



A Sysmex Group Company



Käyttöohje

VIITE: CE-LPH 064-S / CE-LPH 064

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



VAIN AMMATIKÄYTTÖÖN



Lisätietoja ja muita kieliä saatavilla osoitteesta ogt.com/IFU

Käyttötarkoitus

The CytoCell® FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe -koetin on kvalitatiivinen, ei-automatisoitu FISH (fluorescence *in situ* hybridisation) -testi, jota käytetään kromosomien uudelleenjärjestymien havaitsemiseen kromosomin 15 alueen 15q24 ja kromosomin 17 alueen 17q21.1-q21.2 välillä Carnoy'n liuokseen (3:1 metanoli/etikkahappo) fiksoiduille, hematologisesti johdetuille solususpensioille potilailta, joilla on vahvistettu tai epäilty akuutti myeloinen leukemia (AML).

Käyttöaihe

Tämä laite on suunniteltu käytettäväksi muiden kliinisten ja histopatologisten testien lisäksi vakiintuneissa diagnostiikan ja kliinisen hoidon hoitopoluissa, joissa tieto PML::RARA-translokaation tilasta olisi tärkeää kliiniselle hoidolle.

Rajoitukset

Laitte on suunniteltu havaitsemaan uudelleenjärjestymiä, joissa on katkoskohtia koetinsarjan punaisten ja vihreiden kloonien kattamilla alueilla, joihin sisältyvät PML- ja RARA-alueet. Tämä laite ei ehkä havaitse kyseisen alueen ulkopuolisia katkoskohtia tai vaihtoehtoisia uudelleenjärjestymiä, jotka sisältyvät kokonaisuudessaan tälle alueelle.

Tätä laitetta ei ole tarkoitettu käytettäväksi riippumattomaan diagnostiikkaan, kytkösdiaagnostiikkaan, raskausajan tutkimuksiin, väestöpohjaiseen seulontaan, vieritestaukseen tai itsetestaukseen.

Tätä laitetta ei ole validoitu muille kuin käyttötarkoituksessa ilmoitetuille näytetyypeille, tautityypeille tai käyttökohteille.

Se on tarkoitettu muiden diagnostisten laboratoriotestien apuvälineeksi, eikä hoitotulosta saa käynnistää yksinomaan FISH-tuloksen perusteella.

Soveltuvan pätevyyden saaneen henkilöstön tekemän FISH-tuloksen raportoinnin ja tulkinnan on oltava yhdenmukainen ammattimaisten käytäntöstandardien kanssa, ja niissä on otettava huomioon muut olennaiset testitulokset ja kliiniset ja diagnostiset tiedot.

Tämä laite on tarkoitettu ainoastaan ammattimaiseen laboratoriokäyttöön.

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

Testin periaatteet

Fluoresenssi *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 kokonaisiaromosomeja 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 samalla tavoin denaturoitua, fluoresenssimerkittyä 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

PML (promyelosyyttileukemia) -geeni sijaitsee paikassa 15q24.1, ja RARA (retinoiinihapporeseptori-alfa) -geeni sijaitsee paikassa 17q21.2. Translokaatioissa

t(15;17)(q24;q21) syntyy PML::RARA-fuusiogeeni, ja se on akuutin promyelosyyttileukemian (APL) diagnostinen tunnusmerkki.

Tämä FAST PML/RARα FISH -koetin mahdollistaa uudelleenjärjestymän nopean havaitsemisen, sillä hybridisaatioon tarvitaan vain tunti.

PML::RARA-fuusiogeeni syntyy t(15;17)(q24;q21)-translokaatioissa, ja se todetaan yli 90 prosentissa APL-tapauksista, leukemioista, jotka pitävät sisällään 5–8 prosenttia akuutin myeloisen leukemian (AML) tapauksista^{1,2}. Tapausten alajoukossa voidaan havaita vaihtoehtoisia RARA-translokaatioita. Tunnettuja fuusiopartnereita ovat NPM1 paikassa 5q35, NUMA1 paikassa 11q13, ZBTB16 (PLZF) paikassa 11q23, STAT5B paikassa 17q21, PRKAR1A paikassa 17q24, FIP1L1 paikassa 4q12 ja BCOR paikassa Xp11^{3,4,5}.

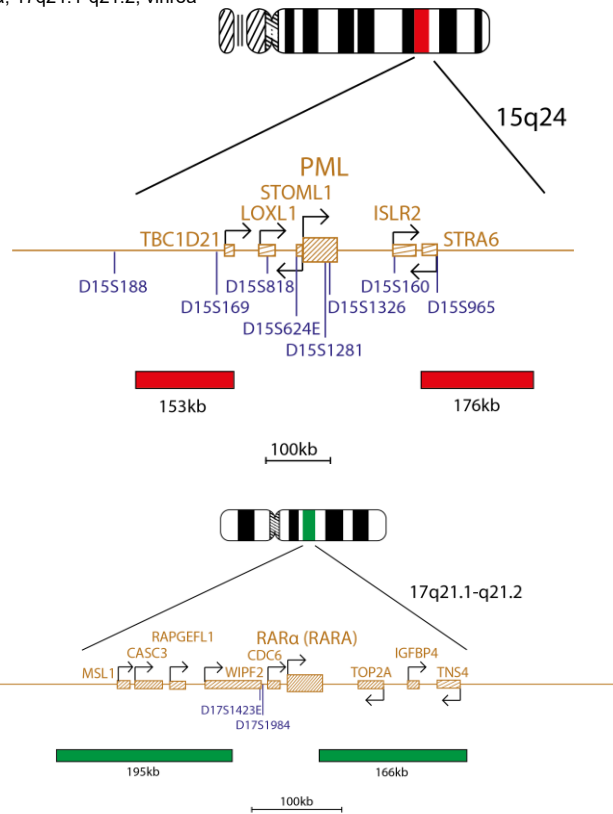
PML ja RARA on molemmat liitetty normaaliin hematopoieesiin. PML sisältää kasvusuppressorin ja proapoptoottista toimintaa, kun taas RARA on transkriptioteikijä, joka välittää retinoiinihapon vaikutuksen tiettyihin vaste-elementteihin⁶. PML::RARA-fuusioproteiini käyttäytyy muuntuneena retinoiinihapporeseptorina, jolla on kyky välittää onkogeenisia signaaleja⁷.

APL-potilaita on ratkaisevan tärkeää hoitaa välittömästi johtuen diagnoosiin liittyvistä hengenvaarallisista hyytymishäiriöistä ja henkeä uhkaavasta verenvuodosta. Ennen kuin "all-trans"-retinoiinihappo (ATRA) ja arsenikkitrioksidi (ATO) otettiin käyttöön APL-hoitoprotokollissa, sairauden ennuste oli huono. Näiden hoitojen käyttöönoton jälkeen kuitenkin yleinen henkiinjäämisprosentti on parantunut huomattavasti, ja lähes 90 prosenttia⁸ potilaista paranee. Potilaat, joilla on vaihtoehtoisia RARA-translokaatioita, osoittavat vaihtelevaa herkkyyttä hoidolle, ja jotkin potilaat ovat osoittautuneet vastustuskykyisiksi hoitoprotokollille^{3,5}. Siksi on tärkeää erottaa APL-potilaat, joilla on PML::RARA-fuusio, ja potilaat, joilla on vaihtoehtoisia RARA-translokaatioita.

Koettimen tekniset tiedot

PML, 15q24, punainen

RARα, 17q21.1-q21.2, vihreä



Punaisella leimattu PML-koetinseos koostuu 153 kb:n koettimesta PML-geenin sentromeeripuolelle, joka kattaa markkerin D15S169, ja 176 kb:n koettimesta PML-geenin telomeeripuolelle, joka kattaa markkerin D15S965. Vihreällä leimattu RARα (RARA) -koetinseos koostuu 195 kb:n koettimesta RARα (RARA) -geenin sentromeeripuolelle, johon sisältyy CASC3-geeni, ja 166 kb:n koettimesta, johon sisältyy RARα (RARA) -geenin telomeerinen osa, kuten myös TOP2A-, IGFBP4- ja TNS4-geenit.

Toimitettavat materiaalit

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

Koettimet toimitetaan ennalta sekoitettuna hybridisaatioliuokseen (< 65 % formamidia, < 20 mg dekstraanisulfaattia, < 10 % 20x-suolaliuos-natriumsitraattia (SSC)), ja ne ovat valmiita käytettäväksi.

Vastaväri: 150 µl pulloa kohti (15 testiä)

Vastaväri on DAPI Antifade ES (0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidiini-2-fenyyli-indoli) glyserolipohjaisessa preparointiaineessa).

Varoitukset ja varotoimet

1. *In vitro* -diagnostiseen käyttöön. Vain ammattikäyttöön laboratoriossa.

2. Koetinseokset sisältävät formamidiä, joka on teratogeeni: älä hengitä höyryjä sisään tai päästä ainetta kosketuksiin ihon kanssa. Käsiteltävä varoen: käytä käsineitä ja laboratoriotakkia.
3. Käsittele DAPIa varoen: käytä käsineitä ja laboratoriotakkia.
4. Ei saa käyttää, jos pullo on vaurioitunut tai jos pullon sisältö on voinut vahingoittua millään tavalla.
5. Hävitä tämä tuote turvallisesti noudattaen hävittämistä koskevia paikallisia määräyksiä ja käyttöturvallisuustiedotteessa annettuja suosituksia. Tämä koskee myös vahingoittunutta testisarjan sisältöä.
6. Hävitä kaikki käyttämätön reagenssi ja muu kontaminoitunut kertakäyttömateriaali tartuntavaarallista tai mahdollisesti tartuntavaarallista jätettä koskevien ohjeistusten mukaisesti. Kunkin laboratorion vastuulla on käsitellä kiinteää ja nestemäistä jätettä sen luonteen ja vaarallisuustasteen mukaisesti ja noudattaa sen käsittelyssä ja hävittämisessä sovellettavia määräyksiä (tai varmistaa niiden noudattaminen).
7. Käyttäjien on pystyttävä erottamaan toisistaan punainen, sininen ja vihreä.
8. Mikäli hahmoteltua protokollaa ei noudateta ja sen mukaisia reagensseja ei käytetä, se saattaa vaikuttaa suorituskyykyyn ja johtaa virheellisiin positiivisiin/negatiivisiin tuloksiin.
9. Koetinta ei saa laimentaa tai sekoittaa muiden koetinten kanssa.
10. Mikäli 10 µl:n koetinta ei käytetä protokollan esidenaturaatiovaiheessa, se saattaa vaikuttaa suorituskyykyyn ja johtaa virheellisiin positiivisiin/negatiivisiin tuloksiin.
11. Kaikki tuotteet on validoitava ennen käyttöä.
12. Sisäiset kontrollit on suoritettava käyttämällä muuttumattomia solupopulaatioita testinäytteissä.

Lämpötilojen tarkemmat määritelmät

- -20 °C / pakastettu / pakastimessa: -25...-15 °C
- 37 °C: +37 °C ±1 °C
- 72 °C: +72 °C ±1 °C
- 75 °C: +75 °C ±1 °C
- Huoneenlämpötila: +15...+25 °C

Säilytys ja käsittely

 Sarjaa on säilytettävä pakastimessa -25...-15 °C:n lämpötilassa sarjan etiketissä ilmoitettuun eräpäivään saakka. Koetinta ja vastaväripulloja on säilytettävä pimeässä.



FISH-koetin, DAPI Antifade ES -vastaväri ja hybridisaatioliuos pysyvät stabiileina normaalissa käytössä tapahtuvien pakastus- ja sulatusjaksojen ajan (kun yhden jakson aikana pullo poistetaan pakastimesta ja laitetaan takaisin pakastimeen) – 5 jaksoa 50 µl:n (5 testin) pullolle FISH-koetinta, 10 jaksoa 100 µl:n (10 testin) pullolle FISH-koetinta ja 15 jaksoa 150 µl:n (15 testin) pullolle vastaväriä. Altistumista valolle on vältettävä ja minimoitava mahdollisuuksien mukaan. Säilytä komponentteja pakkauksen sisältämässä valonpitävässä säiliössä. Komponentit, joita on käytetty ja säilytetty pakkausmerkintöjen ohjeista poikkeavissa olosuhteissa, eivät välttämättä toimi odotetulla tavalla ja saattavat vääristää määrityksen tuloksia. On ryhdyttävä kaikkiin mahdollisiin toimenpiteisiin valolle ja lämpötilan muutoksille altistumisen rajoittamiseksi.

Tarvittavat laitteet ja materiaalit, jotka eivät sisälly pakkaukseen

Kalibroituja laitteistoa on käytettävä:

1. Lämpölevy (kiinteällä levyllä ja tarkalla lämpötilan hallinnalla 80 °C:n lämpötilaan saakka)
2. Kalibroidut tilavuudeltaan vaihtelevat mikropipetit ja kärjet, 1–200 µl
3. Vesikylpä tarkalla lämpötilan hallinnalla 37 °C:n ja 72 °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-pH-arvo)
10. Kostutettu säiliö
11. Fluoresenssiluokan mikroskooppilinnin immersioöljy
12. Työpöytäseentrifugi
13. Mikroskooppiobjektilasi
14. 24 x 24 mm:n peitelasi
15. Ajastin
16. 37 °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 elohopealampua tai vastaavaa ja öljyimmersiosuunnitelman 60/63x- tai 100x-apokromaattiobjektiveja parhaaseen mahdolliseen visuaalisointiin. Tässä koetinsarjassa käytettävät loisteaineet virittyvät ja säteilevät seuraavilla aaltopituuksilla:

Loisteaine	Viritysmaks [nm]	Emissio ^o maks [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 kolmoisikaistanpäästösuoatinta tai vihreän spektrin/punaisen spektrin kaksoiskaistanpäästösuoatinta vihreän ja punaisen loisteaineen optimaaliseen samanaikaiseen visuaalisointiin. Tarkista fluoresenssimikroskooppi ennen käyttöä varmistaaksesi, että se toimii asianmukaisesti. Käytä immersioöljyä, joka soveltuu fluoresenssimikroskoopille ja jonka koostumus on tarkoitettu alhaiselle automaattiselle fluoresenssille. Vältä häipymistä ehkäisevän DAPI:n sekoittamista mikroskoopin immersioöljyn kanssa, sillä se hämärtää signaaleita. Noudata valmistajien suosituksia lampun käyttöiän ja suodatinten iän suhteen.

Näytteen valmistelu

Sarja on suunniteltu käytettäväksi Carnoy'n liuosfiksatiivin (3:1 metanoli/etikahappo) fiksoituihin, hematologisesti johdettuihin solususpensioihin, jotka on valmistettu laboratorion tai laitoksen suuntaviivojen mukaisesti. Valmistele ilmakuivatut näytteet mikroskoopin objektiivilaseille sytogeneettisten vakiotomenpiteiden mukaisesti. AGT-sytogeneetiikkalaboratorion opaskirja sisältää suosituksia näytteen keräämisestä, viljelystä, poiminnasta ja objektiivilasiens valmistelusta⁸.

Liuoksen valmistus

Etanoliliuokset

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.

FAST FISH -protokolla – hybridisaatio yhdessä (1) tunnissa

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

Objektiivilasin valmistelu

1. Laita pisara solunäytettä mikroskooppiobjektilasille. Anna kuivua. (Valinnaista, jos käytetään sytogeneettistä kuivauskammiota: Kammiota on käytettävä noin 25 °C:n lämpötilassa ja 50 %:n kosteudessa, jotta solunäytepisara voidaan asettaa optimaalisesti lasille. Mikäli sytogeneettistä kuivauskammiota ei ole saatavilla, käytä vaihtoehtoisesti vetokaappia).
2. Uputa 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 °C:n (+/- 1 °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 °C:n (+/- 1 °C) lämpötilaan.

Hybridisaatio

11. Laita objektiivilasi yhdeksi (1) tunniksi kosteaan, valonkestävään säiliöön 37 °C:n (+/- 1 °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 °C:n (+/- 1 °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**).

Standardi FISH-protokolla – yön yli kestävä hybridisaatio

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

Objektiivilasin valmistelu

- 1. Laita pisara solunäytettä mikroskooppiobjekttilasille. Anna kuivua. (Valinnaista, jos käytetään sytogeneettistä kuivauskammiota: Kammiota on käytettävä noin 25 °C:n lämpötilassa ja 50 %:n kosteudessa, jotta solunäytepisara voidaan asettaa optimaalisesti lasille. Mikäli sytogeneettistä kuivauskammiota 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 koetiniuos 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 °C:n (+/- 1 °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 °C:n (+/- 1 °C) lämpötilaan.

Hybridisaatio

- 11. Laita objektiivilasi yöksi kosteaan valonkestävään säiliöön 37 °C:n (+/- 1 °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 °C:n (+/- 1 °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**).

Toimenpidesuosituks

- 1. Objektiivilasin sintraaminen tai ikäännyttäminen saattaa heikentää signaalien fluoresenssia.
- 2. Muiden kuin Cytocell Ltd -yhtiön toimittamien tai suosittelemien reagenssien käyttö saattaa vaikuttaa haitallisesti hybridisaatio-olosuhteisiin.
- 3. Käytä liuosten, vesikylpöjen 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 löyhyys 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 hybridisaatio saattaa johtaa ylimääräisiin tai odottamattomiin signaaleihin.
- 7. Käyttäjien on optimoitava omien näytteidensä protokolla ennen testin käyttöä diagnostiin tarkoituksiin.
- 8. Suboptimaaliset olosuhteet saattavat johtaa epäspesifiseen sitoutumiseen, jotka saatetaan tulkita koetinsignaaleiksi.

Tulosten tulkitseminen

Objektiivilasin laadun arviointi

Objektiivilasia ei tarvitse analysoida, jos:

- yksittäisten suodatinten signaalit ovat liian heikkoja analysoitavaksi – jotta analyysia voidaan jatkaa, signaalien on näytävä kirkkaina, selkein 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 tuman rajoja ei voida erottaa, eivätkä ne ole eheitä.

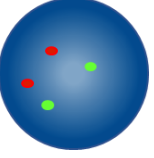
Analysointiohjeet

- Kahden analyytikon pitäisi analysoida ja tulkita jokainen näyte. Kaikki erävytydet 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 tuman 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.
- Analysoitaessa kaksivärisiä irrotettavia koettimia signaalit on laskettava muiksi kuin uudelleenjärjestellyiksi/fuusiointuneiksi, jos punaisen ja vihreän signaalin välinen rako on enintään kahden signaalileveyden kokoinen.
- Analysoitaessa kolmevärisiä irrotettavia koettimia signaalit on laskettava muiksi kuin uudelleenjärjestellyiksi/fuusiointuneiksi, jos jonkin kolmesta signaalista (punainen, vihreä, sininen) välissä on enintään kahden signaalileveyden kokoinen rako.
- Mikäli on epäilystä siitä, voidaanko solu analysoida, älä analysoi sitä.

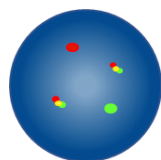
Analysointiohjeet	
	Älä laske – tumat ovat liian lähekkäin, jotta rajoja voisi määrittää
	Älä laske päällekkäisiä tumia – kummankin tuman kaikki alueet eivät ole näkyvissä
	Laske kahdeksi punaiseksi signaaliksi ja kahdeksi vihreäksi signaaliksi – toinen kahdesta punaisesta signaalista on hajanainen
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

Odotettavissa olevat tulokset

Odotettavissa oleva normaali signaalikuvi



Tavallisessa solussa on odotettavissa kaksi punaista ja kaksi vihreää signaalia (2P2V).



Jos solussa on t(15;17)(q24.1;q21)-translokaatio, odotettavissa on yksi punainen, yksi vihreä ja kaksi fuusiota (1P1V2F).

Muut signaalikuviot ovat mahdollisia aneuploidisissa/epätasapainoisissa näytteissä.

Tunnetut olennaiset häiriöt / häiritsevät aineet

Ei tunnettuja olennaisia häiriöitä / häiritseviä aineita.

Tunnettu ristireaktiivisuus

Ei tunnettua ristireaktiivisuutta.

Vakavista vaaratilanteista ilmoittaminen

Potilaan / käyttäjän / kolmannen osapuolen, joka on Euroopan unionissa tai maassa, jossa on vastaava säädös (asetus (EU) 2017/746 *in vitro* -diagnostisista lääkinnällisistä laitteista), on ilmoitettava valmistajalle ja kansalliselle toimivaltaiselle viranomaiselle, mikäli tämän laitteen käytön aikana tai sen käytön seurauksena tapahtuu vakava vaaratilanne.

Muissa maissa tapahtuneista vakavista vaaratilanteista on ilmoitettava valmistajalle ja soveltuvin osin kansalliselle toimivaltaiselle viranomaiselle.

Valmistajan yhteystiedot vaaratilanteissa: vigilance@oqt.com

Luettelo vaaratilanteita käsittelevien EU:n kansallisten toimivaltaisten viranomaisten yhteystiedoista on seuraavassa osoitteessa:

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

Erityiset suorituskykyominaisuudet

Analyttinen spesifisyys

Analyttinen spesifisyys on niiden signaalien prosenttiosuus, jotka hybridisoidaan oikeaan lukukseen eikä muihin sijainteihin. Neljä kromosomin lokusta jokaisessa 20 metafaasisolussa analysoidiin kustakin viidestä näytteestä, jolloin saatiin 400 tietopistettä. Jokaisen hybridisoiduneen koettimen paikka kartoitettiin, ja oikeaan lukukseen hybridisoiduneiden metafaasikromosomien FISH-signaalien lukumäärä kirjattiin.

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

Taulukko 1. FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe - koettimen analyttinen spesifisyys

Kohde	Hybridisoiduneiden metafaasikromosomien lukumäärä	Oikein hybridisoiduneiden lokusten lukumäärä	Analyttinen spesifisyys	95 %:n luottamusväli
15q24.1	200	200	100 %	98,12–100 %
17q21.1-17q21.2	200	200	100 %	98,12–100 %

Analyttinen herkkyys

Analyttinen herkkyys on niiden tulosten laskennassa käytettävien interfaasisolujen prosenttiosuus, joiden odotettavissa oleva signaalikuvio on normaali. Vähintään 100 interfaasisolua analysoidiin jokaisesta 25 fiksoidusta luuydinsolususpensiosta ja 25 fiksoidusta ääreisverisolususpensiosta pikahybridisaatiomenetelmällä ja 25 fiksoidusta luuydinsolususpensiosta yön yli kestävällä hybridisaatiolla. Näin saatiin vähintään 2 500 tumaa ääreisverinäytteistä ja 5 000 tumaa luuydinnäytteistä. Herkkyystiedot analysoidiin niiden solujen prosenttimäärän perusteella, jotka osoittivat normaalia odotettavissa olevaa signaalikuvioita, ja tulos ilmaistiin prosenttiosuudella sekä 95 prosentin luottamusväliä.

Taulukko 2. FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe - koettimen analyttinen herkkyys

Näytteen tyyppi	Herkkyuden kriteerit	Herkkyuden tulos
Luuydin – pikahybridisaatio	>95 %	98,80 % (97,96–99,63 %)
Luuydin – yön yli kestävä hybridisaatio	>95 %	98,52 % (97,76–99,28 %)
Ääreisveri – pikahybridisaatio	>95 %	99,31 (98,66–100,00 %)

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 100 interfaasisolua analysoidiin jokaisesta 25 fiksoidusta luuydinsolususpensiosta ja 25 fiksoidusta ääreisverisolususpensiosta pikahybridisaatiomenetelmällä ja 25 fiksoidusta luuydinsolususpensiosta yön yli kestävällä hybridisaatiolla. Näin saatiin vähintään 2 500 tumaa ääreisverinäytteistä ja 5 000 tumaa luuydinnäytteistä.

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. FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe - koettimen normaalien raja-arvojen luokittelu

Näytteen tyyppi	Raja-arvojen tulos
Luuydin – pikahybridisaatio	2,71 %
Luuydin – yön yli kestävä hybridisaatio	3,44 %
Ääreisveri – pikahybridisaatio	4,36 %

Laboratorioiden on tarkistettava raja-arvot käyttäen omia tietojaan^{9,10}.

Tarkkuus

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

Yhtä hybridisaatiomenetelmää kohden käytettiin kahta näytettä tuotteen tarkkuuden arviointiin: negatiivista luuydinnäytettä ja heikosti positiivista luuydinnäytettä. Heikosti positiivinen luuydinnäyte (2–4x tuotteen raja-arvo) valmistettiin lisäämällä normaaliin luuydinnäytteeseen tunnettua positiivista luuydinnäytettä, ja sitä käytettiin tuotteen haastamiseen määritetyn raja-arvon ympärillä.

Päivien välisen ja päivän sisäisen tarkkuuden määrittämiseksi näytteet arvioitiin kymmenen ei-peräkkäisen päivän ajalta. Erien välisen tarkkuuden määrittämiseksi kolme tuote-erää arvioitiin kolmesta saman näytteen replikaatista. Tulokset esitettiin yleisenä yhtäpitävyytenä ennakkoidun negatiivisen luokan kanssa (negatiivisten näytteiden osalta).

Taulukko 4. FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe - koettimen uusittavuus ja tarkkuus

Muuttuja	Näytteen tyyppi	Yhtäpitävyys
Päivän sisäinen (näytteestä toiseen) ja päivien välinen (päivästä toiseen) uusittavuus	Luuydin, negatiivinen	100 %
	Luuydin, heikosti positiivinen	100 %
Erien välinen uusittavuus	Luuydin, negatiivinen	100 %
	Luuydin, heikosti positiivinen	100 %

Kliininen suorituskyky

Sen määrittämiseksi, havaitseeko tuote aiottuja uudelleenjärjestymiä, kliininen suorituskyky määritettiin suorittamalla yksi tutkimus edustaville otoksille tuotteen aiotusta populaatioista: metanoli/etikkahappofiksatiivilla fiksoidusta hematologisesti johdetusta jäännösmateriaalista. Otannan koko oli 136 näytettä ja populaatio 43 positiivista näytettä ja 93 negatiivista näytettä. Tuloksia verrattiin näytteen tunnettuun tilaan, joka oli tunnistettu vertailumenetelmällä. Tulosten yhdenmukaisuuden/ristiriitaisuuden todettiin täyttävän tutkimuksen hyväksyntäkriteerit.

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

Taulukko 5. FAST PML/RARα (RARA) Translocation, Dual Fusion Probe - koettimen kliininen suorituskyky

Muuttuja	Tulos
Kliininen herkkyys (oikeiden positiivisten osuus, TPR)	98,93 %
Kliininen spesifisyys (oikeiden negatiivisten osuus, TNR)	99,58 %
Väärin positiivisten osuus (FPR) = 1 – spesifisyys	0,42 %

Yhteenveto turvallisuudesta ja suorituskyvystä (SSP)

SSP tulee yleisön saataville eurooppalaisen lääkinnällisten laitteiden tietokannan (Eudamed) kautta, mistä se on haettavissa Basic UDI-DI -tunnisteella.

Eudamedin URL-osoite: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Basic UDI-DI: 50558449LPH064JR

Jos Eudamed ei ole täysin toiminnallinen, SSP saatetaan yleisön saataville pyynnöstä sähköpostitse osoitteeseen SSP@oqt.com.

Lisätietoja

Tuotteita koskevia lisätietoja on saatavilla ottamalla yhteyttä CytoCell teknisen tuen osastoon.3-site Inter

Puh.: +44 (0)1223 294048

Sähköposti: techsupport@cytocell.com

Verkkosivut: www.oqt.com

Viitteet

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.

Symbolisanasto

EN ISO 15223-1:2021 – ”Lääkinnälliset laitteet – Valmistajan toimittamissa tiedoissa käytettävät symbolit. Osa 1: Yleiset vaatimukset” (© International Organization for Standardization)		
Symboli	Nimike	Viitenumero(t)
	fi: Valmistaja	5.1.1
	fi: Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisön / Euroopan unionin alueella	5.1.2
	fi: Käytön eräpäivä	5.1.4
	fi: Eräkoodi	5.1.5
	fi: Kuvastonumero	5.1.6
	fi: Pidettävä poissa auringonvalosta	5.3.2
	fi: Lämpötilaraja	5.3.7
	fi: Tutustu käyttöohjeisiin	5.4.3
	fi: Tutustu sähköisiin käyttöohjeisiin	5.4.3
	fi: Huomio	5.4.4
	fi: <i>In vitro</i> -diagnostinen lääkinällinen laite	5.5.1
	fi: Riittävä sisältö <n> testiin	5.5.5
	fi: Yksilöllinen laitetunniste	5.7.10
IVD-reagensseja ja -osia koskevat EDMA-symbolit, lokakuun 2009 versio		
Symboli	Nimike	Viitenumero(t)
	fi: Sisältö (tai sisältää)	–

Patentit ja tavaramerkit
CytoCell on CytoCell Limited -yhtiön rekisteröity tavaramerkki.



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

Puh.: +44 (0)1223 294048
F: +44 (0)1223 294986
Sähköposti: probes@cytoCell.com
Verkkosivut: www.ogt.com



Sysmex Europe SE
Bombarch 1
22848 Norderstedt
SAKSA

Puh.: +49 40 527260
Verkkosivut: www.sysmex-europe.com

Käyttöohjeen versiohistoria
V001.00 2023-01-25: Uusi käyttöohje asetuksen (EU) 2017/746 vuoksi
V002 2025-08-29: UKCA-merkinnän poistaminen