



A Sysmex Group Company



Brugsanvisning

REF: LPH 044-S / LPH 044

IGH/MAFB Translocation, Dual Fusion Probe



KUN TIL ERHVERVSMÆSSIG BRUG



[Yderligere information og andre sprog findes på \[www.ogt.com\]\(http://www.ogt.com\)](http://www.cyto-cell.com)

Begrænsninger

Dette produkt er designet til at detektere rearrangementer med følsomhedsgrænser i den region, der afgrenses af de røde og grønne kloner i dette probesæt, som omfatter *IGH*- og *MAFB*-generne. Følsomhedsgrænser uden for denne region eller variante rearrangementer, som kun findes inde i denne region, kan muligvis ikke detekteres med dette produkt.

Testen er ikke beregnet til: brug som det eneste diagnostiske værktøj, prænatal test, populationsbaseret screening, test i nærværelsen af patienter eller selvtestning. Produktet er udelukkende beregnet til brug af faguddannet laboratoriepersonale; alle resultater skal fortolkes af tilstrækkeligt kvalificeret personale, og der skal tages hensyn til andre relevante testresultater.

Dette produkt er ikke valideret til brug til andre prøvetyper eller sygdomsformer ud over dem, der er specificeret under anvendelsesområdet.

Rapportering og fortolkning af FISH-resultater skal være i overensstemmelse med professionel standardpraksis og bør tage hensyn til andre kliniske og diagnostiske informationer. Dette kit er beregnet til brug som supplement til andre diagnostiske laboratoriets, og en behandling bør ikke indledes udelukkende på grundlag af FISH-resultatet.

Hvis protokollen ikke overholdes, kan det have indflydelse på funktionsevnen og føre til falsk positive/negative resultater.

Dette kit er ikke valideret til formål ud over, hvad der angives under anvendelsesområdet.

Anvendelsesområde

CytoCell IGH/MAFB Translocation, Dual Fusion Probe er en kvalitativ, ikke-automatiseret FISH-test (fluorescens *in situ* hybridisering), der anvendes til at detektere kromosomale rearrangementer mellem 14q32.3-regionen på kromosom 14 og 20q12-regionen på kromosom 20 ved brug af hæmatologisk-deriverede cellesuspensioner, der er fikseret i Carnoys oplosning (3:1 methanol/eddkliseyre), fra patienter med bekraeftet eller mistækt hæmatopoiese-neoplasier af lymfoid oprindelse [f.eks. myelomatose (MM)].

Indikationer

Dette produkt er designet som et supplement til andre kliniske og histopatologiske tests i anerkendte diagnostiske og kliniske plejeforløb, hvor viden om status af *IGH*:*MAFB*-translokation er vigtig for den kliniske håndtering.

Testens principper

Fluorescens *in situ*-hybridisering (FISH) er en teknik, der gør det muligt at detektere DNA-sekvenser på metafasekromosomer eller interfasekerner i fikserede cytogenetiske prøver. Teknikken gør brug af DNA-prøver, som hybridiserer hele kromosomer eller enkelte unikke sekvenser, og er et stærkt supplement til cytogenetisk analyse med G-banding-teknik. Denne teknik kan nu anvendes som et essentielt investigativt værktøj i forbundelse med prænatal analyse, hæmatologiske analyser og kromosomanalyser af solide tumorer. Må-DNA'et er, efter fiksering og denaturering, klar til hybridisering til en lignende denatureret, fluorescens-mærket DNA-probe med en komplementærsekvens. Efter hybridisering fjernes den ubundne og ikke-spesifik bundne DNA-probe, og DNA'et kontrastfarves med henblik på visualisering. Et fluorescensmikroskop gør det derefter muligt at visualisere den hybridiserede probe på mål-materialet.

Probe-information

MAFB-genet (*MAF* *bZIP transcription factor B*) befinner sig ved 20q12 og *IGH* (*immunoglobulin heavy locus*) ved 14q32.3

Cirka 50-60 % af tilfældene med myelomatose (MM) associeres med translokationer, der involverer *IGH* og en af adskillige partnere, herunder *CCND1*, *NSD2* (*MMSET*) og *FGFR3*, *CCND3*, *MAF* eller *MAFB*¹.

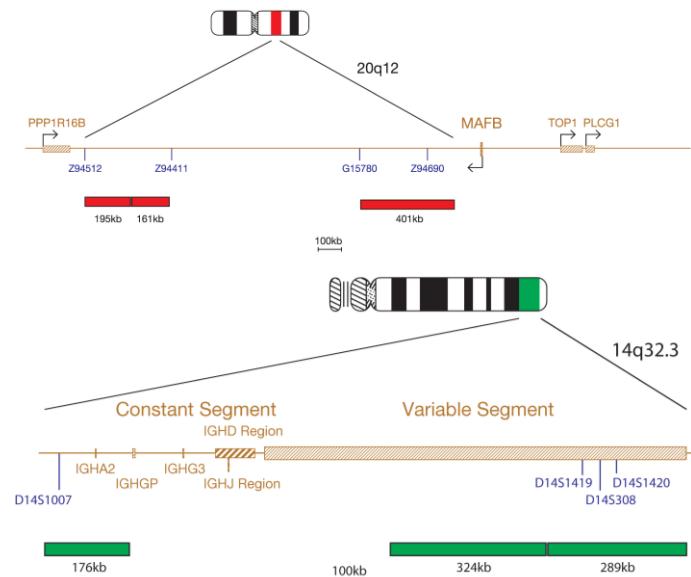
Translokationen t(14;20)(q32.3;q12) er en tilbagevendende translokation, der ses hos omkring 2 % af tilfældene med MM^{2,3}.

Det reciproke rearrangement bringer en trunkeret form af *IGH* μ-enhanceren (Eu, lokalisert mellem J-(“joining”)segmentet og den konstante region af *IGH*-genet) i tæt kontakt med *MAFB*-genet⁴. Det er vist, at den deraf resulterende fusion og det opregulerede transkriptionsprodukt forårsager dysregulering af cyclin D2¹.

Det antages, at det prognostiske udfald af t(14;20)(q32.3;q12) er det samme som for t(14;16)(q32.3;q23)³.

Probe-specifikation

MAFB, 20q12, rød
IGH, 14q32.3, grøn



IGH/MAFB-produktet består af prober, der er mærket med grønt og dækker Konstante og Variable segmenter af *IGH*-genet, og *MAFB*-prober (195 kb, 161 kb og 401 kb), der er mærket med rødt. *MAFB*-proben er lokaliseret på hver side af følsomhedsgrænsens region (mellem *MAFB* og *PPP1R16B*).

Medleveret materiale

Probe: 50 µl pr. hætteglas (5 tests) eller 100 µl pr. hætteglas (10 tests)
Proberne leveres i en færdig blandet hybridiseringsopløsning (formamid, dextransulphat, salin-natriumcitrat (SSC)) og er klar til brug.

Kontrastfarvning:

150 µl pr. hætteglas (15 tests)
Kontrastfarvningen er DAPI-antifadeopløsning (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Advarsler og forsigtighedsregler

- Til brug til *in vitro*-diagnostik. Må kun anvendes af faguddannet personale.
- Bær sikkerhedshandsker ved håndtering af DNA-prober og DAPI-kontrastfarvning.
- Probe-blandingen indeholder formamid, som er teratogen: undgå hudkontakt og at indånde damp. Bær handsker, laboratoriekittel og hænder i stinksak. Efter bortskaffelse, skyldes med rigeligt vand.
- DAPI er et potentielt karcinogen. Håndter med omtanke, bær handsker og laboratoriekittel. Efter bortskaffelse, skyldes med rigeligt vand.
- Bortskaf alle farlige materialer i overensstemmelse med institutionens vejledninger om bortskaffelse af farligt materiale.
- Brugere skal kunne skelne mellem farverne rød, blå og grøn.
- Hvis den beskrevne protokol og de beskrevne reagenser ikke overholdes, kan det have indflydelse på funktionsevnen og føre til falsk positive/negative resultater.
- Proben må ikke fortyndes eller blandes med andre prober.
- Hvis der ikke anvendes 10µl af proben under præ-denatureringen, som beskrevet i protokollen, kan det have indflydelse på funktionsevnen og føre til falsk positive/negative resultater.

Opbevaring og håndtering

-15°C Kippet skal opbevares mellem -25 °C og -15 °C i en fryser indtil den udløbsdag, der er anført på kippet. Proben og -25°C Hætteglas med kontrastfarve skal opbevares mørkt.



Proben forbliver stabil under fryse-optørningscyklusser i forbindelse med normal brug (hvor en cyklus omfatter probens udtagning fra og genindsætning i fryseren) og er fotostabil i op til 48 timer efter at være blevet eksponeret for vedvarende lys. Man skal bestrebe sig på at begrænse lyspåvirkning og temperaturforandringer.

Nødvendigt udstyr og materialer, som ikke medleveres

Der skal anvendes kalibreret udstyr:

1. Varmeplade (med en fast plade og nøjagtig temperaturkontrol op til 80 °C)
2. Kalibrerede mikropipetter med variabel volumen og spidser fra 1 µl til 200 µl
3. Vandbad med nøjagtig temperaturkontrol ved 37 °C og 72 °C
4. Mikrocentrifugerør (0,5 ml)
5. Fluorescensmikroskop (jf. anbefalingerne i kapitlet om fluorescensmikroskop)
6. Fasekontrast-mikroskop
7. Rene plastik, keramiske eller varmeresistente Coplin-glas
8. Tænger
9. Kalibreret pH-Meter (eller pH-indikatorstrips, der kan måle pH 6,5-8,0)
10. Befugningsbeholder
11. Immersionsolie til fluorescensmikroskoplinser
12. Bordcentrifuge
13. Mikroskop-objektglas
14. Dækglas på 24x24 mm
15. Timer
16. Inkubator på 37 °C
17. Gummipløsningslim
18. Vortex-blander
19. Måleglas
20. Magnetomrører
21. Kalibreret termometer

Optionalt udstyr, der ikke medleveres

1. Cytogenetisk tørrekammer

Nødvendige reagenser, der ikke medleveres

1. 20x saltvand-natriumcitrat-(SSC)-opløsning
2. 100 % ethanol
3. Tween-20
4. 1M natriumhydroxid (NaOH)
5. 1M saltsyre (HCl)
6. Renset vand

Anbefalinger til fluorescensmikroskop

Der bør anvendes en 100-Watt kviksolv-lampe eller tilsvarende og olie-immersions-apochromat-objektiver, plan, 60/63x eller 100x for at opnå optimal visualisering. De fluororer, der benyttes i denne probe, vil excitere og udsende lys ved følgende bølgelængder:

Fluororer	Excitation _{maks.} [nm]	Emission _{maks.} [nm]
Grøn	495	521
Rød	596	615

Sørg for, at mikroskopet har passende excitations- og emissionsfiltre, som dækker de ovenfor nævnte bølgelængder. Benyt et tredobbelts båndpasfilter DAPI/grøn, spektrum/rød eller et dobbelt båndpasfilter grønt spektrum/rødt spektrum for at opnå optimal simultan visualisering af grønne og røde fluororer.

Efterprøv før brug, at fluorescensmikroskopet virker korrekt. Benyt immersionsolie, der er beregnet til fluorescensmikrosopi og formuleret til lav automatisk fluorescens. Undgå at blande DAPI-antifade med mikroskopi-immersionsolie, da det vil sløre signalerne. Følg producentens anbefaling angående lampens levetid og filtrene alder.

Prøveklargøring

Kittet er designet til brug på hæmatologisk-deriverede cellesuspensioner, der er fikseret i Carnoys opløsning (3:1 methanol/eddkikesyre), som er klargjort i henhold til laboratoriets eller institutionens vejledninger. Præparerer lufttørrede prøver på mikroskop-objektglas i henhold til cytogenetiske standardprocedurer. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual indeholder anbefalinger angående prøveindsamling, dyrkning, høst og præparerering af objektglas⁵.

Klargøring af opløsning

Ethanolopløsninger

Fortynd 100 % ethanol med renset vand ved at anvende følgende blandingsforhold, og bland omhyggeligt:

- 70 % ethanol – 7 dele 100 % ethanol til 3 dele renset vand
- 85 % ethanol – 8,5 dele 100 % ethanol til 1,5 dele renset vand

Opløsningerne kan opbevares i op til 6 måneder ved rumtemperatur i en lufttæt beholder.

2xSSC-opløsning

Fortynd 1 del 20xSSC-opløsning med 9 dele renset vand, og bland omhyggeligt. Efterprøv pH-værdien, og juster til pH 7,0 ved at bruge NaOH eller HCl efter behov. Opløsningen kan opbevares i op til 4 uger ved rumtemperatur i en lufttæt beholder.

0,4xSSC-opløsning

Fortynd 1 del 20xSSC-opløsning med 49 dele renset vand, og bland omhyggeligt. Efterprøv pH-værdien, og juster til pH 7,0 ved at bruge NaOH eller HCl efter behov. Opløsningen kan opbevares i op til 4 uger ved rumtemperatur i en lufttæt beholder.

2xSSC; 0,05 % Tween-20-opløsning

Fortynd 1 del 20xSSC-opløsning med 9 dele renset vand. Tilsæt 5 µl Tween-20 pr. 10 ml, og bland omhyggeligt. Efterprøv pH-værdien, og juster til pH 7,0 ved at bruge NaOH eller HCl efter behov. Opløsningen kan opbevares i op til 4 uger ved rumtemperatur i en lufttæt beholder.

FISH-protokol

(Bemærk: Probens og kontrastfarvningens eksponering for laboratorielys skal hele tiden begrænses så meget som muligt).

Forberedelse af objektglas

1. Dryp celleprøven på et mikroskop-objektglas. Lad det tørre. (**Option**, hvis der bruges et cytogenetisk tørrekabinet: Celleprøverne dryppes på objektglasset i et cytogenetisk tørrekammer. Tørrekammeret bør anvendes ved cirka 25 °C og 50 % luftfugtighed for at få optimale celleprøver. Hvis der ikke er et cytogenetisk tørrekammer til rådighed, kan der alternativt anvendes et stinksak).
2. Nedskænk objektglasset i 2xSSC i 2 minutter ved rumtemperatur (RT) uden omrystning.
3. Dehydrer i ethanol i stigende koncentrationer (70 %, 85 % og 100 %), hver i 2 minutter ved RT.
4. Lad det tørre.

Præ-denaturering

5. Tag proben ud af fryseren, og lad den opnå RT. Centrifugér kort rørene inden brug.
6. Sørg for, at probeopløsningen er ensartet blandet med en pipette.
7. Utdrag 10 µl af proben pr. test, og transferer til et mikrocentrifugerør. Sæt hurtigt det resterende probemateriale tilbage i fryseren.
8. Sæt proben og prøveobjektglasset til opvarming på en varmeplade ved 37 °C (+/- 1 °C) i 5 minutter.
9. Dryp 10 µl af probeblandingen på celleprøven, og dæk forsigtigt med et dækglas. Forseg med gummipløsningslim, og lad den tørre fuldstændigt.

Denaturering

10. Denaturer prøve og probe samtidigt ved at varme objektglasset på en varmeplade ved 75 °C (+/- 1 °C) i 2 minutter.

Hybridisering

11. Anbring objektglasset i en fugtig, lystæt beholder ved 37 °C (+/- 1 °C) natten over.

Vask efter hybridisering

12. Tag DAPI ud af fryseren, og lad det opnå RT.
13. Fjern omhyggeligt dækglasset og alle spor af lim.
14. Nedskænk objektglasset i 0,4xSSC (pH 7,0) ved 72 °C (+/- 1 °C) i 2 minutter uden omrystning.
15. Lad objektglasset tørre, og nedskænk det i 2xSSC, 0,05 % Tween-20 ved RT (pH 7,0) i 30 sekunder uden omrystning.
16. Lad objektglasset tørre, og tilsæt 10 µl DAPI-antifade på hver prøve.
17. Dæk med et dækglas, fjern alle eventuelle bobler, og lad farven udvikle sig i mørke i 10 minutter.
18. Undersøg med et fluorescensmikroskop (se Anbefalinger til fluorescensmikroskop).

Stabiliteten i de færdige objektglas

Færdige objektglas kan analyseres i op til 1 måned, hvis de opbevares mørkt ved/eller under RT.

Anbefalinger til proceduren

1. Det kan nedsætte signalfluorescensen, hvis objektglassene får for meget varme eller er gamle
2. Hybridiseringsbetingelserne kan påvirkes negativt, hvis der bruges andre reagenser end dem, der anbefales eller leveres af Cytocell Ltd.
3. Der skal anvendes et kalibreret termometer til at måle temperaturerne i oplosninger, vandbade og inkubatorer, da disse temperaturer er vigtige for at opnå bedst mulige resultater.
4. Stringens ved vasekonzcentrationerne, pH og temperaturerne er vigtig, da for lav stringens kan føre til ikke-specific binding af proben, og for høj stringens kan føre til tab af signaler.
5. Ikke-komplet denaturering kan føre til tab af signaler, og for høj denaturering kan også føre til ikke-specific binding.
6. Overhybridisering kan føre til yderligere eller uforventede signaler.
7. Brugere bør optimere protokollen til egne prøver, før testen bruges til diagnostiske formål.
8. Suboptimale betingelser kan føre til ikke-specific binding, som kan mistolkes som et probesignal.

Fortolkning af resultater

Vurdering af objektglasvaliteten

Objektglasset bør ikke analyseres, hvis:

- Signalerne er for svage til, at de enkelte filtre kan analyseres – for at fortsætte med en analyse skal signalerne være lyse, klare og nemme at vurdere
- Der er et højt antal af klumpende/overlappende celler, som slører analysen
- >50 % af cellerne ikke er hybridiseret
- Der er for mange fluorescenspartikler mellem cellerne og/eller en fluorescerende dis, der forstyrer signalerne – optimale objektglas har en enten mørk eller sort og ren baggrund
- Cellekernernes område ikke kan skelnes og ikke er intakt

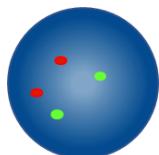
Analysevejledninger

- Der skal altid være to brugere til at analysere og fortolke hver prøve. Enhver diskrepans skal afklæres ved en vurdering fra en tredje bruger
- Hver bruger skal have passende faglige kvalifikationer i overensstemmelse med anerkendte nationale standarder
- Hver bruger bør uafhængigt bedømme 100 kerner for hver prøve. Den ene bruger starter analysen fra venstre side af objektglasset, og den anden bruger starter fra højre side
- Brugerne skal dokumentere deres resultater skriftligt hver for sig
- Der skal kun analyseres intakte kerner, ingen overlappende eller klumpende kerner, der er dækket af cytoplasmatiske debriser eller har en høj grad af autofluorescens
- Undgå områder med overskud af cytoplasmatiske debriser eller ikke-specific hybridisering
- Signalintensiteten kan variere, selv for den enkelte kerne. I sådanne tilfælde anvendes enkeltfiltre og/eller justering af det fokale plan
- Ved suboptimale betingelser kan signalerne virke diffuse. Hvis to signaler med samme farve berører hinanden, eller afstanden mellem dem ikke er større end bredden på to signaler, eller hvis der er en svag streng, der forbinder de to signaler, tælles de som ét signal
- Hvis man er i tvivl, om en celle kan analyseres eller ej, så analyseres den ikke

Analysevejledninger	
	Tæl ikke – cellekernerne er for tæt på hinanden til, at der kan bestemmes grænser
	Tæl ikke cellekerner, der overlapper hinanden – det er ikke alle områder af de to cellekerner, der er synlige
	Tæl som to røde signaler og to grønne signaler – et af de to røde signaler er diffus
	Tæl som to røde signaler og to grønne signaler – hullet i et rødt signal er mindre end to signalers bredde

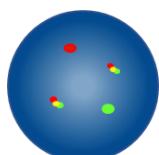
Forventede resultater

Forventet normalt signalmønster



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

Forventet abnormt signalmønster



I en celle med en t(14;20)(q32.3;q12)-translokation vil det forventede signalmønster være et rødt signal, et grønt signal og to røde/grønne fusionssignaler (1R, 1G, 2F).

Andre signalmønstre er mulige i aneuploide/ubalancede prøver.

Kendt krydsreaktion

Den grønne IGH-probe kan vise krydshybridisering til 15q11.2 og 16p11.2.

Indberetning af utilsigtede hændelser

Hvis du mener, at dette udstyr ikke har virket korrekt eller er blevet forringet i dets ydelseskarakteristika, hvilket kan have bidraget til en utilsigted hændelse (f.eks. forsinket eller falsk diagnose, forsinket eller uhensigtsmæssig behandling), skal producenten omgående informeres (e-mail: vigilance@ogt.com).

Hvis relevant, skal hændelsen ligeledes indberettes til den nationale ansvarlige myndighed. En liste med vigilance-kontaktsteder kan findes på: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Særlige ydelseskarakteristika

Laboratorier skal verificere cut-off-værdier ved at bruge deres egne data^{6,7}.

Analytisk specifitet

Analytisk specifitet er procentdelen af signaler, som kun hybridiserer til det korrekte locus og ingen anden lokalitet. Den analytiske specifitet blev etableret ved analyse af i alt 200 mål-loci. Den analytiske specifitet blev beregnet som antallet af FISH-signaler, som hybridiserer til det rette locus, delt med det samlede antal af hybridiserede FISH-signaler.

Tabel 1. Analytisk specifitet for IGH/MAFB Translocation, Dual Fusion Probe

Probe	Mål-locus	Antal af signaler, der er hybridiseret til det rette locus	Samlet antal af signaler, der er hybridiseret	Specifitet (%)
Rød MAFB	20q12	200	200	100
Grøn IGH	14q32.33	200	200	100

Analytisk sensitivitet

Analytisk sensitivitet er procentdelen af de interfaseceller, der kan tælles med det forventede normale signalmønster. Den analytiske sensitivitet blev etableret ved at analysere interfaseceller på tværs af forskellige normale prøver. Sensitiviteten blev beregnet som procentdelen af talte celler med det forventede signalmønster (med et konfidensinterval på 95 %).

Tabel 2. Analytisk sensitivitet for IGH/MAFB Translocation, Dual Fusion Probe

Antal celler med forventede signalmønstre	Antal celler med signaler, der kan tælles	Sensitivitet (%)	95 % konfidensinterval
467	500	93,4	2,1

Præcision og reproducerbarhed

Præcision er et mål for den naturlige variation i en test, når den gentages adskillige gange under samme betingelser. Dette blev vurderet ved at analysere gentagelser af det samme lot-nummer af prøber, der var testet på samme prøve, under de samme betingelser og på den samme dag.

Reproducerbarhed er et mål for variabiliteten af en test og er blevet fastslået i forhold til prøve-til-prøve-, dag-til-dag- og batch-til-batch-variabilitet. Dag-til-dag-reproducerbarhed blev vurderet ved at analysere de samme prøver på tre forskellige dage. Batch-til-batch-reproducerbarhed blev vurderet ved at analysere de samme prøver med tre forskellige probelotnumre på en dag. Prøve-til-prøve-reproducerbarhed blev vurderet ved at analysere tre replikater af en prøve på en dag. For hver prøve blev signalmønstrene for 100 interfaseceller registreret, og procentdelen af celler med det forventede signalmønster blev beregnet.

Reproducerbarhed og præcision blev beregnet som standardafvigelsen (STDEV, Standard Deviation) mellem replikater for hver variabel og samlet middel-STDEV.

Tabel 3. Reproducerbarhed og præcision af IGH/MAFB Translocation, Dual Fusion Probe

Variabel	Standardafvigelse (STDEV, Standard Deviation)
Præcision	0,00
Prøve-til prøve	0,00
Dag-til-dag	0,00
Batch-til-batch	0,00
Samlet afvigelse	0,00

Yderligere information

Kontakt CytoCell Technical Support Department, hvis du ønsker yderligere produktinformationer.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytocell.com

W: www.ogt.com

Referencer

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

6. Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence *in situ* hybridization. *Genet Med.* 2011;13(7):667-675.
7. Wiktor AE, Dyke DLV, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Preclinical validation of fluorescence *in situ* hybridization assays for clinical practice.* *Genetics in Medicine.* 2006;8(1):16-23.

Symbolvejledning

REF	da: Katalognummer
	da: Medicinsk udstyr til <i>in vitro</i> -diagnostik
	da: Batch-kode
	da: Se brugsanvisningen
	da: Producent
	da: Sidste anvendelsesdato
	da: Temperaturgrænse
	da: Holdes væk fra sollys
	da: Indholder tilstrækkeligt til <n> tests
	da: Indhold

Patenter og varemærker

CytoCell er et registreret varemærke tilhørende Cytocell Ltd.



Cytocell Ltd.
Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, Storbritannien
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E: probes@cytocell.com
W: www.ogt.com