaturer prøve og probe samtidigt ved at varme objektglasset på en varmeplade ved 75 °C (+/-1 °C) i 2 minutter.

Hybridisering

11. Anbring objektglasset i en fugtig, lystæt beholder ved 37 °C (+/-1 °C) i én (1) time.

Vask efter hybridisering

12. Tag DAPI ud af fryseren, og lad det opnå RT.
13. Fjern omhyggeligt dækglasset og alle spor af gummiopløsningen.

- Nedsæk objektglasset i 0,4xSSC (pH 7,0) ved 72 °C (+/- 1 °C) i 2 minutter uden omrystning.
- Lad objektglasset tørre, og nedsæk det i 2xSSC, 0,05 % Tween-20 ved RT (pH 7,0) i 30 sekunder uden omrystning.
- Lad objektglasset tørre, og tilsæt 10 µl DAPI-antifade på hver prøve.
- Dæk med et dækglas, fjern alle eventuelle bobler, og lad farven udvikle sig i mørke i 10 minutter.
- Undersøg med et fluorescensmikroskop (jf. anbefalingerne i kapitlet om fluorescensmikroskopi).

Standard FISH-protokol – hybridisering natten over

(Bemærk: Probens og kontrastfarvningens eksponering for laboratorielys skal hele tiden begrænses så meget som muligt).

Forberedelse af objektglas

- Dryp celleprøven på et objektglas. Lad det tørre. (Valgfrit, hvis der anvendes et cytotenetisk tørrekabinet: Tørrekammeret bør anvendes ved cirka 25 °C og 50 % luftfugtighed for at få optimale celleprøver. Hvis der ikke er et cytotenetisk tørrekabinet til rådighed, kan der alternativt anvendes et stinkskab.
- Nedsæk objektglasset i 2xSSC i 2 minutter ved rumtemperatur (RT) uden omrystning.
- Dehydrer i ethanol i stigende koncentrationer (70 %, 85 % og 100 %), hver i 2 minutter ved RT.
- Lad det tørre.

Præ-denaturering

- Tag proben ud af fryseren, og lad den opnå RT. Centrifuger kort tøre inden brug.
- Sørg for, at probeopløsningen er ensartet blandet med en pipette.
- Udtag 10 µl af proben pr. test, og transferer til et mikrocentrifugerør. Sæt hurtigt det resterende probemateriale tilbage i fryseren.
- Sæt proben og prøveobjektglasset til opvarmning på en varmeplade ved 37 °C (+/- 1 °C) i 5 minutter.
- Dryp 10 µl af probeblandingen på celleprøven, og dæk forsigtigt med et dækglas. Forsegel med gummiopløsning, og lad det tørre fuldstændigt.

Denaturering

- Denaturer prøve og probe samtidigt ved at varme objektglasset på en varmeplade ved 75 °C (+/-1 °C) i 2 minutter.

Hybridisering

- Anbring objektglasset i en fugtig, lystæt beholder ved 37 °C (+/-1 °C) natten over.

Vask efter hybridisering

- Tag DAPI ud af fryseren, og lad det opnå RT.
- Fjern omhyggeligt dækglasset og alle spor af gummiopløsningen.
- Nedsæk objektglasset i 0,4xSSC (pH 7,0) ved 72 °C (+/- 1 °C) i 2 minutter uden omrystning.
- Lad objektglasset tørre, og nedsæk det i 2xSSC, 0,05 % Tween-20 ved RT (pH 7,0) i 30 sekunder uden omrystning.
- Lad objektglasset tørre, og tilsæt 10 µl DAPI-antifade på hver prøve.
- Dæk med et dækglas, fjern alle eventuelle bobler, og lad farven udvikle sig i mørke i 10 minutter.
- Undersøg med et fluorescensmikroskop (jf. anbefalingerne i kapitlet om fluorescensmikroskopi).

Anbefalinger til proceduren

- Det kan nedsætte signalfluorescensen, hvis objektglassene får for meget varme eller er gamle.
- Hybridiseringsbetingelserne kan påvirkes negativt, hvis der bruges andre reagenser end dem, der anbefales eller leveres af Cytocell Ltd.
- Der skal anvendes et kalibreret termometer til at måle temperaturerne i opløsninger, vandbade og inkubatorer, da disse temperaturer er vigtige for at opnå bedst mulige resultater.
- Stringens ved vaskekonzentrationerne, pH og temperaturerne er vigtigt, da for lav stringens kan føre til ikke-specifik binding af proben, og for høj stringens kan føre til tab af signaler.
- Ikke-komplet denaturering kan føre til tab af signaler, og for høj denaturering kan også føre til ikke-specifik binding.
- Overhybridisering kan føre til yderligere eller uventede signaler.
- Brugere bør optimere protokollen til egne prøver, før testen bruges til diagnostiske formål.
- Suboptimale betingelser kan føre til ikke-specifik binding, som kan mistolkes som et probesignal.

Fortolkning af resultater

Vurdering af objektglaskvaliteten

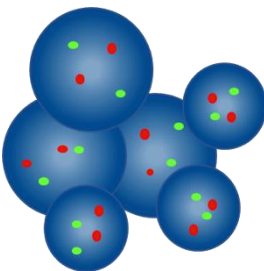
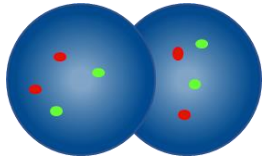
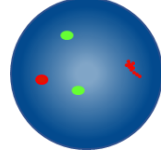
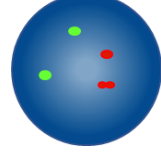
Objektglasset bør ikke analyseres, hvis:

- Signalerne er for svage til, at de enkelte filtre kan analyseres – for at fortsætte med en analyse skal signalerne være lyse, klare og nemme at vurdere
- Der er et højt antal af klumpende/overlappende celler, som slører analysen
- >50 % af cellerne ikke er hybridiseret
- der er for mange fluorescenspartikler mellem cellerne og/eller en fluorescerende dis, der forstyrrer signalerne – optimale objektglas har en enten mørk eller sort og ren baggrund
- cellekernernes omrids ikke kan skelnes og ikke er intakt

Analysevejledninger

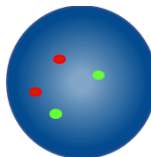
- Der skal altid være to brugere til at analysere og fortolke hver prøve. Enhver diskrepans skal afklares ved en vurdering fra en tredje bruger

- Hver bruger skal have passende faglige kvalifikationer i overensstemmelse med anerkendte nationale standarder
- Hver bruger bør uafhængigt bedømme 100 kerner for hver prøve. Den ene bruger starter analysen fra venstre side af objektglasset, og den anden bruger starter fra højre side
- Brugerne skal dokumentere deres resultater skriftligt hver for sig
- Der skal kun analyseres intakte kerner, ingen overlappende eller klumpende kerner, der er dækket af cytoplasmisk debris eller har en høj grad af autofluorescens
- Undgå områder med overskud af cytoplasmisk debris eller ikke-specifik hybridisering
- Signalintensiteten kan variere, selv for den enkelte kerne. I sådanne tilfælde anvendes enkeltfiltre og/eller justering af det fokale plan
- Ved suboptimale betingelser kan signalerne virke diffuse. Hvis to signaler med samme farve berører hinanden, eller afstanden mellem dem ikke er større end bredden på to signaler, eller hvis der er en svag streng, der forbinder de to signaler, tælles de som ét signal
- Når der analyseres tofarvede "break-apart"-prober, og der er et hul mellem de røde og grønne signaler, som ikke er større end 2 signalers bredde, tælles det som et ikke-rearrangeret/fusioneret signal
- Når der analyseres trefarvede "break-apart"-prober, og der er et hul mellem nogen af de 3 signaler (røde, grønne og blå signaler), som ikke er større end 2 signalers bredde, tælles det som et ikke-rearrangeret/fusioneret signal
- Hvis man er i tvivl, om en celle kan analyseres eller ej, så analyseres den ikke

Analysevejledninger	
	Tæl ikke - cellekernerne er for tæt på hinanden, til, at der kan bestemmes grænser
	Tæl ikke cellekerner, der overlapper hinanden – det er ikke alle områder af de to cellekerner, der er synlige
	Tæl som to røde signaler og to grønne signaler – et af de to røde signaler er diffus
	Tæl som to røde signaler og to grønne signaler - hullet i et rødt signal er mindre end to signalers bredde

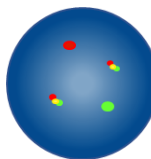
Forventede resultater

Forventet normalt signalmønster



I en normal celle forventes der to røde og to grønne signaler (2R2G).

Forventede abnorme signalmønstre



I en celle med t(15;17)(q24.1;q21)-translokation vil det forventede cellemønster være en rød, en grøn og to fusioner (1R1G2F).

Andre signalmønstre er mulige i aneuploide/ubalancerede prøver.

Kendte relevante interferencer/interfererende stoffer

Ingen kendte relevante interferencer/interfererende stoffer.

Kendt krydsreaktion

Ingen kendt krydsreaktion.

Indberetning af alvorlige hændelser

For patienter/brugere/tredjeparter i EU og lande med identisk reguleringsordning (forordning (EU) 2017/746 om *in vitro*-diagnostisk medicinsk udstyr) gælder det, at hvis der er opstået en alvorlig hændelse under brugen af denne enhed eller som følge af dens brug, skal det rapporteres til producenten og til den nationale kompetente myndighed.

Alvorlige hændelser i andre lande skal rapporteres til producenten og, hvis det er relevant, til den nationale kompetente myndighed.

Producentens vigilance-kontakt: vigilance@oqt.com

En liste med vigilance-kontaktsteder for nationale kompetente myndigheder i EU kan findes på:

https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

Særlige ydelseskaraktistika

Analytisk specificitet

Analytisk specificitet er defineret som procentdelen af signaler, som kun hybridiserer til det korrekte locus og ingen anden lokalitet. Der blev analyseret fire kromosomale loci i hver af tyve metafaseceller fra hver af de fem prøver, hvilket gav 400 data points. Lokationen for hver hybridiseret probe blev kortlagt, og antallet af FISH metafasekromosomsignaler, som hybridiseredes til det korrekte locus, blev registreret.

Den analytiske specificitet af hver probe i kittet blev beregnet som antallet af FISH-metafasekromosomsignaler, som hybridiseredes til det rette locus, delt med det samlede antal af hybridiserede FISH-metafasekromosomsignaler, og dette resultat blev multipliceret med 100, udtrykt som procentdel og givet med et konfidensinterval på 95 %.

Table 1. Analytisk specificitet for FAST PML/RAR α Translocation, Dual Fusion Probe

Mål	Antal hybridiserede metafasekromosomer	Antal korrekte hybridiserede loci	Analytisk specificitet	95 % konfidensinterval
15q24.1	200	200	100 %	98,12 %-100 %
17q21.1-17q21.2	200	200	100 %	98,12 %-100 %

Analytisk sensitivitet

Analytisk sensitivitet er procentdelen af de interfaseceller, der kan tælles med det forventede normale signalmønster. Der blev analyseret mindst 100 interfaseceller for hver af 25 fikserede cellesuspensioner fra knoglemarv og 25 fikserede cellesuspensioner fra perifert blod ved brug af den hurtige hybridiseringsmetode og 25 fikserede cellesuspensioner fra knoglemarv ved brug af hybridisering natten over. Dette resulterede i minimum 2.500 kerner i en score for perifere blodprøver og 5.000 kerner i en score for knoglemarvsprøver. Følsomhedsdata blev analyseret på grundlag af procentdelen af celler, der viste et normalt, forventet signalmønster, og blev udtrykt som en procentdel med et konfidensinterval på 95 %.

Table 2. Analytisk sensitivitet for FAST PML/RAR α (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe

Prøvetype	Sensitivitetskriterier	Sensitivitetsresultater
Hurtig hybridisering af knoglemarv	>95 %	98,80 % (97,96-99,63 %)
Hybridisering natten over af knoglemarv	>95 %	98,52 % (97,76-99,28 %)
Perifert blod – hurtig hybridisering	>95 %	99,31 % (98,66-100,00 %)

Karakterisering af normale cut-off-værdier

Normalt cut-off er defineret som procentdelen af celler, der udviser et falskt-positiv signalmønster, der fører til, at det hos en person ville blive betragtet som normalt og ikke svarende til en klinisk diagnose. Der blev analyseret mindst 100 interfaseceller for hver af 25 fikserede cellesuspensioner fra knoglemarv og 25 fikserede cellesuspensioner fra perifert blod ved brug af den hurtige hybridiseringsmetode og 25 fikserede cellesuspensioner fra knoglemarv ved brug af hybridisering natten over. Dette resulterede i minimum 2.500 kerner i en score for perifere blodprøver og 5.000 kerner i en score for knoglemarvsprøver.

Cut-off-værdien blev bestemt ved brug af β -invers-funktionen (BETAINV) i MS Excel. Den blev beregnet som procentdelen af interfaseceller, der viste et falskt-positiv signalmønster ved brug af den øvre grænse af et en-sidedt konfidensinterval på 95 % af den binominale fordeling i en normal patientprøve.

Table 3. Karakterisering af normale cut-off-værdier for FAST PML/RAR α (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe

Prøvetype	Cut-off-resultater
Knoglemarv – Hurtig hybridisering	2,71 %
Knoglemarv – Hybridisering natten over	3,44 %
Perifert blod – hurtig hybridisering	4,36 %

Laboratorier skal verificere cut-off-værdier ved at bruge deres egne data^{9,10}.

Præcision

Præcisionen af dette produkt er blevet målt i forhold til intra-dag-præcision (prøve-til-prøve) inter-dag-præcision (dag-til-dag) og enkelt-hospital inter-lot-præcision (lot-til-lot).

Der blev anvendt to prøver pr. hybridiseringsmetode til at bestemme præcisionen for dette produkt: en negativ knoglemarv og en lav-positiv marv. Den lave positive knoglemarvsprøve (2-4x produktets cut-off) blev dannet ved at forstærke den normale knoglemarvsprøve med en kendt positiv knoglemarvsprøve, hvilket blev brugt til provokation af produktets etablerede cut-off.

Prøverne blev evalueret over ti ikke-følgende dage for at etablere inter-dag- og intra-dag-præcision, og for at etablere lot-til-lot-præcision blev tre produktlots evalueret på tre replikater af de samme prøver. Resultaterne blev præsenteret som samlet overensstemmelse med den forudsagte negative klasse (for de negative prøver).

Table 4. Reproducerbarhed og præcision af FAST PML/RAR α (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe

Variabel	Prøvetype	Overensstemmelse
Intra-dag (prøve-til-prøve) og inter-dag (dag-til-dag) reproducerbarhed	Knoglemarv negativ	100 %
	Knoglemarv lav-positiv	100 %
Lot-til-lot-reproducerbarhed	Knoglemarv negativ	100 %
	Knoglemarv lav-positiv	100 %

Klinisk ydeevne

For at sikre, at produktet detekterer de påtænkte rearrangementer, blev den kliniske ydeevne fastslået ved en undersøgelse af repræsentative prøver fra den påtænkte population for produktet: hæmatologisk-derivert restmateriale fikseret med methanol/eddikesyre. Størrelsen var 136 prøver med en population på 43 positive prøver og 93 negative prøver. Resultaterne blev derefter sammenlignet med den kendte status for prøven identificeret ved en komparatormetode. Overensstemmelsen/diskordansen af resultater blev fundet at opfylde acceptkriterierne for denne undersøgelse.

Resultatet af disse tests blev analyseret for at se klinisk følsomhed, klinisk specificitet og værdier for falsk-positiv-raten (FPR) af positive signaler ved brug af en endimensional fremgangsmåde.

Table 5. Klinisk ydeevne for FAST PML/RAR α (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe

Variabel	Resultat
Klinisk sensitivitet (sand positiv rate, TPR [True Positive rate])	98,93 %
Klinisk specificitet (sand negativ rate, TNR [True Negative rate])	99,58 %
Falsk positiv rate (FPR, False Positive rate) = 1 – Specificitet	0,42 %

Sammenfatning af sikkerhed og ydeevne (SSP)

SSP'et skal gøres tilgængeligt for offentligheden via den europæiske database over medicinsk udstyr (Eudamed), hvor det knyttes til Basic UDI-DI'et. Eudamed-URL: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> Basic UDI-DI: 50558449LPH064JR

Hvis Eudamed ikke er fuldt funktionelt, skal SSP'et gøres tilgængeligt for offentligheden på anmodning ved at sende en e-mail til SSP@oqt.com.

Yderligere information

Kontakt Cytocell Technical Support Department, hvis du ønsker yderligere produktinformationer.

T: +44 (0)1223 294048















E: techsupport@cytocell.com

W: www.oqt.com

Referencer

1. Swerdlow, *et al* (eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
2. Campbell, *et al*. Biomed Research International. 2013;2013:1-5.
3. Creutzig, *et al*. Blood. 2012;120(16):3187-3205.
4. Zhang, *et al*. Blood Reviews. 2015;29(2):101-125.
5. Tomita, *et al*. International Journal of Haematology. 2013;97(6):717-725.
6. Grimwade, *et al*. Blood. 2000;96(4):1297-1308.
7. Lo-Coco, Hasa. Best practice & research. Clinical haematology. 2014;27(1):3-9.
8. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds). (2017) The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
9. Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, *et al*. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. Genet Med. 2011;13(7):667-675.
10. Wiktor AE, *et al*. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16–23.

Symbolordliste

EN ISO 15223-1:2021 – “Medicinsk udstyr – symboler, der skal bruges sammen med oplysninger fra producenten – del 1: Generelle krav” (© International Organization for Standardization)		
Symbol	Titel	Referencenummer/-numre
	da: Producent	5.1.1
	da: Autoriseret repræsentant i Det Europæiske Fællesskab/EU	5.1.2
	da: Sidste anvendelsesdato	5.1.4
	da: Batch-kode	5.1.5
	da: Katalognummer	5.1.6
	da: Holdes væk fra sollys	5.3.2
	da: Temperaturgrænse	5.3.7
	da: Se brugsanvisningen	5.4.3
 ogt.com/IFU	da: Se den elektroniske udgave af brugsanvisningen	5.4.3
	da: Forsigtig	5.4.4
	da: Medicinsk udstyr til <i>in vitro</i> -diagnostik	5.5.1
	da: Indeholder tilstrækkeligt til <n> tests	5.5.5
	da: Unik enhedsidentifikator	5.7.10
EDMA-symboler til IVD-reagenser og -komponenter, revision fra oktober 2009		
Symbol	Titel	Referencenummer/-numre
	da: Indhold (eller indeholder)	N/A

Patenter og varemærker

CytoCell er et registreret varemærke tilhørende CytoCell Limited.



CytoCell Limited
Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
STORBRITANNIEN

T: +44 (0)1223 294048
F: +44 (0)1223 294986
E: probes@cytoCell.com
W: www.ogt.com



Sysmex Europe SE
Bornbarch 1
22848 Norderstedt
TYSKLAND

T: +49 40 527260
W: www.sysmex-europe.com

IFU-versionshistorik

V001.00 2023-01-25: Ny IFU til forordning (EU) 2017/746