A Sysmex Group Company

CytoCell

Bruksanvisning

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

FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe

CE IVD
2797

ENDAST FÖR PROFESSIONELLT BRUK

ogt.com/IFU

Mer information och andra språkversioner finns på ogt.com/IFU

Avsett ändamål
CytoCell® *FAST* PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe är ett kvalitativt, icke-automatiserat fluorescerande *in situ*-hybridiseringstest (FISH) som används för att upptäcka rearrangemang mellan region 15q24 på kromosom 15 och region 17q21.1-q21.2 på kromosom 17 i hematologiskt erhållna cellsuspensioner fixerade i Carnoys lösning (3:1 metanol/ättiksyra) från patienter med fastställd eller misstänkt akut myeloisk leukemi (AML).

Bruksanvisning
Den här enheten är avsedd att vara ett komplement till övriga kliniska och histopatologiska undersökningar inom ramen för sedvanlig diagnostik och sjukvård där kännedom om translokationsstatus för *PML::RARA* skulle ha betydelse för den kliniska handläggningen.

Begränsningar
Den här enheten används för att upptäcka rearrangemang med brytpunkter i regionen som täcks av de röda och gröna klonerna i denna sonduppsättning, vilken innefattar regionerna *PML* och *RARA*. Brytpunkter utanför denna region eller varianter av rearrangemang som ligger helt inom denna region upptäcks inte alltid med den här enheten.
Enheten är inte avsedd för fristående diagnostisering, behandlingsvägledande diagnostik, prenatal testning, populationsbaserad screening, patientnära testning eller egentestning.
Enheten har inte validerats för användning på andra prov- eller sjukdomstyper, eller för ändamål som faller utanför den avsedda användning som anges.
Den är avsedd som komplement till andra diagnostiska laboratorietester och behandling bör inte sättas in enbart på grundval av FISH-resultaten.
Rapportering och tolkning av FISH-resultat ska utföras av kvalificerad personal i enlighet med professionell praxis och annan klinisk och diagnostisk information samt andra relevanta testresultat bör beaktas.
Den här enheten är endast avsedd för professionellt bruk i laboratorium.
Underlåtenhet att följa anvisningarna kan påverka prestanda och leda till falskt positiva/negativa resultat.

Principer för testet
In situ-hybridisering med fluorescens (FISH) är en teknik för att upptäcka DNA-sekvenser på metafaskromosomer eller interfaskärnor från fixerade cytogenetiska prover. Tekniken använder DNA-sonder som hybridiserar till hela kromosomer eller enstaka unika sekvenser och fungerar som ett kraftfullt komplement till cytogenetisk analys med Giemsa-färgning. Tekniken går nu att tillämpa som ett viktigt undersökningsverktyg vid prenatala och hematologiska kromosomanalyser liksom vid kromosomanalyser av solida tumörer. Mål-DNA kan efter fixering och denaturering hybridisera till en likaledes denaturerad, fluorescensmärkt DNA-sond med en komplementär sekvens. Efter hybridisering avlägsnas obunden och ospecifikt bunden DNA-sond, och DNA kontrastfärgas för visualisering. Fluorescensmikroskopi synliggör den hybridiserade sonden på målmaterialet.

Information om sonden
Genen *PML* (*promyelocytic leukemi*) sitter på 15q24.1 och genen *RARA* (*retinoic acid receptor alpha*) sitter på 17q21.2. Translokationen t(15;17)(q24;q21) ger upphov till fusionsgenen *PML::RARA* och är det diagnostiska kännetecknet för akut promyelocytleukemi (APL).

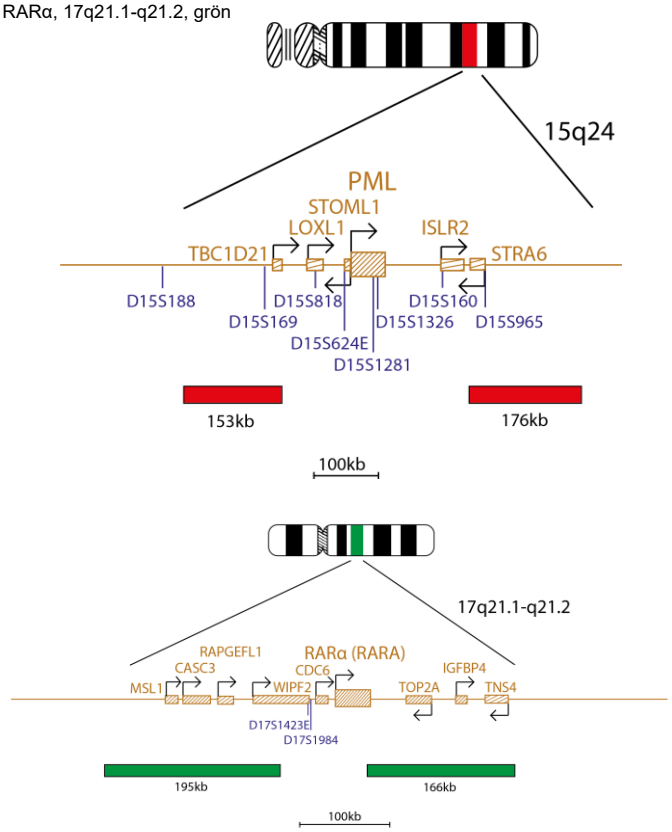
Sonden FAST PML/RARα FISH möjliggör snabb upptäckt av rearrangemanget då endast en timmes hybridisering krävs.

Fusionsgenen *PML*:: *RARA* produceras av translokationen t(15;17)(q24;q21) som ses i över 90 % av fallen av APL, en leukemi som utgör 5 – 8 % av alla fall av akut myeloisk leukemi (AML)[1,2]. I en andel av fallen kan varianter av *RARA*-translokationer ses. Kända fusionspartners är bland annat *NPM1* på 5q35, *NUMA1* på 11q13, *ZBTB16* (*PLZF*) på 11q23, *STAT5B* på 17q21, *PRKAR1A* på 17q24, *FIP1L1* på 4q12 och *BCOR* på Xp11[3,4,5].

Både *PML* och *RARA* har implicerats vid normal hematopoes. *PML* har aktivitet för tillväxthämning och apoptosfrämjande, medan *RARA* är en transkriptionsfaktor som reglerar effekten av retinoidsyra vid specifika svarselement[6]. Fusionsproteinet PML::RARA beter sig som en förändrad retinoidsyrareceptor med förmågan att avge onkogena signaler[7].

Omedelbar behandling av patienter med APL är av yttersta vikt på grund av dödliga koagulationsstörningar och livshotande blödning vid diagnos. Innan tretinoin (all-trans-retinoic-acid, ATRA) och arseniktrioxid (ATO) infördes i behandlingsprotokollen för APL hade sjukdomen dålig prognos. Men sedan dessa behandlingar infördes har den övergripande överlevnaden ökat dramatiskt och nästan 90 %[5] av patienterna botas. Patienter med varianter av *RARA*-translokationer uppvisar varierande mottaglighet för behandling. Vissa patienter uppvisar resistens mot behandlingsprotokollen[3,5]. Därför är det viktigt att skilja mellan APL-patienter med *PML::RARA*-fusion och patienter med varianter av *RARA*-translokationer.

Sondens specifikationer
PML, 15q24, röd
RARα, 17q21.1-q21.2, grön



Sondblandningen för PML (märkt i rött) består av en sond på 153 kb som fäster centromert om *PML*-genen som täcker markören D15S169, och en sond på 176 kb som fäster telomert om *PML*-genen som täcker markören D15S965. Sondblandningen för *RARα* (*RARA*) (märkt i grönt) består av en sond på 195 kb som fäster centromert om *RARα* (*RARA*)-genen och sträcker sig över *CASC3*-genen, och en sond på 166 kb som inkluderar den telomera änden av *RARα* (*RARA*)-genen samt generna *TOP2A*, *IGFBP4* och *TNS4*.

Material som medföljer
Sond: 50 µl per flaska (5 tester), 100 µl per flaska (10 tester)
Sonderna tillhandahålls förblandade i hybridiseringslösning (< 65 % formamid, < 20 mg dextransulfat, < 10 % av 20x natriumklorid-natriumcitrat (SSC-buffert)) och är färdiga att användas.

Kontrastfärg: 150 µl per flaska (15 tester)
Kontrastfärgen är DAPI antifade ES (0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol) i glycerolbaserat fästmedel).

Varningar och försiktighetsåtgärder
1. För *in vitro*-diagnostik. Endast för professionellt bruk i laboratorium.

2. Sondblandningarna innehåller formamid som är en teratogen. Undvik inandning av ångorna och hudkontakt. Hantera varsamt. Använd handskar och laboratorierock.
3. Hantera DAPI varsamt. Använd handskar och laboratorierock.
4. Använd inte skadade flaskor eller om dess innehåll har äventyrats på något sätt.
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/fryst/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 ºC och -15 ºC i frys 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 ºC)
2. Kalibrerade inställningsbara mikropipetter och spetsar med volym mellan 1 – 200 µl
3. Vattenbad med exakt temperaturreglering vid 37 ºC och 72 ºC
4. Mikrocentrifugrör (0,5 ml)
5. Fluorescensmikroskop (se avsnittet om rekommendationer för fluorescensmikroskop)
6. Faskontrastmikroskop
7. Rena kyvetter av plast, keramiskt material eller värmetåligt 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 ºC 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 fluoroforer som används i denna sonduppsättning exciteras och emitteras vid följande våglängder:

Fluorofor	$Excitation_{max}$ [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 tredubbelt bandpassfilter för DAPI/grönt spektrum/rött spektrum eller ett dubbelt bandpassfilter för grönt/rött spektrum för optimal samtidig visualisering av de gröna och röda fluoroforerna.
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 Carnoys lösning (3:1 metanol/ättiksyra) 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 objektglas[8].

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.

***SNABBT* FISH-protokoll – En (1) timmes hybridisering**

(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 ºC (+/- 1 ºC) 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 ºC (+/- 1 ºC) i 2 minuter.

Hybridisering

11. Låt objektglaset ligga i en fuktig, ljustät behållare vid 37 ºC (+/- 1 ºC) i en (1) timme.

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 ºC (+/- 1 ºC) 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**).

Standard FISH-protokoll – Hybridisering över natt
(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 ºC (+/- 1 ºC) 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 ºC (+/- 1 ºC) i 2 minuter.

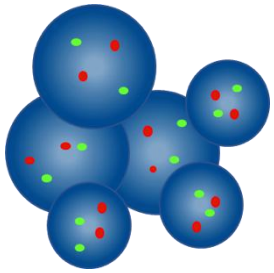
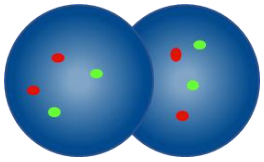
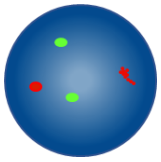
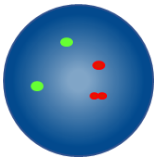
Hybridisering
11. Lägg objektglaset över natten i en fuktig, ljustät behållare vid 37 ºC (+/- 1 ºC).

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 ºC (+/- 1 ºC) 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**).

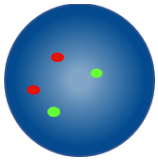
Rekommendationer för förfarande
1. Objektglas som har ugnsfixerats eller åldrats ger en svagare fluorescenssignal.
2. Hybridiseringen kan påverkas negativt vid användning av andra reagenser än de som tillhandahålls eller rekommenderas av Cytocell Ltd.
3. Använd en kalibrerad termometer för att mäta temperaturen på lösningar, vattenbad och inkubatorer eftersom dessa temperaturer är avgörande för att produkten ska fungera optimalt.
4. 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.
5. Ofullständig denaturering kan ge utebliven signal, och överdenaturering kan även resultera i icke-specifik bindning.
6. Överhybridisering kan ge extra eller oväntade signaler.
7. Användaren bör optimera protokollet för sina egna prover innan testet används för diagnosändamål.
8. Bristfälliga förhållanden kan resultera i icke-specifik bindning som kan misstolkas som en sondsignal.

Tolkning av resultaten
Bedömning av objektglasets kvalitet
Objektglaset 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 objektglaset 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 cytoplasmatiskt skräp eller har hög grad av autofluorescens.
- Undvik områden med stora mängder cytoplasmatiskt 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.
- Vid analys av tvåfärgade separationssonder gäller att om mellanrummet mellan den röda och gröna signalen inte är större än 2 signalbredder ska signalen räknas som icke rearrangerad/sammanslagen.
- Vid analys av trefärgade separationssonder gäller att om mellanrummet mellan någon av de tre signalerna (röda, gröna och blå) inte är större än två signalbredder ska signalen räknas som icke rearrangerad/sammanslagen.
- Om det finns tvivel om huruvida en cell går att analysera eller inte, låt bli att analysera den.

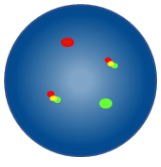
Riktlinjer för analysen	
	Räkna inte – kärnorna ligger för nära varandra för att avgränsningarna ska kunna bedömas.
	Räkna inte överlappande kärnor – alla områden i båda kärnor kan inte ses.
	Räkna som två röda signaler och två gröna signaler – en av de två röda signalerna är diffus.
	Räkna som två röda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

Förväntade onormala signalmönster



I celler med translokationen t(15;17)(q24.1;q21) förväntas en röd signal, en grön signal och två fusionssignaler (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@ogt.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 definieras som den procentandel signaler som hybridiserar till rätt locus och ingen annan plats. Fyra kromosomloci i var och en av tjugo metafasceller från samtliga fem prov analyserades, varav 400 datapunkter erhölls. Placeringen av varje hybridiserad sond kartlades och antalet FISH-signaler i metafaskromosomer som hybridiserade till rätt locus registrerades.

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 *FAST* PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe

Mål	Antal hybridiserade metafaskro-mosomer	Antal korrekt hybridiserade loci	Analytisk specificitet	95 % konfidensintervall
15q24.1	200	200	100 %	98,12 – 100 %
17q21.1-17q21.2	200	200	100 %	98,12 – 100 %

Analytisk sensitivitet
Analytisk sensitivitet är den procentandel bedömningsbara interfasceller som har det förväntade normala signalmönstret. Minst 100 interfasceller analyserades för vart och ett av 25 fixerade cellsuspensioner från benmärg och 25 fixerade cellsuspensioner från perifert blod med en snabbhybridiseringsmetod, och 25 fixerade cellsuspensioner från benmärg med hybridisering över natt. Detta resulterade i minst 2 500 bedömda kärnor för perifert blod och 5 000 bedömda kärnor för benmärgsprov. Sensitivitetsdata analyserades baserat på procentandelen celler som uppvisade ett normalt förväntat signalmönster och uttrycktes som procent med 95 % konfidensintervall.

Tabell 2. Analytisk sensitivitet för *FAST* PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe

Provtyp	Sensitivitetskriterier	Sensitivitetsresultat
Benmärg – snabb hybridisering	> 95 %	98,80 % (97,96 – 99,63 %)
Benmärg – hybridisering över natt	> 95 %	98,52 % (97,76 – 99,28 %)
Perifert blod – snabb hybridisering	> 95 %	99.31 % (98.66 – 100.00 %)

Beskrivning av normala cut-off-värden
Det normala cut-off-värdet definieras som procentandelen celler som uppvisar ett falskt positivt signalmönster med vilket en individ skulle anses normal och som inte stämmer överens med en klinisk diagnos. Minst 100 interfasceller analyserades för vart och ett av 25 fixerade cellsuspensioner från benmärg och 25 fixerade cellsuspensioner från perifert blod med en snabbhybridiseringsmetod, och 25 fixerade cellsuspensioner från benmärg med hybridisering över natt. Detta resulterade i minst 2 500 bedömda kärnor för perifert blod och 5 000 bedömda kärnor för benmärgsprov.

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 FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe

Provtyp	Cut-off-resultat
Benmärg – snabb hybridisering	2,71 %
Benmärg – hybridisering över natt	3,44 %
Perifert blod – snabb hybridisering	4,36 %

Laboratorierna måste verifiera cut-off-värden med hjälp av sina egna data[9,10].

Precision
Produktens precision har uppmätts som precision inom samma dag (från prov till prov), precision mellan olika dagar (från dag till dag) och precision mellan olika loter på samma inrättning (från lot till lot).

Två prover per hybridiseringsmetod användes för att bedöma precisionen hos produkten: ett negativt benmärgsprov och ett svagt positivt benmärgsprov. Det svagt positiva benmärgsprovet (2-4x produktens cut-off-värde) skapades genom att tillsätta ett känt positivt prov till ett normalt benmärgsprov som användes för att testa produkten runt det fastställda cut-off-värdet.

För att fastställa precisionen mellan dagar och inom samma dag utvärderades proverna under tio ej efterföljande dagar, och för att fastställa precisionen mellan loter utvärderades tre lotnummer av produkten på tre replikat av samma prover. Resultaten presenterades som övergripande överensstämmelse med den förutspått negativa klassen (för de negativa proverna).

Tabell 4. Reproducerbarhet och precision för *FAST* PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe

Variabel	Provtyp	Överensstämmelse
Reproducerbarhet under samma dag (prov till prov) och mellan dagar (dag till dag)	Benmärg, negativt	100 %
	Benmärg, svagt positivt	100 %
Reproducerbarhet mellan loter	Benmärg, negativt	100 %
	Benmärg, svagt positivt	100 %

Kliniska prestanda
För att säkerställa att produkten upptäcker de avsedda rearrangemangen fastställdes dess kliniska prestanda i en studie av representativa prover från den avsedda populationen för produkten: fixerat restmaterial av hematologiskt erhållna metanol/ättiksyra. 136 prover användes med en population av 43 positiva och 93 negativa prover. Resultaten jämfördes med provets kända status som fastställts med en jämförelsemetod. 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 *FAST* PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe

Variabel	Resultat
Klinisk sensitivitet (sant positivt resultat, TPR)	98,93 %
Klinisk specificitet (sant negativt resultat, TNR)	99,58 %
Falskt positivt resultat (FPR) = 1 – specificitet	0,42 %

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: 50558449LPH064JR

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

Referenser

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.

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 tillverkningssatsen	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
ogt.com/IFU	**sv:** Se bruksanvisning i elektronisk form	5.4.3
	sv: Iaktta försiktighet	5.4.4
	sv: Medicinteknisk produkt för *in vitro*-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 2023-01-25: Ny bruksanvisning för bestämmelsen (EU) 2017/746
V002 2025-08-29: Borttagning av UKCA-märket