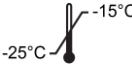


- 5. Kassera produkten på ett säkert sätt genom att följa lokala bestämmelser samt rekommendationerna i säkerhetsdatabladet. Detta gäller även för skadat testkitsinnehåll.
- 6. Kassera använd reagens och annat kontaminerat material för engångsbruk på samma sätt som vid kassering av smittfarligt eller potentiellt smittfarligt avfall. Det är laboratoriets ansvar att hantera fast och flytande avfall i enlighet med dess typ och hur pass farligt det är. Avfallet ska hanteras och kasseras (av personal eller via extern hjälp) i enlighet med tillämpliga bestämmelser.
- 7. Alla användare måste kunna skilja mellan färgerna rött, blått och grönt.
- 8. Underlåtenhet att följa det föreskrivna protokollet och reagenserna kan påverka prestandan och leda till falskt positiva/negativa resultat.
- 9. Sonden får inte spädas eller blandas med andra sonder.
- 10. Underlåtenhet att använda 10 µl sond i protokollsteget före denaturering kan påverka prestandan och leda till falskt positiva/negativa resultat.
- 11. Alla produkter måste valideras före användning.
- 12. Interna kontroller med opåverkade cellpopulationer i testproverna ska utföras.

Temperatursdefinitioner

- -20 °C/frys/i frys: -25 °C ± -15 °C
- 37° C: +37 °C ± 1 °C
- 72° C: +72 °C ± 1 °C
- 75° C: +75 °C ± 1 °C
- Rumstemperatur (RT): +15 °C ± +25 °C

Förvaring och hantering

 Kitet ska förvaras mellan -25 °C och -15 °C i fryn fram till det utgångsdatum som anges på etiketten. Sonden och flaskorna med kontrastfärg måste förvaras mörkt.



FISH-sonden, DAPI Antifade ES-kontrastfärgen och hybridiseringslösningen är stabila under frysnings- och upptiningscykler vid normal användning (när en cykel utgörs av att flaskan tas ut och sätts tillbaka i frysen) – fem cykler för FISH-sondflaskor på 50 µl (5 tester), tio cykler för FISH-sondflaskor på 100 µl (10 tester) och 15 cykler för kontrastfärgsflaskor på 150 µl (15 tester). Minimera risken för ljusexponering och undvik om möjligt. Förvara komponenterna i den medföljande ljusskyddade behållaren. Om komponenterna hanteras eller förvaras i förhållanden utöver de som anges på etiketten är det möjligt att de inte fungerar som de ska, vilket kan påverka analysresultaten. Se till att undvika exponering av ljus och temperaturförändringar.

Utrustning och material som behövs men inte medföljer

- Utrustningen som används måste vara kalibrerad:
- 1. Värmeplatta (med en fast platta och exakt temperaturreglering upp till 80 °C)
 - 2. Kalibrerade inställningsbara mikropipetter och spetsar med volym mellan 1 – 200 µl
 - 3. Vattenbad med exakt temperaturreglering vid 37 °C och 72 °C
 - 4. Mikrocentrifugrör (0,5 ml)
 - 5. Fluorescensmikroskop (se avsnittet om rekommendationer för fluorescensmikroskop)
 - 6. Faskontrastmikroskop
 - 7. Rena kyvetter av plast, keramiskt material eller värmeståligt glas
 - 8. Tång
 - 9. Kalibrerad pH-mätare (eller indikatorremsor som mäter pH 6,5 – 8,0)
 - 10. Behållare med befuktning
 - 11. Immersionsolja för linser till fluorescensmikroskop
 - 12. Bänkcentrifug
 - 13. Objektglas
 - 14. Täckglas 24 x 24 mm
 - 15. Timer
 - 16. 37 °C inkubator
 - 17. Gummilösning
 - 18. Vortexblandare
 - 19. Mätglas
 - 20. Magnetomrörare
 - 21. Kalibrerad termometer

Valfri utrustning som inte medföljer

- 1. Cytogenetisk torkkammare

Reagenser som behövs men inte medföljer

- 1. 20 x natriumklorid-natriumcitratlösning (SSC)
- 2. 100 % etanol
- 3. Tween-20
- 4. 1 M natriumhydroxid (NaOH)
- 5. 1 M saltsyra (HCl)
- 6. Renat vatten

Rekommendation för fluorescensmikroskop

Använd en 100 W kvicksilverlampa eller motsvarande och plana akromatiska objektiv med oljeimmersion 60/63 x eller 100 x för optimal visualisering. De fluoroforeser som används i denna sonduppsättning exciteras och emitteras vid följande våglängder:

Fluoroforeser	Excitation _{max} [nm]	Emission _{max} [nm]
Grön	495	521
Röd	596	615

Se till att mikroskopet är försett med rätt excitations- och emissionsfilter för de ovan angivna våglängderna. Använd ett tredubbel bandpassfilter för DAPI/grönt

spektrum/rött spektrum eller ett dubbel bandpassfilter för grönt/rött spektrum för optimal samtidig visualisering av de gröna och röda fluoroforeserna.

Kontrollera fluorescensmikroskopet före användning för att säkerställa att det fungerar ordentligt. Använd immersionsolja som lämpar sig för fluorescensmikroskopi och har en sammansättning med låg autofluorescens. Undvik att blanda DAPI antifade med immersionsolja för mikroskopet eftersom detta gör signalerna otydliga. Följ tillverkarnas rekommendationer beträffande lampans livslängd och filtrens ålder.

Provberedning

Kitet är utformat för att användas på hematologiskt erhållna cellsuspensioner fixerade i Carnoy's lösning (3:1 metanol/ättiksyra) från patienter med fastställd eller misstänkt akut myeloisk leukemi (AML) som är beredda enligt laboratoriets eller institutionens riktlinjer. Bered lufttorkade prover på objektglas i enlighet med cytogenetiska standardförfaranden. AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* innehåller rekommendationer för provtagning, odling, insamling och montering på objektglas⁶.

Lösningsberedning

Etanollösningar

Späd 100-procentig etanol med renat vatten i följande förhållanden och blanda noggrant:

- 70-procentig etanol – 7 delar 100-procentig etanol med 3 delar renat vatten
 - 85-procentig etanol – 8,5 delar 100-procentig etanol med 1,5 delar renat vatten
- Förvara lösningarna upp till 6 månader i rumstemperatur i en lufttät behållare.

2 x SSC-lösning

Späd 1 del 20 x SSC-lösning med 9 delar renat vatten och blanda noggrant. Kontrollera pH-värdet och justera till pH 7,0 med den mängd NaOH eller HCl som krävs. Förvara lösningen upp till fyra veckor i rumstemperatur i en lufttät behållare.

0,4 x SSC-lösning

Späd 1 del 20 x SSC-lösning med 49 delar renat vatten och blanda noggrant. Kontrollera pH-värdet och justera till pH 7,0 med den mängd NaOH eller HCl som krävs. Förvara lösningen upp till fyra veckor i rumstemperatur i en lufttät behållare.

2 x SSC, 0,05 % Tween-20-lösning

Späd 1 del 20 x SSC-lösning med 9 delar renat vatten. Tillsätt 5 µl Tween-20 per 10 ml och blanda väl. Kontrollera pH-värdet och justera till pH 7,0 med den mängd NaOH eller HCl som krävs. Förvara lösningen upp till fyra veckor i rumstemperatur i en lufttät behållare.

FISH-protokoll

(Obs: Se till att sonden och kontrastfärgen aldrig utsätts för mer än begränsat med laboratoriebelysning.)

Montering på objektglas

- 1. Applicera cellprovet på ett objektglas. Låt torka. (Vid användning av cytogenetisk torkkammare: Kammaren ska användas vid cirka 25 °C och 50 % luftfuktighet för optimal applicering av cellprovet. Om en cytogenetisk torkkammare inte finns att tillgå är ett dragskåp ett alternativ.)
- 2. Lägg objektglaset i 2 x SSC i två minuter i rumstemperatur (RT) utan att röra det.
- 3. Dehydrera i tre etanolbad efter varandra (70 %, 85 % och 100 %), vart och ett under 2 minuter i rumstemperatur.
- 4. Låt torka.

Före denaturering

- 5. Ta ut sonden ur frysen och låt den värmas upp till rumstemperatur. Centrifugera rören lätt före användning.
- 6. Säkerställ att sondlösningen är väl blandad med en pipett.
- 7. Avlägsna 10 µl av sonden per test och överför till ett mikrocentrifugrör. Lägg snabbt tillbaka återstående sond i frysen.
- 8. Låt sonden och objektglaset förvärmas på en värmeplatta vid 37 °C (+/- 1 °C) i fem minuter.
- 9. Applicera 10 µl av sondblandningen på cellprovet och lägg försiktigt på ett täckglas. Försegla med gummilösning och låt torka helt.

Denaturering

- 10. Denaturera provet och sonden samtidigt genom att värma objektglaset på en värmeplatta vid 75 °C (+/- 1 °C) i 2 minuter.

Hybridisering

- 11. Lägg objektglaset över natten i en fuktig, ljusstät behållare vid 37 °C (+/- 1 °C).

Tvättar efter hybridisering

- 12. Ta ut DAPI ur frysen och låt den värmas upp till rumstemperatur.
- 13. Ta bort täckglaset och alla spår av lim noggrant.
- 14. Låt objektglaset ligga i 0,4 x SSC (pH 7,0) vid 72 °C (+/- 1 °C) i 2 minuter utan omrörning.
- 15. Låt objektglaset rinna av och låt det ligga stilla i 2 x SSC, 0,05 % Tween-20 vid RT (pH 7,0) under 30 sekunder.
- 16. Låt objektglaset rinna av och applicera 10 µl DAPI antifade på varje prov.
- 17. Lägg ett täckglas över, avlägsna eventuella bubblor och låt färgen utvecklas i mörker i 10 minuter.
- 18. Granska i ett fluorescensmikroskop (se **Rekommendationer för fluorescensmikroskop**).

Rekommendationer för förfarande

- 1. Objektglas som har ugnsfixerats eller åldrats ger en svagare fluorescenssignal.

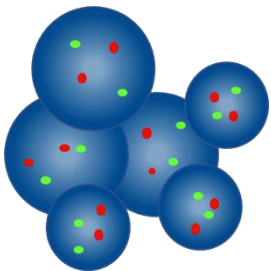
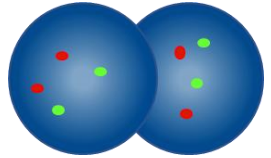
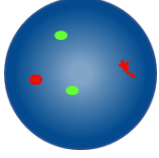
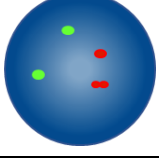
- Hybridiseringen kan påverkas negativt vid användning av andra reagenser än de som tillhandahålls eller rekommenderas av Cytocell Ltd.
- Använd en kalibrerad termometer för att mäta temperaturen på lösningar, vattenbad och inkubatorer eftersom dessa temperaturer är avgörande för att produkten ska fungera optimalt.
- Vätskekoncentration, pH-värden och temperaturer är viktiga eftersom för låg noggrannhet kan leda till icke-specifik bindning av sonden, och för hög noggrannhet kan innebära att signalerna uteblir.
- Ofullständig denaturering kan ge utebliven signal, och överdenaturering kan även resultera i icke-specifik bindning.
- Överhybridisering kan ge extra eller oväntade signaler.
- Användaren bör optimera protokollet för sina egna prover innan testet används för diagnosändamål.
- Bristfälliga förhållanden kan resultera i icke-specifik bindning som kan misstolkas som en sondersignal.

Tolkning av resultaten
Bedömning av objektglasets kvalitet

- Objektglasets ska inte analyseras i följande fall:
- Signalerna är för svaga för analys i enstaka filter – för att fortsätta analysen ska signalerna framträda klart och tydligt och vara lätta att utvärdera.
 - Det finns väldigt många hopklumpade/överlappande celler som försvårar analysen.
 - Om > 50 % av cellerna är inte hybridiserade.
 - Det finns en stor mängd fluorescerande partiklar mellan cellerna och/eller ett fluorescerande dis som stör signalerna – optimalt ska bakgrunden framstå mörk eller svart och ren.
 - Cellkärnornas gränser går inte att urskilja och är inte intakta.

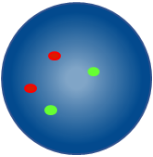
Riktlinjer för analysen

- Två analytiker bör analysera och tolka alla prover. Eventuella avvikelser bör avgöras av en tredje analytiker.
- Alla analytiker ska ha lämpliga kvalifikationer enligt godkänd nationell standard.
- Varje analytiker ska oberoende av de andra bedöma 100 kärnor i varje prov. Den första analytikern ska börja från vänster på objektglasets och den andra analytikern från höger.
- Varje analytiker ska dokumentera sina resultat på separata papper.
- Analysera endast hela kärnor, inte kärnor som är överlappande, hopklumpade eller täckta av cytoplasmiskt skräp eller har hög grad av autofluorescens.
- Undvik områden med stora mängder cytoplasmiskt skräp eller icke-specifik hybridisering.
- Signalens intensitet kan variera även med en enskild kärna. Använd i så fall enkla filter och/eller justera fokalplanet.
- Vid bristfälliga förhållanden kan signalerna vara otydliga. Om två signaler med samma färg vidrör varandra, om avståndet mellan dem är högst två signalbredder eller om en tunn sträng förenar de båda signalerna ska de betraktas som en signal.
- Om det finns tvivel om huruvida en cell går att analysera eller inte, låt bli att analysera den.

Riktlinjer för analysen	
	Räkna inte – kärnorna ligger för nära varandra för att avgränsningarna ska kunna bedömas.
	Räkna inte överlappande kärnor – alla områden i båda kärnor kan inte ses.
	Räkna som två röda signaler och två gröna signaler – en av de två röda signalerna är diffus.
	Räkna som två röda signaler och två gröna signaler – mellanrummet i en av de röda signalerna är mindre än två signalbredder.

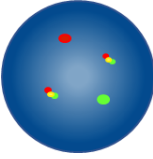
Förväntade resultat

Förväntat normalt signalmönster



I en normal cell förväntas två röda och två gröna signaler (2R2G).

Förväntat onormalt signalmönster



I celler med en t(8;21)(q21.3;q22.12)-translokation är det förväntade signalmönstret en röd, en grön och två fusions signaler (1R1G2F).

Andra signalmönster kan förekomma vid aneuploida/obalanserade prover.

Kända relevanta störningar/störande ämnen

Inga kända relevanta störningar/störande ämnen.

Känd korsreaktivitet

Ingen känd korsreaktivitet.

Rapportering av allvarliga incidenter

För patienter/användare/tredje part inom EU och i länder med samma bestämmelser ((EU) 2017/746-direktiv om medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik): allvarliga incidenter som sker i samband med användning av den här enheten ska rapporteras till tillverkaren och behörig nationell myndighet. Allvarliga incidenter som sker i andra länder ska rapporteras till tillverkaren och behörig nationell myndighet (om tillämpligt). För kontakt gällande säkerhetsövervakning hos tillverkare: vigilance@oqt.com En förteckning över kontaktpunkter för säkerhetsövervakning för behöriga nationella myndigheter inom EU finns på: https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

Specifika prestanda

Analytisk specificitet

Analytisk specificitet är den procentandel signaler som hybridiserar till rätt lokus och ingen annan plats. Den analytiska specificiteten fastställdes genom analys av 400 mållokus. Två kromosomloci i var och en av 20 metafasceller från 5 prover analyserades, varav 400 datapunkter erhöles. Den analytiska specificiteten beräknades som antalet FISH-signaler som hybridiserade till rätt lokus dividerat med det totala antalet hybridiserade FISH-signaler.

Den analytiska specificiteten hos varje sond i uppsättningen beräknades som antal FISH-signaler i metafaskromosomer som hybridiserats till rätt locus, dividerat med det totala antalet hybridiserade FISH-signaler i metafaskromosomer. Detta resultat multiplicerades med 100, uttrycktes som procent och angavs med 95 % konfidensintervall.

Tabell 1. Analytisk specificitet för AML1/ETO (RUNX1/RUNX1T1) Translocation, Dual Fusion Probe

Sond	Mål	Antal hybridiserade metafaskromosomer	Antal korrekt hybridiserade loci	Analytisk specificitet (%)	95 % konfidensintervall (%)
AML1, röd	21q22.1	200	200	100	98,12 – 100
ETO, grön	8q21.3	200	200	100	98,12 – 100

Analytisk sensitivitet

Analytisk sensitivitet är den procentandel bedömningsbara interfasceller som har det förväntade normala signalmönstret. Minst 200 interfasceller analyserades för vart och ett av 25 fixerade cellsuspensioner från benmärg i Carnoys lösning som bedömdes vara karyotypiskt normala, vilket gav minst 5 000 bedömda cellkärnor för varje provtyp. Sensitivitetsdata analyserades baserat på procentandelen celler som uppvisade ett normalt förväntat signalmönster och uttrycktes som procent med 95 % konfidensintervall.

Tabell 2. Analytisk sensitivitet för AML1/ETO (RUNX1/RUNX1T1) Translocation, Dual Fusion Probe

Antal celler med förväntade signalmönster	Totalt antal celler med bedömningsbara signaler	Analytisk sensitivitet (%)	95 % konfidensintervall (%)
4965	5000	99,3	99,02, 99,58

Beskrivning av normala cut-off-värden

Det normala cutoff-värdet i samband med FISH-sonder är högsta procentandelen bedömningsbara interfasceller med ett specifikt onormalt signalmönster där ett prov anses normalt för det signalmönstret.

Det normala cut-off-värdet fastställdes med hjälp av prover som var negativa för det rearrangemang som sonden är avsedd att upptäcka och betainversfunktion. För varje prov registrerades signalmönstret i 100 kärnor i interfasc av två oberoende analytiker, totalt 200 per prov.

Cut-off-värdet beräknades med β -invers-funktionen (BETAINV) i MS Excel. Det beräknades som procentandelen interfasceller som uppvisade ett falskt positivt signalmönster. Den övre gränsen av ett ensidigt 95 % konfidensintervall av binomialfördelningen i ett normalt patientprov användes.

Tabell 3. Beskrivning av normala cut-off-värden för AML1/ETO (RUNX1/RUNX1T1) Translocation, Dual Fusion Probe

Onormalt signalmönster	Antal prover som analyserades för att generera cut-off-värde	Antal kärnor som bedömdes per prov	Max antal falskt positiva signalmönster	Normalt cut-off-värde (%)
1R1G2F	1290	200	1	2,3

Laboratorierna måste verifiera cut-off-värden med hjälp av sina egna data^{7,8}.

Reproducerbarhet

Reproducerbarhetsstudier utfördes för att fastställa:

- Reproducerbarhet inom samma dag på 3 laboratorier (prov till prov)
- Reproducerbarhet mellan dagar på 3 laboratorier (dag till dag)
- Reproducerbarhet mellan dagar på 3 laboratorier (plats till plats)
- Reproducerbarhet mellan loter på enskilt laboratorium (lot till lot)

Reproducerbarheten fastställdes av tre fristående laboratorier som testade sex blindprover (två negativa för rearrangemang, två svagt positiva prover som var 1 till 3 gånger cut-off-värdet samt två starkt positiva prover som innehöll mer än 45 % celler som var positiva för rearrangemang). Analysen utfördes på två replikat av varje prov under fem icke-efterföljande dagar.

Alla tre laboratorier jämförde tester inom samma dag, mellan dagar och mellan laboratorier med sond med samma lotnummer. Ett av laboratorierna testade också reproducerbarhet mellan olika lotnummer där sond från tre olika loter användes.

Reproducerbarheten beräknades med hjälp av överensstämmelsen mellan de variabler som undersöktes vid varje test.

Tabell 4. Reproducerbarhet för AML1/ETO (RUNX1/RUNX1T1) Translocation, Dual Fusion Probe

Studie	Kriterier	Resultat
Inom samma dag/mellan dagar/mellan labb	Negativ klass med 90 % överensstämmelse	100 %
	Mycket positiv klass med 95 % överensstämmelse	100 %
Mellan loter	Negativ klass med 90 % överensstämmelse	100 %
	Mycket positiv klass med 95 % överensstämmelse	100 %

Kliniska prestanda

För att säkerställa att AML1/ETO (RUNX1/RUNX1T1) Translocation Dual Fusion Probe upptäcker de avsedda rearrangemangen fastställdes dess kliniska prestanda i fem studier av representativa prover från den avsedda populationen för produkten: fixerat restmaterial av 3:1 metanol/ättiksyra. Studiernas kombinerade provantal var 634 med totalt 35 positiva prover och 599 negativa prover totalt för samtliga anläggningar. Resultatens konkordans/diskordans föll inom de godkända kriterierna för studien.

Resultaten av dessa tester analyserades för att fastställa klinisk sensitivitet, klinisk specificitet och frekvensen av falskt positiva resultat (false positive rate, FPR) för positiva signaler med hjälp av en endimensionell metod.

Tabell 5. Kliniska prestanda för AML1/ETO (RUNX1/RUNX1T1) Translocation, Dual Fusion Probe

Variabel	Resultat
Klinisk sensitivitet (sant positivt resultat, TPR)*	99,74 %
Klinisk specificitet (sant negativt resultat, TNR)*	99,90 %
Falskt positivt resultat (FPR) = 1 – specificitet*	0,10 %

Säkerhets- och prestandasammanfattning (SSP, Summary of Safety and Performance)

Säkerhets- och prestandasammanfattningen ska vara tillgänglig via den europeiska databasen för medicintekniska produkter (Eudamed) och länkat till grundläggande UDI-DI.
URL för Eudamed: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>
Grundläggande UDI-DI: 50558449LPH026JH

Om Eudamed inte är fullt funktionellt ska säkerhets- och prestandasammanfattningen göras offentlig via e-postbegäran till SSP@oqt.com.

Mer information

Kontakta CytoCells tekniska support för att få mer information om produkten.
Tfn: +44 (0)1223 294048
E-post: techsupport@cytocell.com
Hemsida: www.oqt.com

Referenser

- Swerdlow, *et al.* (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC,2017
- Reikvam H, *et al.* J Biomed Biotechnol. 2011; 2011:104631.
- Grimwade, *et al.* Blood. 2001;98(5):1312-1320.
- Harrison, *et al.* Journal of Clinical Oncology. 2010;28(16):2674-2681.
- Grimwade, *et al.* Blood. 2010;116(3):354-365.
- 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.

Symbolordlista

SS-EN ISO 15223-1:2021 – "Medicintekniska produkter – Symboler att användas vid märkning av produkt och information till användare – Del 1: Allmänna krav" (© International Organization for Standardization)		
Symbol	Titel	Referensnummer
	sv: Tillverkare	5.1.1
	sv: Auktoriserad representant inom den europeiska gemenskapen/EU	5.1.2
	sv: Utgångsdatum	5.1.4
	sv: Kod för tillverkningsatsen	5.1.5
	sv: Katalognummer	5.1.6
	sv: Skydda mot solljus	5.3.2
	sv: Temperaturgräns	5.3.7
	sv: Se bruksanvisningen	5.4.3
	sv: Se bruksanvisning i elektronisk form	5.4.3
	sv: Iaktta försiktighet	5.4.4
	sv: Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> - diagnostik	5.5.1
	sv: Innehållet räcker till <n> tester	5.5.5
	sv: Unik produktidentifiering	5.7.10
EDMA-symboler för IVD-reagens och -komponenter – reviderade i oktober 2009		
Symbol	Titel	Referensnummer
	sv: Innehåll (eller innehåller)	Ej tillämpligt

Patent och varumärken
Cytocell är registrerat varumärke som tillhör Cytocell Limited.



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

Tfn: +44 (0)1223 294048
Fax: +44 (0)1223 294986
E-post: probes@cytocell.com
Hemsida: www.ogt.com



Sysmex Europe SE
Bornbarch 1
22848 Norderstedt
TYSKLAND

Tfn: +49 40 527260
Hemsida: www.sysmex-europe.com

Bruksanvisningsversion
V001.00 2023-01-11: Ny bruksanvisning för bestämmelsen (EU) 2017/746
V002 2025-08-29: Borttagning av UKCA-märket.