



A Sysmex Group Company



Käyttöohje

VIITE: LPH 108-S / LPH 108

IGH/MAF Plus v2 Translocation, Dual Fusion Probe -koetin



VAIN AMMATTIKÄYTTÖÖN



www.cytocell.com

Lisätietoja ja muita kieliä saatavilla osoitteesta www.ogt.com

Rajoitukset

Tämä laite on suunniteltu havaitsemaan uudelleenjärjestymiä, joissa on katkoskohtia koetinsarjan punaisten ja vihreiden kloonien sitomalla alueella, johon sisältyvät IGH- ja MAF-alueet. Tämä tuote ei ehkä havaitse kyseisen alueen ulkopuolisia katkoskohtia tai vaihtoehtoisia uudelleenjärjestymiä, jotka sisältyvät kokonaisuudessaan tälle alueelle.

Testiä ei ole tarkoitettu käytettäväksi riippumattomaan diagnostiikkaan, raskausajan tutkimuksiin, väestöpohjaiseen seulontaan, vieritestaukseen tai itsestestaukseen. Tämä tuote on tarkoitettu ainoastaan ammattimaiseen laboratoriokäyttöön; soveltuvan pätevyyden saaneen henkilöstön on tulkittava kaikki tulokset ottaen huomioon muut asiaankuuluvat testitulokset.

Tätä tuotetta ei ole validoitu käytettäväksi sellaisen näyte- tai tautityyppien kohdalla, joita ei ole määritetty aiotussa käyttöärsäilyksessä.

FISH-tulosten raportoinnin ja tulkin on oltava yhdenmukainen ammattimaisten käytäntöstandardien kanssa, ja niissä on otettava huomioon muut kliiniset ja diagnostiset tiedot. Sarja on tarkoitettu muiden diagnostisten laboratorioiden apuvälineeksi, eikä hoitotoimia saa käynnistää yksinomaan FISH-tuloksen perusteella.

Mikäli protokollaa ei noudateta, se saattaa vaikuttaa suorituskykyyn ja johtaa virheellisiin positiivisiin/negatiivisiin tuloksiin.

Tätä sarjaa ei ole validoitu mainitusta aiotusta käyttöärsäilyksestä poikkeavaan käyttöön.

Aiottu käyttöärsäily

CytoCell IGH/MAF Plus v2 Translocation, Dual Fusion Probe -koetin on kvalitatiivinen, ei-automatisoitu FISH (fluorescence *in situ* hybridisation) -testi, jota käytetään kromosomien uudelleenjärjestymien havaitsemiseen kromosomin 14 alueen 14q32.3 ja kromosomin 16 alueen 16q23 välillä Carnoy'n liuokseen (3:1 metanoli/etikkahappo) fiksoituiduille, hematologisesti johdetuille solususpensioille potilailta, joilla on vahvistettu tai epäilty multipple myelooma (MM).

Käyttöärsäily

Tämä tuote on suunniteltu käytettäväksi muiden kliinisten ja histopatologisten testien lisäksi vakintuneissa diagnostiikan ja kliinisen hoidon hoitopoluissa, joissa tieto IGH-MAF-translokaation tilasta olisi tärkeää kliiniselle hoidolle.

Testin periaatteet

Fuoresenssi *in situ* -hybridisaatio (FISH) on tekniikka, jonka avulla DNA-sekvenssejä voidaan havaita metafaasikromosomeista tai fiksoitujen sytogeneettisten näytteiden interfaasitumista. Tekniikassa käytetään DNA-koettimia, joiden avulla hybridisaatio koskee kokonaisia kromosomeja tai yksittäisiä, ainutkertaisia sekvenssejä ja jotka toimivat tehokkaana sytogeneettisen G-raita-analyysin apuvälineenä. Tätä tekniikkaa voidaan nyt käyttää olennaisena tutkimustyökaluna raskauden aikaiseen, hematologiseen ja kiinteiden tumorien kromosomianalyysiin. Kohde-DNA on fiksaation ja denaturaation jälkeen saatavilla palautumiseksi samoin denaturoituun, fluoresenssimerkittyyn DNA-koettimeen, jolla on täydentävä sekvenssi. Hybridisaation jälkeen sitomaton ja muu kuin spesifisesti sidottu DNA-koetin poistetaan, ja DNA vastavärijätään visualisointia varten. Sen jälkeen hybridisoitu koetin voidaan visualisoida fluoresenssimikroskopian avulla kohdemateriaalissa.

Koettimen tiedot

MAF (MAF bZIP -transkriptiotekijä) -geeni paikantuu alueelle 16q23, ja IGH (immunoglobuliinin raskasketjun lokus) paikantuu alueelle 14q32.3. Noin 50–60 prosenttiin multipple myelooman (MM) tapauksista liittyy translokaatioita, joissa on mukana IGH ja yksi useista partnereista, mukaan lukien CCND1, NSD2 (WHSC1) ja FGFR3, CCND3, MAF tai MAFB¹. Translokaatio t(14;16)(q32.3;q23) on usein tavattu translokaatio, jota esiintyy 2–10 prosentissa MM-tapauksia¹.

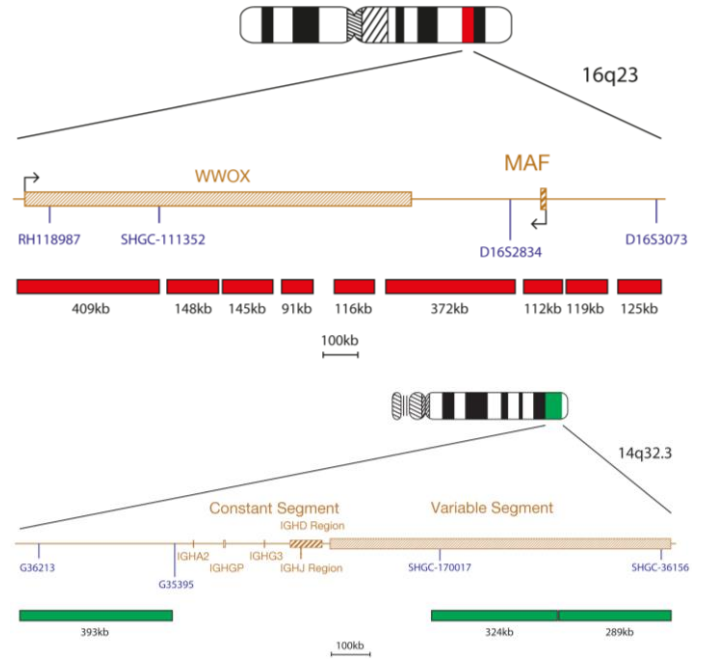
Suurin osa katkoskohdista esiintyy WWOX:n (WW-domeenia sisältävä oksidoreduktaasi) viimeisessä intronissa, MAF:n sentromeerisella puolella. Näitä katkoskohdilla on kaksoisvaikutus, sillä ne asettavat IGH-tehostajan MAF:n lähelle ja häiritsevät WWOX-geenin toimintaa². Myeloomasolulinjojen geenien ilmentymän profiloinnissa todettiin, että MAF aiheutti syklini D2:n (solusykin etenemisen edistäjä) transaktivaation ja tehosti siten myeloomasolujen proliferaatiota³.

Kirjallisuuden mukaan kliininen lopputulos näyttää olevan aggressiivisempi MM-potilailta, joilla on t(14;16)^{4,5}.

Koettimen tekniset tiedot

MAF, 16q23, punainen

IGH, 14q32.3, vihreä



IGH/MAF Plus v2 Translocation, Dual Fusion Probe -koetin koostuu vihreällä leimatusta IGH-koetinseoksesta, joka kattaa IGH-alueen vakiosegmentin proksimaaliset alueet ja variaabelisegmentin sekä punaisella leimatusta MAF-koetinseoksesta, joka sisältää MAF-geenin ja vieräiset alueet sekä WWOX-geenin.

Toimitettavat materiaalit

Koetin: 50 µl pulloa kohti (5 testiä) tai 100 µl pulloa kohti (10 testiä)

Koetimet toimitetaan ennalta sekoitettuna hybridisaatio-liuokseen (formamidi, dekstraanisulfaatti, suolaliuos-natriumsitraatti (SSC)), ja ne ovat valmiita käytettäväksi.

Vastaväri: 150 µl pulloa kohti (15 testiä)

Vastaväri on DAPI häipymistä ehkäisevä (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenyyli-indoli)).

Varoitukset ja varotoimet

- Tarkoitettu *in vitro*-diagnostiikkakäyttöön. Vain ammattikäyttöön.
- Käytä käsinettä käsitellessäsi DNA-koettimia ja DAPI-vastaväriä.
- Koetinseokset sisältävät formamidiä, joka on teratogeeni: älä hengitä höyryä sisään tai päästä ainetta kosketuksiin ihon kanssa. Käsiteltävä varoen: käytä käsinettä ja laboratoriokatkua.
- DAPI on potentiaalinen karsinogeeni. Käsiteltävä varoen: käytä käsinettä ja laboratoriokatkua.
- Hävitä kaikki vaaralliset materiaalit laitoksesi vaarallisten jätteiden hävittämistä koskevien ohjeiden mukaan.
- Käyttäjien on pystyttävä erottamaan toisistaan punainen, sininen ja vihreä väri.
- Mikäli hahmoteltua protokollaa ei noudateta ja sen mukaisia reagensseja ei käytetä, se saattaa vaikuttaa suorituskykyyn ja johtaa virheellisiin positiivisiin/negatiivisiin tuloksiin.
- Koetinta ei saa laimentaa tai sekoittaa muiden koetinten kanssa.
- Mikäli 10 µl:n koetinta ei käytetä protokollan esidenaturaatiovaiheessa, se saattaa vaikuttaa suorituskykyyn ja johtaa virheellisiin positiivisiin/negatiivisiin tuloksiin.

Säilytys ja käsittely



Sarjaa on säilytettävä pakastimessa $-25 \dots -15 \text{ }^\circ\text{C}$:n lämpötilassa etiketissä ilmoitettuun eräpäivään saakka. Koetinta ja vastaväripulloja on säilytettävä pimeässä.



Koetin pysyy vakaana normaalissa käytössä ilmenevien pakastus- ja sulatusjaksojen ajan (jolloin yhden jakson aikana koetin poistetaan pakastimesta ja laitetaan takaisin pakastimeen), ja se on fotostabiili jopa 48 tuntia altistuttuaan jatkuville valaistusolosuhteille. On ryhdyttävä kaikkiin mahdollisiin toimenpiteisiin valolle ja lämpötilan muutoksille altistumisen rajoittamiseksi.

Laitteisto ja materiaalit Tarvittavat mutta pakkauksen sisältymätömät

Kalibroituja laitteistoja on käytettävä:

1. Lämpölevy (kiinteällä levyllä ja tarkalla lämpötilan hallinnalla $80 \text{ }^\circ\text{C}$:n lämpötilaan saakka)
2. Kalibroidut tilavuudeltaan vaihtelevat mikropipetit ja kärjet, 1–200 μl
3. Vesikylypy tarkalla lämpötilan hallinnalla $37 \text{ }^\circ\text{C}$:n ja $72 \text{ }^\circ\text{C}$:n lämpötilassa
4. Mikrosentrifugiletkut (0,5 ml)
5. Fluoresenssimikroskooppi (katso Fluoresenssimikroskooppisuositus-osio)
6. Vaihekontrastimikroskooppi
7. Coplin-purkit puhdasta muovia, keramiikkaa tai lämmönkestävää lasia
8. Pihdit
9. Kalibroitu pH-mittari (tai pH-indikaattoriliuskat, joilla voidaan mitata 6,5–8,0:n pH-arvo)
10. Kostutettu säiliö
11. Fluoresenssiluokan mikroskooppilinsin immersioöljy
12. Työpöytäsentrifugi
13. Mikroskooppiobjekttilasi
14. 24 x 24 mm:n peitelasi
15. Ajustin
16. $37 \text{ }^\circ\text{C}$:n inkubaattori
17. Kumiliuosliima
18. Pyörresekoitin
19. Mittasylinteri
20. Magneettinen sekoitin
21. Kalibroitu lämpömittari

Valinnainen laitteisto, ei sisälly pakkaukseen

1. Sytogeneettinen kuivauskammio

Tarvittavat reagenssit, jotka eivät sisälly pakkaukseen

1. 20x suolaliuos-natriumsitraattiliuos (SSC)
2. 100 % etanolia
3. Tween-20
4. 1M natriumhydroksidi (NaOH)
5. 1M suolahappo (HCl)
6. Akkuvesi

Fluoresenssimikroskooppisuositus

Käytä 100 watin elohopealamppua tai vastaavaa ja öljyimmersionsuunnitelman 60/63x- tai 100x-apokromaattiobjektiveja parhaaseen mahdolliseen visuaalisointiin. Tässä koetinsarjassa käytettävät loisteaineet virittyvät ja säteilevät seuraavilla aaltopituuksilla:

Loisteaine	Viritys _{Smaks} [nm]	Emissio _{Smaks} [nm]
Vihreä	495	521
Punainen	596	615

Varmista, että mikroskooppiin on sovitettu asianmukaiset viritys- ja emissiosuodattimet, jotka kattavat yllä luetellut aallonpituudet. Käytä DAPI-/vihreän spektrin/punaisen spektrin kolmoiskaistanpäästösuodatinta tai vihreän spektrin/punaisen spektrin kaksiskaistanpäästösuodatinta vihreän ja punaisen loisteaineen optimaaliseen samanaikaiseen visuaalisointiin.

Tarkista fluoresenssimikroskooppi ennen käyttöä varmistaaksesi, että se toimi asianmukaisesti. Käytä immersioöljyä, joka soveltuu fluoresenssimikroskoopille ja jonka koostumus on tarkoitettu alhaiselle automaattiselle fluoresenssille. Vältä häipymistä ehkäisevän DAPIn sekoittamista mikroskoopin immersioöljyn kanssa, sillä se hämärtää signaaleita. Noudata valmistajien suosituksia lampun käyttöön ja suodatinten iän suhteen.

Näytteen valmistelu

Sarja on suunniteltu käytettäväksi hematologisesti johdettuihin solususpensioihin, jotka on fiksatoitu Carnoyn liuosfiksatiiviin (3:1 metanoli/etikahappo), jotka on valmisteltu laboratorion tai laitoksen suuntaviivojen mukaisesti. Valmistele ilmakuivatut näytteet mikroskoopin objektiivilaseille sytogeneettisten vakio-toimenpiteiden mukaisesti. AGT-sytogeneetikkalaboratorion opaskirja sisältää suosituksia näytteen keräämisestä, viljelystä, poiminnasta ja objektiivilasiin valmistelusta⁷.

Liuksen valmistus

Etanoli-liuos

Laimenna 100 % etanoli akkuviedellä seuraavissa suhteissa ja sekoita huolellisesti

- 70 % etanolia – 7 osaa 100 % etanolia ja 3 osaa akkuvettä
 - 85 % etanolia – 8,5 osaa 100 % etanolia ja 1,5 osaa akkuvettä
- Säilytä liuosta enintään 6 kuukautta huoneenlämpötilassa ilmatiiviissä säiliössä.

2 x SSC-liuos

Laimenna 1 osa 20 x SSC-liuosta 9 osaan akkuvettä ja sekoita huolellisesti. Tarkista pH ja säädä pH-arvoon 7,0 käyttäen natriumhydroksidia tai vetykloridia

tarpeen mukaan. Säilytä liuosta enintään 4 viikkoa huoneenlämpötilassa ilmatiiviissä säiliössä.

0,4 x SSC-liuos

Laimenna 1 osa 20 x SSC-liuosta 49 osaan akkuvettä ja sekoita huolellisesti. Tarkista pH ja säädä pH-arvoon 7,0 käyttäen natriumhydroksidia tai vetykloridia tarpeen mukaan. Säilytä liuosta enintään 4 viikkoa huoneenlämpötilassa ilmatiiviissä säiliössä.

2 x SSC, 0,05 % Tween-20-liuos

Laimenna 1 osa 20 x SSC-liuosta 9 osaan akkuvettä. Lisää 5 μl Tween-20-liuosta 10 ml kohti ja sekoita huolellisesti. Tarkista pH ja säädä pH-arvoon 7,0 käyttäen natriumhydroksidia tai vetykloridia tarpeen mukaan. Säilytä liuosta enintään 4 viikkoa huoneenlämpötilassa ilmatiiviissä säiliössä.

FISH-protokolla

(Huomautus: Varmista, että koettimen ja vastavärin altistuminen laboratorioalalle on aina rajallista).

Objektiivilasin valmistelu

1. Laita pisara solunäytettä mikroskooppiobjekttilasille. Anna kuivua. (Vaihtoehtoisesti, jos käytetään sytogeneettistä kuivauskammioita: mikroskooppiobjekttilasille on asetettava pisara näytettä sytogeneettisen kuivauskammion avulla. Kammioita on käytettävä noin $25 \text{ }^\circ\text{C}$:n lämpötilassa ja 50 %:n kosteudessa, jotta solunäytepisara voidaan asettaa optimaalisesti lasille. Mikäli sytogeneettistä kuivauskammioita ei ole saatavilla, käytä vaihtoehtoisesti vetokaappia).
2. Upota objektiivilasi 2 x SSC-liuokseen 2 minuutiksi huoneenlämpötilassa ravistamatta.
3. Kuivaa kutakin etanolisarjassa (70 %, 85 % ja 100 %) 2 minuuttia huoneenlämpötilassa.
4. Anna kuivua.

Esidenaturaatio

5. Poista koetin pakastimesta ja anna sen lämmetä huoneenlämpötilaan. Sentrifugoi putkia lyhyen aikaa ennen käyttöä.
6. Varmista, että koetinliuos on sekoitettu yhtenäisesti pipetillä.
7. Poista 10 μl koetinta testiä kohti ja siirrä se mikrosentrifugiputkeen. Palauta jäljelle jäänyt koetin nopeasti pakastimeen.
8. Aseta koetin ja näyteobjektiivilasi esilämpimään $37 \text{ }^\circ\text{C}$:n (+/- $1 \text{ }^\circ\text{C}$) lämpölevylle 5 minuutiksi.
9. Laita 10 μl koetinseosta solunäytteelle ja aseta peitelasi varoen paikalleen. Sulje kumiliuosliimalla ja anna liiman kuivua täysin.

Denaturaatio

10. Denaturoi näyte ja koetin samanaikaisesti kuumentamalla objektiivilasia lämpölevyllä 2 minuutin ajan $75 \text{ }^\circ\text{C}$:n (+/- $1 \text{ }^\circ\text{C}$) lämpötilaan.

Hybridisaatio

11. Laita objektiivilasi yöksi kosteaan valonkestävään säiliöön $37 \text{ }^\circ\text{C}$:n (+/- $1 \text{ }^\circ\text{C}$) lämpötilaan.

Hybridisaation jälkeiset pesut

12. Poista DAPI pakastimesta ja anna sen lämmetä huoneenlämpötilaan.
13. Poista peitelasi ja kaikki liimajäljet huolellisesti.
14. Upota objektiivilasi 0,4 x SSC-liuokseen (pH 7,0) 2 minuutiksi $72 \text{ }^\circ\text{C}$:n (+/- $1 \text{ }^\circ\text{C}$) lämpötilassa ravistamatta.
15. Tyhjennä objektiivilasi ja upota se 30 sekunniksi 2 x SSC-liuokseen ja 0,05 % Tween-20-liuokseen huoneenlämpötilassa (pH 7,0) ravistamatta.
16. Tyhjennä objektiivilasi ja laita kuhunkin näytteeseen 10 μl häipymistä ehkäisevää DAPia.
17. Peitä peitelasilla, poista mahdolliset kuplat ja anna värin kehittyä pimeässä 10 minuuttia.
18. Tarkastele fluoresenssimikroskoopilla (katso Fluoresenssimikroskooppisuositus).

Valmiiden objektiivilasiin vakaas

Valmiita objektiivilaseja voidaan analysoida enintään 1 kuukausi, mikäli niitä säilytetään pimeässä huoneenlämpötilassa tai sitä matalammassa lämpötilassa.

Toimenpidesuositukset

1. Objektiivilasiin sintraaminen tai ikäännyttäminen saattaa heikentää signaalin fluoresenssia
2. Muiden kuin Cytocell Ltd -yhtiön toimittamien tai suosittelemien reagenssien käyttö saattaa vaikuttaa haitallisesti hybridaatio-olosuhteisiin.
3. Käytä liuosten, vesikylypyjen ja inkubaattorien lämpötilojen mittaukseen kalibroitua lämpömittaria, sillä nämä lämpötilat ovat ratkaisevan tärkeitä tuotteen optimaalisen suorituskyvyn kannalta.
4. Pesupitoisuudet, pH-arvo ja lämpötilat ovat tärkeitä, sillä liiallinen löyhys saattaa johtaa koettimen epäspesifiseen sitoutumiseen ja liiallinen ankaruus signaalin puuttumiseen.
5. Epätäydellinen denaturaatio saattaa johtaa signaalin puuttumiseen ja liiallinen denaturaatio saattaa myös johtaa epäspesifiseen sitoutumiseen.
6. Liiallinen hybridaatio saattaa johtaa ylimääräisiin tai odottamattomiin signaaleihin.
7. Käyttäjien on optimoitava omien näytteidensä protokolla ennen testin käyttöä diagnostisiin tarkoituksiin.
8. Suboptimaaliset olosuhteet saattavat johtaa epäspesifiseen sitoutumiseen, jotka saatetaan tulkita koetinsignaaleiksi.

Tulosten tulkitseminen

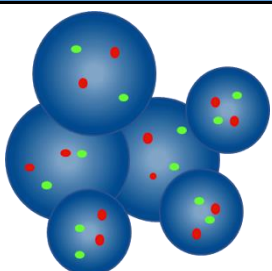
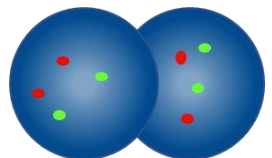
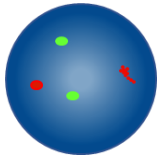
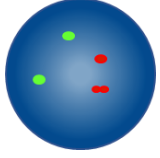
Objektiivilasin laadun arviointi

Objektiivilasia ei tarvitse analysoida, jos:

- yksittäisten suodatintien signaalit ovat liian heikkoja analysoitavaksi – jotta analyysia voidaan jatkaa, signaalien on näytävä kirkkaina, selkeinä ja helposti arvioitavina
- analyysia vaikeuttaa suuri määrä yhteen kasautuneita / päällekkäisiä soluja
- >50 % soluista ei ole hybridisoituneita
- solujen välissä on liikaa fluoresoivia hiukkasia ja/tai fluoresoivaa utua, joka häiritsee signaaleita – optimaalisissa objektiivilaseissa taustan pitäisi näkyä tummana tai mustana ja puhtaana
- solun tumman rajoja ei voida erottaa, eivätkä ne ole eheitä.

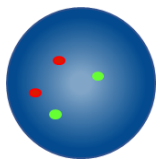
Analysointiohjeet

- Kahden analyytikon pitäisi analysoida ja tulkita jokainen näyte. Kaikki eriävyydet on annettava kolmannen analyytikon arvioitavaksi.
- Jokaisella analyytikolla on oltava sopiva pätevyys tunnustettujen kansallisten standardien mukaan.
- Jokaisen analyytikon pitäisi saada riippumattomasti 100 tumaa kustakin näytteestä. Ensimmäisen analyytikon pitäisi käynnistää analyysi objektiivilasin vasemmalta puolelta ja toisen analyytikon oikealta puolelta.
- Kunkin analyytikon on dokumentoitava tuloksiaan erillisillä arkeilla.
- Analysoi vain eheitä tumia, ei päällekkäisiä tai yhteen kasautuneita tumia tai sellaisia tumia, jotka ovat sytoplasmajätteen peitossa tai joissa on runsaasti autofluoresenssia.
- Vältä alueita, joilla on liiallista sytoplasmajätettä tai epäspesifistä hybridisaatiota.
- Signaalin intensiteetti saattaa vaihdella yksittäisenkin tumman kohdalla. Käytä tällaisissa tapauksissa yksittäisiä suodattimia ja/tai säädä fokustasoa.
- Suboptimaalisissa olosuhteissa signaalit saattavat näyttää hajanaisilta. Jos kaksi samanväristä signaalia koskettaa toisiaan, jos niiden välinen etäisyys on enintään yhtä suuri kuin kahden signaalin leveys tai jos kahta signaalia yhdistää heikko säie, katso ne yhdeksi signaaliksi.
- Mikäli on epäilystä siitä, voidaanko solu analysoida, älä analysoi sitä.

Analysointiohjeet	
	Älä laske – tumat ovat liian lähekkäin, jotta rajoja voisi määrittää
	Älä laske päällekkäisiä tumia – kummankin tumman kaikki alueet eivät ole näkyvissä
	Laske kahdeksi punaiseksi signaaliksi ja kahdeksi vihreäksi signaaliksi – toinen kahdesta punaisesta signaalista on hajanainen
	Laske kahdeksi punaiseksi signaaliksi ja kahdeksi vihreäksi signaaliksi – toisen punaisen signaalin rako on pienempi kuin kaksi koettimen leveyttä

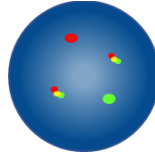
Odotettavissa olevat tulokset

Odotettavissa oleva normaali signaalikuvio



Tavallisessa solussa on odotettavissa kaksi punaista ja kaksi vihreää signaalia (2P, 2V).

Odotettavissa oleva epänormaal signaalikuvio



Solussa, jossa on translokaatio t(14;16)(q32.3;q23), odotettavissa oleva signaalikuvio on yksi punainen, yksi vihreä ja kaksi fuusiosignaalia (1P, 1V, 2F).

Muut signaalikuviot ovat mahdollisia aneuploidisissa/epätasapainoisissa näytteissä. Huomaa, että jos muita IGH-uudelleenjärjestymiä ilmenee IGH/MAF-translokaation lisäksi, vihreä IGH-signaali voi näyttää jakautuneelta.

Tunnettu ristireaktiivisuus

Vihreä IGH-koetin voi näyttää ristihybridisaation 15q11.2:lle ja 16p11.2:lle.

Haittatapahtumista raportointinen

Jos uskot, että tässä laitteessa on ilmennyt toimintahäiriö tai että sen suorituskyvymuutoksissa on tapahtunut huononemista, joka on saattanut myötävaikuttaa haittatapahtumaan (esim. viivästynyt tai virheellinen diagnoosi, viivästynyt tai epäasianmukainen hoito), tästä on ilmoitettava välittömästi valmistajalle (**sähköposti**: vigilance@ogt.com).

Soveltuvien osien tapahtumasta on ilmoitettava myös kansallisille toimivaltaisille viranomaisille. Luettelo vaaratilanteiden valvonnan yhteyspisteistä on seuraavassa osoitteessa: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Erityiset suorituskyvymuutokset

Analyttinen spesifisyys

Analyttinen spesifisyys on niiden signaalien prosenttiosuus, jotka hybridisoituvat oikeaan lokuksen eikä muihin sijainteihin. Nejä kromosomin lokusta jokaisessa 20 metafaasisolussa analysoidaan viidestä näytteestä, jolloin saatiin 400 tietopistettä. Jokaisen hybridisoituneen koettimen paikka kartoitettiin, ja oikeaan lokuksen hybridisoituneiden metafaasikromosomien FISH-signaalien lukumäärä kirjattiin.

Kunkin sarjan koettimen analyttinen spesifisyys laskettiin sellaisten metafaasikromosomien FISH-signaalien määräksi, jotka hybridisoituvat oikeaan lokuksen jaettuna hybridisoituneiden metafaasikromosomien FISH-signaalien kokonaismäärällä. Tulos kerrottiin 100:lla, ilmaistiin prosenttilukuna ja sille määritettiin 95 prosentin luottamusväli.

Taulukko 1. IGH/MAF v2 Translocation, Dual Fusion Probe -koettimen analyttinen spesifisyys

Kohde	Hybridisoituneiden metafaasikromosomien lukumäärä	Oikein hybridisoituneiden lokusten lukumäärä	Analyttinen spesifisyys	95 %n luottamusväli
14q32.3	200	200	100 %	98,12–100 %
16q23	200	200	100 %	98,12–100 %

Analyttinen herkkyys

Analyttinen herkkyys on niiden tulosten laskennassa käytettävien interfaasisolujen prosenttiosuus, joiden odotettavissa oleva signaalikuvio on normaali. Vähintään 200 interfaasisolua analysoidaan jokaisesta 25 karyotyypiltään normaalista fiksatoidusta luuydinnäytteestä, jotka olivat negatiivisia IGH-uudelleenjärjestymän osalta, ja 25 IGH-negatiivisesta CD138+-solunäytteestä, jolloin saatiin vähintään 5 000 tumaa jokaiselle näytetyypille. Herkkyystiedot analysoidaan niiden solujen prosentimäärän perusteella, jotka osoittivat normaalia odotettavissa olevaa signaalikuvioita, ja tulos ilmaistiin prosenttiosuudella sekä 95 prosentin luottamusväliä.

Taulukko 2. IGH/MAF v2 Translocation, Dual Fusion Probe -koettimen analyttinen herkkyys

Näytteen tyyppi	Herkkyuden kriteerit	Herkkyuden tulos
Luuydin	>95 %	98,76 % ± 0,55 %
CD138+	>95 %	96,64 % ± 1,17 %

Normaalien raja-arvojen luokittelu

Normaaliksi raja-arvoksi määritettiin niiden solujen prosenttiosuus, joissa esiintyi väärä positiivinen signaalikuvio, jolloin henkilöä pidettäisiin normaalina eikä kliinisen diagnoosin mukaisena. Vähintään 200 interfaasisolua analysoidaan jokaisesta 25 karyotyypiltään normaalista fiksatoidusta luuydinnäytteestä, jotka olivat negatiivisia IGH-uudelleenjärjestymän osalta, ja 25 IGH-negatiivisesta CD138+-solunäytteestä, jolloin saatiin vähintään 5 000 tumaa jokaiselle näytetyypille.

Raja-arvo määritettiin käyttäen MS Excelin käänteistä β-funktiota (BETAINV). Se laskettiin niiden interfaasisolujen prosenttiosuutena, joissa ilmeni väärä positiivinen signaalikuvio, käyttäen tavallisen potilasnäytteen binomijakauman yksipuolisen 95 prosentin luottamusvälin ylärajaa.

Taulukko 3. IGH/MAF v2 Translocation, Dual Fusion Probe -koettimen normaalin raja-arvojen luokittelu

Näytteen tyyppi	Raja-arvojen tulos
Luydin	1,5 %
CD138+	2,5 %

Laboratorioiden on tarkistettava raja-arvot käyttäen omia tietojään^{7,8}.

Tarkkuus

Tämän tuotteen tarkkuus on mitattu päivän sisäisellä tarkkuudella (näytteiden kesken), päivien välisellä tarkkuudella (päivien kesken) sekä yhden kohteen erien välisellä tarkkuudella (erien kesken).

Tämän tuotteen tarkkuus arvioitiin kolmella näytteellä: yhdellä normaalista luydinnäytteestä (yhdistetty 25 yksittäisestä näytteestä) saadulla näytteellä, yhdellä normaalilla CD138+-näytteellä (yhdistetty 28 yksittäisestä näytteestä) sekä yhdellä heikosti positiivisella CD138+-näytteellä (2–4x tuotteen raja-arvo, joka on luotu terästäväällä CD138+-näyte tunnetulla positiivisella), jota käytettiin tuotteen haastamiseen määritetyn raja-arvon ympärille.

Päivien välisen ja päivän sisäisen tarkkuuden määrittämiseksi näytteet arvioitiin viiden ei-peräkkäisen päivän ajalta. Eräkohtaisen tarkkuuden määrittämiseksi kolme tuote-erää arvioitiin neljästä saman näytteen jäljennöksestä. Tulokset esitettiin yleisenä yhtäpitävyytenä ennakoitujen negatiivisen luokan kanssa (negatiivisten näytteiden osalta).

Taulukko 4. IGH/MAF v2 Translocation, Dual Fusion Probe -koettimen uusittavuus ja tarkkuus

Muuttuja	Näytteen tyyppi	Yhtäpitävyys
Päivän sisäinen ja päivien välinen tarkkuus	Normaali luydin (negatiivinen)	100 %
	Normaali CD138+ (negatiivinen)	100 %
	Heikosti positiivinen CD138+	100 %
Eräkohtainen tarkkuus	Normaali luydin (negatiivinen)	100 %
	Normaali CD138+ (negatiivinen)	100 %
	Heikosti positiivinen CD138+	100 %

Kliininen suorituskyky

Sen määrittämiseksi, havaitseeko tuote aiottuja uudelleenjärjestyksiä, kliininen suorituskyky määritettiin suorittamalla kaksi tutkimusta edustaville otoksille tuotteen aiotusta populaatiosta: yksi käyttäen CD138+-näytteitä ja yksi käyttäen luydinnäytteitä. Jokaisen tutkimuksen otannan koko oli 20 näytettä, ja se sisälsi viiden IGH-MAF-fuusion positiivisen näytteen ja viidentoista IGH-MAF-fuusion negatiivisen näytteen kohdepopulaation. Kaikki näytteet tehtiin tunnistamattomiksi ja satunnaistettiin analyysiharhojen välttämiseksi. Tuloksia verrattiin näytteen tunnettuun tilaan. Koetin tunnisti oikein näytteiden tilan kaikissa tapauksissa.

Näiden testien tulokset analysoitiin, jotta saatiin kliinisen herkkyyden, kliinisen spesifisyyden ja väärin positiivisten osuuden (FPR) arvot positiivisille signaaleille, käyttäen yksidimensionaalista lähestymistapaa.

Taulukko 5. IGH/MAF v2 Translocation, Dual Fusion Probe -koettimen kliininen suorituskyky

Muuttuja	Tulos
Kliininen herkkyys (oikeiden positiivisten osuus, TPR)	98,1 %
Kliininen spesifisyys (oikeiden negatiivisten osuus, TNR)	100 %
Väärin positiivisten osuus (FPR) = 1 – spesifisyys	0 %

Lisätietoja

Tuotteita koskevia lisätietoja on saatavilla ottamalla yhteyttä CytoCellin teknisen tuen osastoon.

Puh.: +44 (0)1223 294048








Sähköposti: techsupport@cytozell.com

Verkkosivut: www.ogt.com

Viitteet

- Fonseca *et al.*, *Cancer Res* 2004;64: 1546-1558
- Walker *et al.*, *Blood* 2013;121(17):3413-3419
- Chang H *et al.*, *Leukemia* 2007;21:1572-1574
- Fonseca *et al.*, *Leukemia* 2009;23(12):2210-2221
- Sawyer, *Cancer Genetics* 2011;204(1):3-12
- 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.

Symboliopas

VIITE	fi: Kuvastonumero
	fi: Lääkinnällinen laite <i>in vitro</i> -diagnoosiin
	fi: Eräkoodi
	fi: Tutustu käyttöohjeisiin
	fi: Valmistaja
	fi: Käytön eräpäivä
	fi: Lämpötilaraja
	fi: Pidettävä poissa auringonvalosta
	fi: Riittävä sisältö <n> testiin
	fi: Sisältö

Patentit ja tavaramerkit

CytoCell on Cytozell Ltd:n rekisteröity tavaramerkki.



Cytozell Ltd.

Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, UK
Puh.: +44(0)1223 294048
Faksi: +44(0)1223 294986
Sähköposti: probes@cytozell.com
Verkkosivut: www.ogt.com