



A Sysmex Group Company



Bruksanvisning

REF: LPH 044-S / LPH 044

IGH/MAFB Translocation, Dual Fusion Probe



KUN TIL PROFESJONELL BRUK



www.cytocell.com

Du finner mer informasjon og andre språk på www.ogt.com

Begrensninger

Dette utstyret er designet for påvisning av rearrangementer med bruddpunkter i området mellom de røde og grønne klonene i dette probesettet, som inkluderer *IGH*- og *MAFB*-genene. Det er mulig at bruddpunkter utenfor dette området, eller rearrangementsvarianter som er fullstendig innenfor dette området, ikke blir påvist med dette produktet.

Testen er ikke ment for: bruk som frittstående diagnostest, eller til prenatal testing, populasjonsbasert screening, testing i pasientnære omgivelser eller selvtesting. Dette produktet er ment kun til profesjonell bruk i laboratorier; alle resultater skal tolkes av kvalifisert personell som tar andre relevante testresultater med i betraktningen.

Dette produktet er ikke godkjent for bruk til andre typer prøver eller sykdommer enn de som er spesifisert under Tiltent bruk.

Rapportering og tolking av FISH-resultater skal være i samsvar med standarder for profesjonell praksis og skal ta annen klinisk og diagnostisk informasjon med i betraktning. Dette settet er ment som et supplement til andre diagnostiske laboratorietester, og behandling skal ikke igangsettes kun på bakgrunn av FISH-resultatet.

Dersom protokollen ikke følges, kan det påvirke testen og føre til falske positive/negative resultater.

Dette settet er ikke validert til andre formål enn de som er angitt under Tiltent bruk.

Tiltent bruk

CytoCell IGH/MAFB Translocation, Dual Fusion Probe er en kvalitativ, ikke-automatisert FISH-test (fluorescens *in situ*-hybridisering) som brukes til påvisning av rearrangementer mellom 14q32.3-området på kromosom 14 og 20q12-området på kromosom 20 hos pasienter med bekreftede eller mistenkte hematopoietiske neoplasier av lymfoid opprinnelse [f.eks. multipelt myelom (MM)]. Det benyttes suspensjoner av fikserte, hematologisk deriverte celler i Carnoys oppløsning (3:1 metanol/eddiksyre).

Indikasjoner

Dette produktet er designet for bruk i tillegg til andre kliniske og histopatologiske tester som foretas under anerkjente diagnostiske og kliniske behandlingsprosesser, der kunnskap om eventuell *IGH::MAFB*-translokasjon vil være viktig for den kliniske behandlingen.

Prinsippene bak testen

Fluorescens *in situ*-hybridisering (FISH) er en teknikk som gjør det mulig å påvise DNA-sekvenser på kromosomer i metafase eller kjerner i interfase ved hjelp av fikserte cytogenetiske prøver. Teknikken innebærer bruk av DNA-prober som hybridiserer hele kromosomer eller unike sekvenser, og er effektiv som supplement til cytogenetisk G-båndsanalyse. Denne teknikken kan nå brukes som et viktig verktøy for analysering av prenatale og hematologiske kromosomer og kromosomer i solide tumorer. Etter fiksering og denaturering er mål-DNA tilgjengelig for sammenkobling med en fluorescens-merket DNA-probe som er denaturert på lignende måte og som har en komplementær sekvens. Etter hybridisering blir ubundet og ikke-spesifikt bundet DNA-probe fjernet, og DNA-et blir motfarget for visualisering. Fluorescensmikroskopi gjør det da mulig å visualisere den hybridiserte proben på målmaterialet.

Probeinformasjon

MAFB-genet (genet for *MAF bZIP-transkripsjonsfaktor B*) er lokalisert på 20q12, og *IGH* (*immunglobulin heavy-locus*) på 14q32.3

I cirka 50–60 % av tilfellene av multipelt myelom (MM) foreligger det translokasjoner som involverer *IGH* og én av flere partnere som omfatter *CCND1*, *NSD2* (*MMSET*) og *FGFR3*, *CCND3*, *MAF* eller *MAFB*¹.

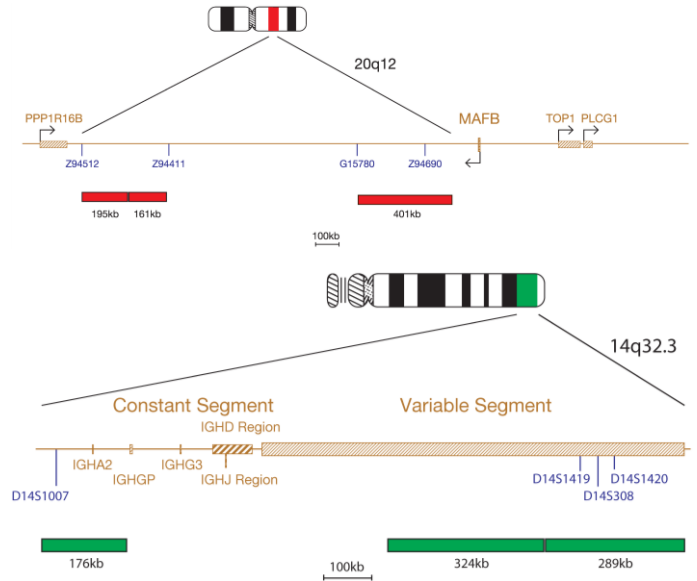
t(14;20)(q32.3;q12)-translokasjonen er en tilbakevendende translokasjon som ses hos cirka 2 % med MM^{2,3}.

Den resiproke translokasjon bringer en trunkert form av *IGH*- μ -forsterkeren (E μ , lokalisert mellom J-gensegmentene og det konstante området av *IGH*-genet) i nær kontakt med *MAFB*-genet⁴. Det er vist at den resulterende fusjonen og det oppregulerte transkripsjonsproduktet forårsaker dysregulering av syklin D2¹.

Det prognostiske utfallet av t(14;20)(q32.3;q12) antas å være det samme som ved t(14;16)(q32.3;q23)³.

Probespesifikasjon

MAFB, 20q12, rød
IGH, 14q32.3, grønn



IGH/MAFB-produktet består av grønnerkede prober som dekker konstant- og variabel-segmentene av *IGH*-genet, samt røderkede *MAFB*-prober (195 kb, 161 kb og 401 kb). *MAFB*-probene er lokalisert på hver side av bruddpunktområdet (mellom *MAFB* og *PPP1R16B*).

Medfølgende materialer

Probe: 50 μ l per ampulle (5 tester) eller 100 μ l per ampulle (10 tester)

Probene leveres forhåndsblandet i hybridiseringsløsning (formamid; deksulfat; natriumklorid/natriumsitrat-oppløsning (SSC)) og er klare til bruk.

Motfarging: 150 μ l per ampulle (15 tester)

Motfargen er DAPI antifade (ES: 0,125 μ g/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol)).

Advarsler og forsiktighetsregler

1. Til *in vitro* diagnostisk bruk. Kun til profesjonell bruk.
2. Bruk hansker ved håndtering av DNA-prober og DAPI-motfarge.
3. Probeblandingen inneholder formamid, som er teratogent; unngå hudkontakt og innånding av damp. Bruk hansker og labfrakk, og håndter produktet i en avtrekkskette. Dersom produktet kasseres, skal det skylles med store mengder vann etterpå.
4. DAPI er et potensielt karsinogen. Utvis forsiktighet ved håndtering; bruk hansker og labfrakk. Dersom produktet kasseres, skal det skylles med store mengder vann etterpå.
5. Alt farlig materiale skal kasseres i samsvar med din institusjons retningslinjer for kassering av farlig avfall.
6. Brukerne må være i stand til å skille mellom fargene rød, blå og grønn.
7. Dersom de angitte protokollene og reagensene ikke benyttes, kan det påvirke testen og føre til falske positive/negative resultater.
8. Proben skal ikke fortynnes eller blandes med andre prober.
9. Dersom det ikke brukes 10 μ l probe i protokollens pre-denatureringsfase, kan det påvirke ytelsen og føre til falske positive/negative resultater.

Oppbevaring og håndtering

-15°C Settet skal oppbevares mellom -25 °C og -15 °C i fryser og kan oppbevares inntil utløpsdatoen oppgitt på settets etikett. Ampullene med probe og motfarge må oppbevares mørkt.



Ved normal bruk er proben stabil gjennom fryse/tine-syklusene (der én syklus omfatter å ta proben ut av fryseren og sette den inn i igjen), og den er lysstabil i opptil 48 timer etter å ha vært utsatt for kontinuerlig belysning. Eksponering for lys og temperaturforandringer må begrenses i størst mulig grad.

DS142/CE-no v010.00/2023-02-21 (H025 v3 / H032 v4)

Side 1 av 4

Nødvendig utstyr og materialer som ikke medfølger

Det må benyttes kalibrert utstyr:

1. Varmerplate (med fast plate og nøyaktig temperaturkontroll opptil 80 °C)
2. Kalibrerte mikropipetter med forskjellige tupper og for forskjellige volum i området 1–200 µl
3. Vannbad med nøyaktig temperaturkontroll ved 37 °C og 72 °C
4. Mikrosentrifugerør (0,5 ml)
5. Fluorescensmikroskop (se avsnittet Anbefalinger for fluorescensmikroskopering)
6. Fasekontrastmikroskop
7. Rene Coplin-krukker av plast, keramikk eller varmeresistent glass
8. Pinsett
9. Kalibrert pH-måler (eller strips med pH-indikator som måler pH 6,5–8,0)
10. Fuktekammer
11. Immersjonsolje for fluorescensmikroskopering
12. Benksentrifuge
13. Objektglass for mikroskop
14. 24x24 mm dekkglass
15. Tidtaker
16. 37 °C-inkubator
17. Lim (gummioppløsning)
18. Vortex-blander
19. Graderte sylinderglass
20. Magnetrører
21. Kalibrert termometer

Valgfritt utstyr som ikke medfølger

1. Cytogetetisk tørkekammer

Nødvendige reagenser som ikke medfølger

1. 20x natriumklorid/natriumsitrat-oppløsning (SSC)
2. 100 % etanol
3. Tween-20
4. 1M natriumhydroksid (NaOH)
5. 1M saltsyre (HCl)
6. Renset vann

Anbefalinger for fluorescensmikroskopering

Bruk en 100-watts kvikksølvlampe eller tilsvarende og plansipte, apokromatiske objektglass 60/63x eller 100x for oljeimmersjon og optisk visualisering. Fluoroforene som benyttes i dette probesettet, eksiterer og emitterer ved følgende bølglengder:

Fluorofor	Eksitasjon _{max} [nm]	Emisjon _{max} [nm]
Grønt	495	521
Rødt	596	615

Sørg for at mikroskopet har egnede eksitasjons- og emisjonsfiltre som dekker bølglengdespekteret som er angitt ovenfor. Bruk et trippelt bandpassfilter (DAPI / grønt spektrum / rødt spektrum) eller et dobbelt bandpassfilter (grønt spektrum / rødt spektrum) for optimal simultan visualisering av de grønne og røde fluoroforene.

Sjekk at fluorescensmikroskopet fungerer som det skal før det brukes. Bruk immersjonsolje som er egnet for fluorescensmikroskopering, og som er formulert for lav autofluorescens. Unngå å blande DAPI antifade i immersjonsoljen. Det gjør signalene utydelige. Følg tilvirkerens anbefalinger når det gjelder lampens og filterenes levetid.

Prøvepreparering

Settet er designet for hematologisk deriverte cellesuspensjoner som er fiksert i Carnoys fikseringsløsning (3:1 metanol/eddiksyre), som er fremstilt i henhold til laboratoriets eller institusjonens retningslinjer. Preparer lufttørkede prøver på objektglass for mikroskop i henhold til standard cytogetetiske prosedyrer. AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* inneholder anbefalinger for prøvetaking, dyrking, høsting og prøvepreparering⁵.

Tilberedning av oppløsninger

Etanoloppløsninger

Fortynn 100 % etanol med rensset vann i følgende forhold, og bland godt:

- 70 % etanol – 7 deler 100 % etanol og 3 deler rensset vann
- 85 % etanol – 8,5 deler 100 % etanol og 1,5 deler rensset vann

Oppløsningene kan oppbevares i opptil 6 måneder ved romtemperatur i en lufttett beholder.

2xSSC-oppløsning

Fortynn 1 del 20xSSC-oppløsning med 9 deler rensset vann, og bland godt. Sjekk pH, og juster til pH 7,0 ved bruk av NaOH eller HCl etter behov. Oppløsningen kan oppbevares i opptil 4 uker ved romtemperatur i en lufttett beholder.

0,4xSSC-oppløsning

Fortynn 1 del 20xSSC-oppløsning med 49 deler rensset vann, og bland godt. Sjekk pH, og juster til pH 7,0 ved bruk av NaOH eller HCl etter behov. Oppløsningen kan oppbevares i opptil 4 uker ved romtemperatur i en lufttett beholder.

2xSSC, 0,05 % Tween-20-oppløsning

Fortynn 1 del 20xSSC-oppløsning med 9 deler rensset vann. Tilsett 5 µl Tween-20 per 10 ml, og bland godt. Sjekk pH, og juster til pH 7,0 ved bruk av NaOH eller HCl etter behov. Oppløsningen kan oppbevares i opptil 4 uker ved romtemperatur i en lufttett beholder.

FISH-protokoll

(Merk: Pass alltid på at proben og motfargen eksponeres minst mulig for laboratoriebelysning).

Preparering av objektglass

1. Legg celleprøven på et mikroskop-objektglass av glass. La tørke. (**Valgfritt, dersom det benyttes et cytogetetisk tørkekammer:** Prøvene skal legges på objektglassene i et cytogetetisk tørkekammer. For optimal identifisering av celler i prøven skal kammeret holde omtrent 25 °C og 50 % fuktighet. Dersom et cytogetetisk tørkekammer ikke er tilgjengelig, kan en avtrekkshette være et alternativ).
2. Legg objektglasset i 2xSSC i 2 minutter ved romtemperatur (RT) uten omrøring.
3. Dehydrer i flere etanoloppløsninger (70 %, 85 % og 100 %) ved romtemperatur, 2 minutter i hver oppløsning.
4. La tørke.

Pre-denaturering

5. Ta proben ut av fryseren, og la den nå romtemperatur. Sentrifuger rørene lett før bruk.
6. Bland probeløsningen med en pipette så den blir homogen.
7. Ta ut 10 µl probe per test, og overfør volumet til et mikrosentrifugerør. Sett straks resterende probe tilbake i fryseren.
8. Forhåndsvarm proben og prøvepreparatet til 37 °C (+/- 1 °C) på en varmerplate i 5 minutter.
9. Legg 10 µl probeblanding på celleprøven, og legg et dekkglass forsiktig på. Forsegl med lim (gummioppløsning), og la limet tørke helt.

Denaturering

10. Denaturer prøven og proben samtidig ved å varme objektglasset på en varmerplate ved 75 °C (+/- 1 °C) i 2 minutter.

Hybridisering

11. Oppbevar objektglasset i en fuktig, lystett beholder ved 37 °C (+/- 1 °C) over natten.

Vasking etter hybridisering

12. Ta DAPI ut fra fryseren, og la den nå romtemperatur.
13. Fjern forsiktig dekkglasset og alle limrester.
14. Legg objektglasset i 0,4xSSC (pH 7,0) ved 72 °C (+/- 1 °C) i 2 minutter uten omrøring.
15. La oppløsningen renne av, og legg objektglasset i 2xSSC, 0,05 % Tween-20 ved romtemperatur (pH 7,0) i 30 sekunder uten omrøring.
16. La oppløsningen renne av, og legg 10 µl DAPI antifade på hver prøve.
17. Legg på et dekkglass, fjern eventuelle bobler og la fargen utvikles i mørke i 10 minutter.
18. Se på prøven i et fluorescensmikroskop (se **Anbefalinger for fluorescensmikroskopering**).

Stabiliteten til ferdigpreparerte prøver

Ferdige prøvepreparater kan analyseres i opptil 1 måned dersom de oppbevares i mørke ved romtemperatur eller lavere.

Prosedyreanbefalinger

1. Uttørkede eller gamle prøver kan gi redusert signalfluorescens
2. Hybridiseringsbetingelsene kan bli negativt påvirket dersom det brukes andre reagenser enn de som følger med eller anbefales av Cytocell Ltd
3. Bruk et kalibrert termometer til måling av temperaturen i oppløsninger, vannbad og inkubatorer siden disse temperaturene er viktige for optimal ytelse.
4. Konsentrasjoner, pH-verdier og temperaturer er viktige siden lav stringens kan føre til uspesifikk binding av proben og for høy stringens kan føre til manglende signal
5. Ufullstendig denaturering kan føre til manglende signal og overdenaturering kan også føre til uspesifikk binding
6. Overhybridisering kan føre til ekstrasingler eller uventede signaler
7. Brukerne bør optimalisere protokollen for egne prøver før de bruker testen til diagnostiske formål
8. Suboptimale forhold kan føre til uspesifikk binding som kan bli feiltolket som et probesignal

Tolking av resultater

Vurdering av prøvepreparatets kvalitet

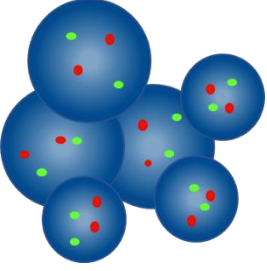
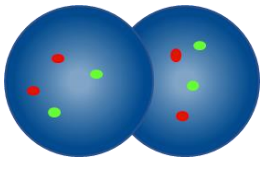
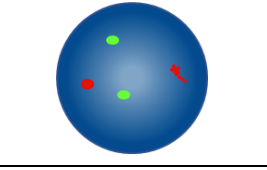
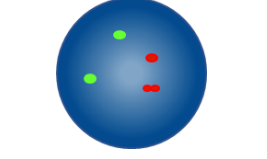
Prøvepreparatet skal ikke analyseres dersom:

- Signalene er for svake for analysering i enkeltfiltre. For å kunne brukes i analyse skal signalene være klare, distinkte og enkle å evaluere
- Det er mange sammenklumpede/overlappende celler som forstyrrer analysen
- >50 % av cellene ikke er hybridisert
- Det er et overskudd av fluorescerende partikler mellom celler og/eller en fluorescerende tåke som interfererer med signalene – på optimale prøvepreparater er bakgrunnen jevn og mørk eller svart
- Grensen til cellekjernen ikke kan skjønnes eller ikke er intakt

Retningslinjer for analyse

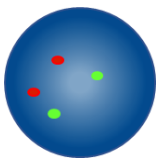
- To analytikere skal analysere og tolke hver prøve. Ved eventuell uoverensstemmelse skal det foretas en vurdering av en tredje analytiker
- Alle analytikere skal være tilstrekkelig kvalifisert i henhold til anerkjente nasjonale standarder
- Hver analytiker skal uavhengig av hverandre gi score til 100 kjerner i hver prøve. Første analytiker bør starte analysen fra venstre side av prøven og andre analytiker fra høyre side
- Begge analytikere skal dokumentere resultatene sine i separate dokumenter

- Analyser bare intakte kjerner og ikke-overlappende eller sammenklumpede kjerner eller kjerner som er dekket av cytoplasmarester eller som har høy grad av autofluorescens
- Unngå områder med mye cytoplasmarester eller uspesifikk hybridisering
- Signalintensiteten kan variere, også innenfor en enkelt kerne. I slike tilfeller skal det brukes enkeltfiltre og/eller det fokale planet skal justeres
- Ved suboptimale forhold kan signalene bli diffuse. Dersom to signaler med samme farge er i kontakt med hverandre, eller avstanden mellom dem ikke er større enn to signalbredder, eller når en svak tråd forbinder de to signalene, skal de regnes som ett signal
- Ved tvil om hvorvidt en celle er analyserbar eller ikke, skal den ikke analyseres

Retningslinjer for analyse	
	Skal ikke telles – kjernene er for nære hverandre til at grensene kan bestemmes
	Overlappende kjerner skal ikke telles – ikke alle områder på de to kjernene er synlige
	Telles som to røde signaler og to grønne signaler – ett av de to røde signalene er diffuse
	Telles som to røde signaler og to grønne signaler – mellomrommet i ett rødt signal er mindre enn to signalbredder

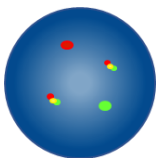
Forventede resultater

Forventet mønster av normale signaler



I en normal celle forventes to røde og to grønne signaler (2R, 2G).

Forventet mønster av unormale signaler



I en celle med en t(14;20)(q32.3;q12)-translokasjon er det forventede signalmønsteret ett rødt, ett grønt og to røde/grønne fusjonssignaler (1R, 1G, 2F).

Andre signalmønstre er mulige i aneuploide/ubalanserte celleprøver.

Kjente kryssreaksjoner

Den grønne IGH-proben kan vise krysshybridisering til 15q11.2 og 16p11.2.

Melding av bivirkninger

Dersom du mener at dette utstyret har en feilfunksjon eller svekket ytelse som kan ha bidratt til en bivirkning (f.eks. forsinket eller feil diagnose, forsinket eller uhensiktsmessig behandling), må dette rapporteres umiddelbart til tilvirkeren (e-post: vigilance@ogt.com).

Bivirkningen skal om mulig også rapporteres til de ansvarlige myndigheter i ditt land. Det finnes en liste over kontaktpunkter på: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Spesifikke analysekarakteristika

Laboratorier må verifisere cut-off-verdier ved bruk av egne data^{6,7}.

Analytisk spesifisitet

Analytisk spesifisitet er prosentandelen signaler som viser hybridisering til korrekt locus og ingen annen lokasjon. Den analytiske spesifisiteten ble bestemt ved analysing av totalt 200 mål-loci. Den analytiske spesifisiteten ble beregnet som antall FISH-signaler som hybridiserte til korrekt locus, dividert med totalt antall hybridiserte FISH-signaler.

Tabell 1. Analytisk spesifisitet av IGH/MAFB Translocation, Dual Fusion Probe

Probe	Mål-locus	Antall signaler hybridisert til korrekt locus	Totalt antall hybridiserte signaler	Spesifisitet (%)
Rød MAFB	20q12	200	200	100
Grønn IGH	14q32.33	200	200	100

Analytisk sensitivitet

Analytisk sensitivitet er prosentandelen interfase-celler som kan gis en score, og som har det forventede mønsteret av normale signaler. Analytisk sensitivitet ble bestemt ved analysing av interfase-celler på tvers av forskjellige normale prøver. Sensitiviteten ble beregnet som prosentandelen celler som kan gis en score, og som har det forventede signalmønsteret (med 95 % konfidensintervall).

Tabell 2. Analytisk sensitivitet av IGH/MAFB Translocation, Dual Fusion Probe

Antall celler med forventede signalmønstre	Antall celler med signaler som kan gis en score	Sensitivitet (%)	95 % konfidensintervall
467	500	93,4	2,1

Presisjon og reproduserbarhet

Presisjon er et mål på den naturlige variasjonen for en test som blir gjentatt flere ganger under de samme forholdene. Presisjonen ble vurdert ved å analysere flere kjøringar med prøver av samme lot-nummer, testet på samme prøve, under de samme forholdene og på samme dato.

Reproduserbarhet er et mål på variabiliteten til en test og er bestemt med hensyn til variabilitet fra prøve-til-prøve, dag-til-dag og batch-til-batch. Reproduserbarhet dag-til-dag ble bestemt ved analysing av de samme prøvene på tre forskjellige dager. Reproduserbarhet batch-til-batch ble bestemt ved analysing av de samme prøvene på én dag, men ved bruk av probe med tre forskjellige lot-numre. Reproduserbarhet prøve-til-prøve ble bestemt ved analysing av tre replikater av en prøve på én dag. For hver prøve ble signalmønstre for 100 interfase-celler registrert, og prosentandelen celler med forventet signalmønster ble beregnet.

Reproduserbarhet og presisjon ble beregnet som standardavviket (STDEV) mellom replikater for hver variabel, og totalt gjennomsnittlig STDEV.

Tabell 3. Reproduserbarhet og presisjon av IGH/MAFB Translocation, Dual Fusion Probe

Variabel	Standardavvik (STDEV)
Presisjon	0,00
Prøve-til-prøve	0,00
Dag-til-dag	0,00
Batch-til-batch	0,00
Totalt avvik	0,00

Ytterligere informasjon

Ytterligere produktinformasjon kan fås ved å kontakte CytoCell Technical Support Department.

Tlf.: +44 (0)1223 294048




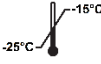


E-post: techsupport@cytoCELL.com

Nettside: www.ogt.com

Referanser

1. Fonseca *et al.*, Cancer Research 2004;64:1546-1558
2. Fonseca *et al.*, Leukemia 2009;23(12):2210-2221
3. Sawyer, Cancer Genetics 2011;204(1):3-12
4. Boersma-Vreugdenhil *et al.*, Br J Haematol 2004;126:355-63
5. Arsham, MS., Barch, M.J. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
6. 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.
7. 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.

Forklaring av symboler

REF	no: Katalognummer
IVD	no: <i>In vitro</i> -diagnostisk medisinsk utstyr
LOT	no: Batchkode
	no: Les bruksanvisningen
	no: Tilvirker
	no: Brukes innen-dato
	no: Temperaturgrense
	no: Oppbevares beskyttet mot sollys
	no: Innholdet rekker til <n> tester
CONT	no: Innhold

Patenter og varemerker

CytoCell er et registrert varemerke for CytoCell Ltd.



CytoCell Ltd.
Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, Storbritannia
Tlf.: +44(0)1223 294048
Faks: +44(0)1223 294986
E-post: probes@cytoCell.com
Nettside: www.ogt.com