



A Sysmex Group Company



## Käyttöohje

REF: LPH 067-S / LPH 067

### CLL PROFILER Kit



VAIN AMMATIKÄYTTÖÖN



www.cytocell.com

Lisätietoja ja muita kieliä saatavilla osoitteesta [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

### Rajoitukset

Tämä laite on suunniteltu havaitsemaan genomien puutteita suuremmalta alueelta kuin tämän koetinsarjan punaisen ja vihreän kloonin kattama alue, johon sisältyvät P53 (TP53)-, ATM- ja D13S319-alueet, tai lisäyksiä, jotka ovat suurempia kuin tämän koetinsarjan sinisen kloonin kattama alue, johon sisältyy kromosomin 12 sentromeeri. Tämä tuote ei ehkä havaitse kyseisten alueiden ulkopuolisia genomien lisäyksiä/puutteita tai osittaisia lisääntymistä/puuttumista.

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

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

FISH-tulosten raportoinnin ja tulkinnan on oltava yhdenmukainen ammattimaisten käytäntöstandardien kanssa, ja niissä on otettava huomioon muut kliiniset ja diagnostiset tiedot. Sarja on tarkoitettu muiden diagnostisten laboratoriostien apuvälineeksi, eikä hoitoa 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 käyttötarkoituksesta poikkeavaan käyttöön.

### Aiottu käyttötarkoitus

CytoCell CLL PROFILER Kit on kvalitatiivinen, ei-automatisoitu FISH (fluorescence *in situ* hybridisation) -testi, jota käytetään kromosomien deleetioiden havaitsemiseen kromosomin 11 alueella 11q22.3, kromosomin 17 alueella 17p13.1 tai kromosomin 13 alueella 13q14.2-q14.3 ja/tai kromosomin 12 sentromeerin alueen lisääntymisen havaitsemiseen Carnoy'n liuokseen (3:1 metanoli/etikkahappo) fiksoiduille, hematologisesti johdetuille solususpensioille potilaita, joilla on krooninen lymfaattinen leukemia (CLL).

### Käyttöaiheet

Tämä tuote on suunniteltu käytettäväksi muiden kliinisten ja histopatologisten testien lisäksi vakintuneissa diagnostiikan ja kliinisen hoidon hoitopoluissa, joissa tieto P53 (TP53)-, ATM-deleetion tai D13S319-deleetion tilasta ja/tai kromosomin 12 sentromeerin lisääntymisestä olisi tärkeää kliiniselle hoidolle.

### Testin periaatteet

Fluoresenssi *in situ* -hybridisaatio (FISH) on tekniikka, jonka avulla DNA-sekvenssejä voidaan havaita metafasisikromosomeista 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-rait-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 denaturoituun, fluoresenssimerkittyyn DNA-koettimeen, jolla on täydentävä sekvenssi. Hybridisaation jälkeen sitomaton ja muu kuin spesifisesti sidottu DNA-koetin poistetaan, ja DNA vastaväritään visualisointia varten. Sen jälkeen hybridisoitu koetin voidaan visualisoida fluoresenssimikroskopian avulla kohdemateriaalissa.

### Koettimen tiedot

CytoCell CLL PROFILER Kit on tarkoitettu TP53-, ATM- ja D13S319-deleetioiden havaitsemiseen sekä kromosomin 12 sentromeerisekvenssin lisääntymisen havaitsemiseen perifeerisestä verestä tai luuydinnytteistä potilaita, joilla on krooninen lymfaattinen leukemia (CLL).

### P53(TP53)/ATM Probe Combination -koetinyhdistelmä

TP53-geeni (tuumoriproteiini p53) paikassa 17p13.1 on yksi tärkeimpiä tuumorisuppressorigenejä; se toimii vahvana transkriptiotekijänä ja sillä on merkittävä tehtävä perimän vakauden ylläpitäjänä. TP53:n puuttumista on raportoitu 10 prosentilla CLL-potilaista, ja sitä pidetään kyseisen sairauden huonoimman ennusteen markkerina<sup>1,2</sup>.

ATM (ATM-seriini/treoniinikinaasi) -geeni paikassa 11q22.3 on tärkeä kontrollipistegeeni, joka on mukana soluvaurioiden hallinnassa. Sen tehtävä on arvioida solun DNA-vaurion tasoa ja yrittää niiden korjausta DNA-vaurion korjausreittiin kuuluvien tärkeimpien substraattien fosforylaatiolla<sup>3</sup>. Etenkin ATM:n puuttumista on raportoitu 18 prosentilla CLL-potilaista, ja sitä pidetään kyseisen sairauden huonoimman ennusteen markkerina<sup>4</sup>.

ATM/TP53-vuorovaikutuksen analyysi CLL-tapauksissa on osoittanut, että TP53:n ja ATM:n osuus on merkittävä lymfaattisen syövän proliferaatioissa<sup>5</sup>. On osoitettu, että ATM tehostaa TP53:n fosforylaatiota, jos vaurio on niin suuri, että solu on tuhoava apoptoosilla (jota TP53 säätelee). ATM:n deleetio poistaa tämän kontrollipiste-toiminnon ja siten TP53:n aktivoitumisen. Näin ollen mitään korjausyritystä ei tehdä, eikä vaurioituneiden solujen apoptoosia tapahdu TP53:n läsnäolosta huolimatta. Jos ATM puuttuu, vaurioituneet solut saavat jatkaa lisääntymistään<sup>6</sup>.

### D13S319/13qter/12cen Deletion/Enumeration deleetio/numerointi

Deleetiot, jotka vaikuttavat alueeseen 13q14, ovat myös yleisin rakenteellinen geneettinen poikkeama kroonisessa lymfaattisessa leukemiassa (CLL)<sup>6,7,8</sup>. Alueen todetaan olevan heterotsygotisesti deleetoinut 30–60 prosentilla ja homotsygotisesti deleetoinut 10–20 prosentilla CLL-potilaista<sup>9</sup>. Eloönjäämisprosentin on todettu olevan samanlainen kummallakin potilasryhmällä<sup>10</sup>. Potilaat, joilla on 13q14-deleetioita, on luokiteltu hyvin pienen riskin potilaiksi, ellei heillä ole muita geneettisiä vaurioita<sup>1</sup>.

Kaksi ei-koodittavaa RNA-geeniä, DLEU1 (deleetoinut lymfaattisessa leukemiassa 1) ja DLEU2 (deleetoinut lymfaattisessa leukemiassa 2), sekä geneettinen markkeri D13S319 kattavat 13q14:n patogeenisesti kriittisen alueen<sup>11</sup>. DLEU1-geeniä pidetään todennäköisempänä CLL-leukemiaan liittyvänä ehdokastuomorisuppressorigeeninä 13q14-alueella<sup>12</sup>. 12-trisomia on usein tavattu poikkeavuus CLL-potilailla, ja sitä tavataan 20 prosentissa tapauksia<sup>13</sup>. Se esiintyy usein ainoana sytogeneettisenä poikkeavuutena (40–60 prosentissa 12-trisomian tapauksista)<sup>7</sup>. Potilaiden, joilla on 12-trisomia, riski luokitellaan vähäiseksi, ellei muita geneettisiä leesioita ole<sup>1</sup>.

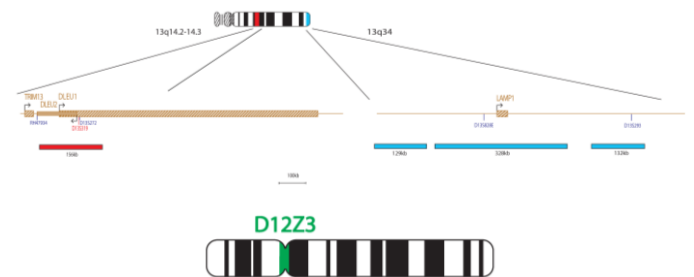
### Koettimen tekniset tiedot

#### D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe -koetin

D13S319, 13q14.2, punainen

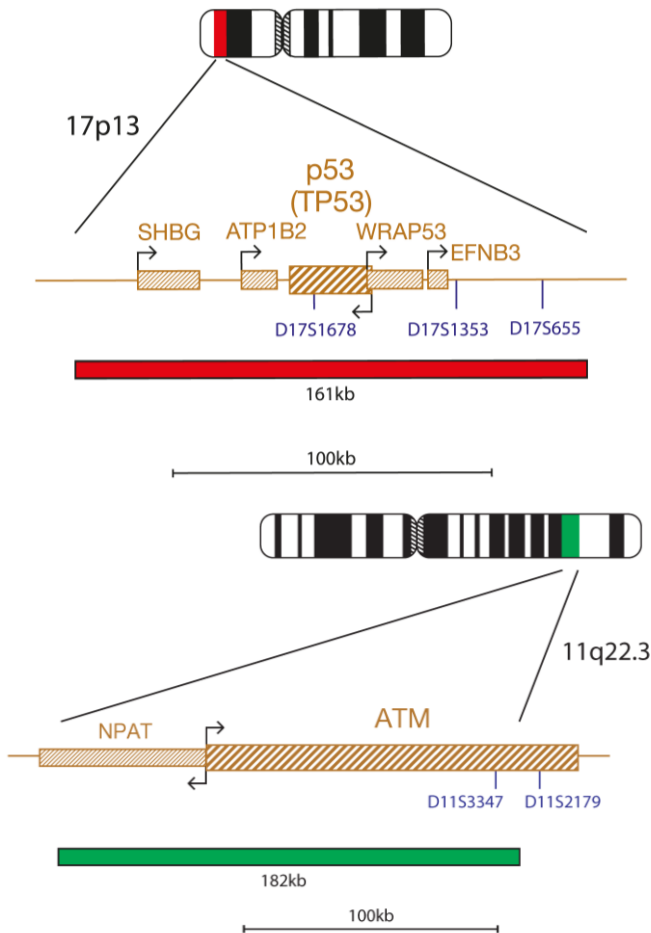
13qter, 13q34, sininen

D12Z3, 12p11.1-q11.1, vihreä



Chromosome 12 Alpha Satellite -koetin on vihreällä leimattu toistosekvenssikoetin, joka tunnistaa sentromeerisen toistosekvenssin D12Z3. Punaisella leimattu D13S319-koetin kattaa 156 kb:n alueen, johon sisältyy koko DLEU1, suurin osa DLEU2-geeneistä sekä D13S319-, D13S272- ja RH47934-markkerit. Sinisellä leimattu 13qter-subtelomeerikohtainen koetin mahdollistaa kromosomin 13 tunnistamisen ja toimii kontrollikoettimena.

**P53 (TP53)/ATM**  
P53, 17p13.1, punainen  
ATM, 11q22.3, vihreä



P53-komponentti sisältää punaisella leimatus 161 kb:n koettimen, joka kattaa koko P53 (TP53) -geenin ja sen viereiset alueet. ATM-komponentti sisältää punaisella leimatus 182 kb:n koettimen, joka kattaa NPAT-geenin telomeeripuolen ja ATM-geenin sentromeerisen pään juuri D11S3347-markkerin yli.

**Toimitettavat materiaalit**

**D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe -koetin:**  
50 µl pulloa kohti (5 testiä) tai 100 µl pulloa kohti (10 testiä)

**P53 (TP53) /ATM -koetin:**

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

Koettimet toimitetaan ennalta sekoitettuna hybridisaatioliuokseen (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 varoimet**

1. Tarkoitettu *in vitro*-diagnostiikkakäyttöön. Vain ammattikäyttöön.
2. Käytä käsi- ja kasineita käsitellessäsi DNA-koettimia ja DAPI-vastaväriä.
3. Anturiseokset sisältävät formamidiä, joka on teratogeeni: älä hengitä höyryjä sisään tai päästä ainetta kosketuksiin ihon kanssa. Käsiteltävä varoen: käytä käsi- ja laboratoriotakkeja.
4. DAPI on potentiaalinen karsinogeeni. Käsiteltävä varoen: käytä käsi- ja laboratoriotakkeja.
5. Hävitä kaikki vaaralliset materiaalit laitoksesi vaarallisten jätteiden hävittämistä koskevien ohjeiden mukaan.
6. Käyttäjien on pystyttävä erottamaan toisistaan punainen, sininen ja vihreä väri.
7. Mikäli hahmoteltua protokollaa ei noudateta ja sen mukaisia reagensseja ei käytetä, se saattaa vaikuttaa suorituskäytännön ja johtaa virheellisiin positiivisiin/negatiivisiin tuloksiin.
8. Koetinta ei saa laimentaa tai sekoittaa muiden anturien kanssa.
9. Mikäli 10 µl:n koetinta ei käytetä protokollan esidenaturaatiovaiheessa, se saattaa vaikuttaa suorituskäytännön ja johtaa virheellisiin positiivisiin/negatiivisiin tuloksiin.

**Säilytys ja käsittely**

Sarjaa on säilytettävä pakastimessa -25 °C ... -15 °C:n lämpötilassa sarjan 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 pakkaukseen sisällyttämättömät**

- Kalibroituja laitteistoja 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. Vesikylypy tarkalla lämpötilan hallinnalla 37 °C:n ja 72 °C:n lämpötilassa
  4. Mikrosentrifugiletkut (0,5 ml)
  5. Fluoresenssimikroskoopi (katso Fluoresenssimikroskooppisuositus-osio)
  6. Vaihekontrastimikroskoopi
  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. Mikroskooppiobjektilasi
  14. 24 x24 mm:n peitelasit
  15. Ajastin
  16. 37 °C:n inkubaattori
  17. Kumiliuosliima
  18. Pyörresekoitin
  19. Mittasylinterit
  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 öljymmersiosuunnitelman 60/63x- tai 100x-apokromaattiobjektiveja parhaaseen mahdolliseen visualisointiin. Tässä koetinsarjassa käytettävät loisteaineet virittyvät ja säteilevät seuraavilla aaltopituuksilla:

Loisteaine	Viritys <sub>maks</sub> [nm]	Emissio <sub>maks</sub> [nm]
Sininen	418	467
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 kaksoiskaistanpäästösuodatinta vihreän ja punaisen loisteaineen optimaaliseen samanaikaiseen visualisointiin. Käytä sinisen spektrin yksinkertaista kaistanpäästösuodatinta sinisen spektrin optimaaliseen visualisointiin tai punaisen spektrin/vihreän spektrin/sinisen spektrin kolmoiskaistanpäästösuodatinta vihreän, punaisen ja sinisen loisteaineen samanaikaiseen visualisointiin.

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

**Näytteen valmistelu**

Sarja on suunniteltu käytettäväksi perifeerisille verisoluille tai luuydinsolulle, jotka on fiksatoitu Carnoy'n liuokseen (3:1 metanoli/etikkahappo) ja jotka on valmistettu laboratorion tai laitoksen suuntaviivojen mukaisesti. Valmistele ilma-kuivatut näytteet mikroskoopin objektiivilaseille sytogeneettisten vakioitoimenpiteiden mukaisesti. AGT-sytogeenetiikkalaboratorion opaskirja sisältää suosituksia näytteen keräämisestä, viljelystä, poiminnasta ja objektiivilasiens valmistelusta<sup>14</sup>.

**Liuoksen valmistus**

- Etanoliuokset**  
Laimenna 100 % etanoli akkuedellä 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 laboratoriovaloille on aina rajallista).

#### Objektiivilasin valmistelu

- Laita pisara solunäytettä mikroskooppiobjekttilasille. Anna kuivua. (Vaihtoehtoisesti, jos käytetään sytogeneettistä kuivauskammiota: mikroskooppiobjekttilasille on asetettava pisara näytettä sytogeneettisen kuivauskammion avulla. 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).
- Upota objektiivilasi 2 x SSC-liuokseen 2 minuutiksi huoneenlämpötilassa ravistamatta.
- Kuivaa kutakin etanolisarjassa (70 %, 85 % ja 100 %) 2 minuuttia huoneenlämpötilassa.
- Anna kuivua.

#### Esidenaturaatio

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

#### Denaturaatio

- Denaturatio näyte ja koetin samanaikaisesti kuumentamalla objektiivilasia lämpölevyllä 2 minuutin ajan 75 °C:n (+/- 1 °C) lämpötilaan.

#### Hybridisaatio

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

#### Hybridisaation jälkeiset pesut

- Poista DAPI pakastimesta ja anna sen lämmetä huoneenlämpötilaan.
- Poista peitelasi ja kaikki liimajäljet huolellisesti.
- Upota objektiivilasi 0,4 x SSC-liuokseen (pH 7,0) 2 minuutiksi 72 °C:n (+/- 1 °C) lämpötilassa ravistamatta.
- Tyhjennä objektiivilasi ja upota se 30 sekunniksi 2 x SSC-liuokseen ja 0,05 % Tween-20-liuokseen huoneenlämpötilassa (pH 7,0) ravistamatta.
- Tyhjennä objektiivilasi ja laita kuhunkin näytteeseen 10 µl häipymistä ehkäisevää DAPIa.
- Peitä peitelasilla, poista mahdolliset kuplat ja anna värin kehittyä pimeässä 10 minuuttia.
- Tarkastele fluoresenssimikroskoopilla (katso **Fluoresenssimikroskooppisuositus**).

#### Valmiiden objektiivilasienvakaus

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

#### Toimenpidesuosituks

- Objektiivilasiensa sintraaminen tai ikäännyttäminen saattaa heikentää signaalien fluoresenssia
- Muiden kuin Cytocell Ltd -yhtiön toimittamien tai suosittelemien reagenssien käyttö saattaa vaikuttaa haitallisesti hybridisaatio-olosuhteisiin.
- Käytä liuosten, vesikylypyjen ja inkubaattorien lämpötilojen mittaukseen kalibroituja lämpömittaria, sillä nämä lämpötilat ovat ratkaisevan tärkeitä tuotteen optimaalisen suorituskyvyn kannalta.
- Pesupitoisuudet, pH-arvo ja lämpötilat ovat tärkeitä, sillä liiallinen löyhys saattaa johtaa koettimen epäspesifiseen sitoutumiseen ja liiallinen ankaruus signaalien puuttumiseen.
- Epätavallinen denaturaatio saattaa johtaa signaalien puuttumiseen ja liiallinen denaturaatio saattaa myös johtaa epäspesifiseen sitoutumiseen.
- Liiallinen hybridisaatio saattaa johtaa ylimääräisiin tai odottamattomiin signaaleihin.
- Käyttäjien on optimoitava omien näytteidensä protokolla ennen testin käyttöä.
- Suboptimaaliset olosuhteet saattavat johtaa epäspesifiseen sitoutumiseen, jotka saatetaan tulkita koetinsignaaleiksi.

#### Tulosten tulkitseminen

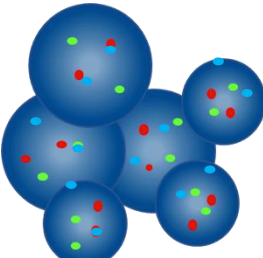
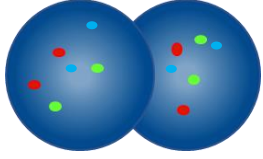
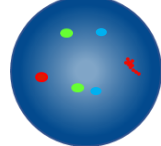
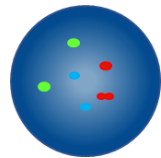
##### Objektiivilasin laadun arviointi

Objektiivilasia ei tarvitse analysoida, jos:

- Yksittäisten signaalien signaalit ovat liian heikkoja analysoitavaksi – jotta analyysia voidaan jatkaa, signaalien on näyttävä 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

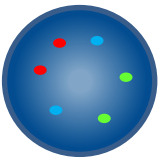
- Kahden analytiikon pitäisi analysoida ja tulkita jokainen näyte. Kaikki erivyydet on annettava kolmannen analytiikon arvioitavaksi
- Jokaisella analytikolla on oltava sopiva pätevyys tunnustettujen kansallisten standardien mukaan.
- Jokaisen analytiikon pitäisi saada riippumattomasti 100 tumaa kustakin näytteestä. Ensimmäisen analytiikon pitäisi käynnistää analyysi objektiivilasin vasemmalta puolelta ja toisen analytiikon oikealta puolelta
- Kunkin analytiikon 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.
- Mikäli on epäilystä siitä, voidaanko solu analysoida, älä analysoi sitä.

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

#### Odotettavissa olevat tulokset

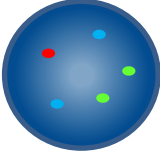
##### D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe -koetin

##### Odotettavissa oleva normaali signaalikuvio

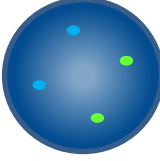


Normaalissa solussa on odotettavissa kaksi punaista, kaksi sinistä ja kaksi vihreää signaalia (2P, 2S, 2V).

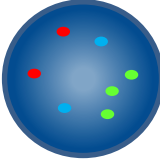
Odotettavissa olevat epänormaalit signaalikuviot



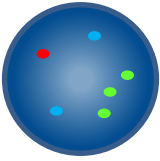
Jos solussa on D13S319-lokuksen hemisyygoottinen deleetio, odotettavissa oleva signaalikuvio on yksi punainen, kaksi sinistä ja kaksi vihreää signaalia (1P, 2S, 2V).



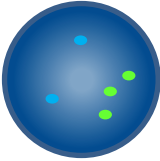
Jos solussa on D13S319-lokuksen homisyygoottinen deleetio, odotettavissa oleva signaalikuvio on nolla punaista, kaksi sinistä ja kaksi vihreää signaalia (0P, 2S, 2V).



Jos solussa on 12-trisomia ja normaali D13S319-tila, odotettavissa oleva signaalikuvio on kaksi punaista, kaksi sinistä ja kolme vihreää signaalia (2P, 2S, 3V).



Jos solussa on 12-trisomia ja D13S319-lokuksen hemisyygoottinen deleetio, odotettavissa oleva signaalikuvio on yksi punainen, kaksi sinistä ja kolme vihreää signaalia (1P, 2S, 3V).

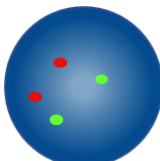


Jos solussa on 12-trisomia ja D13S319-lokuksen homisyygoottinen deleetio, odotettavissa oleva signaalikuvio on nolla punaista, kaksi sinistä ja kolme vihreää signaalia (0P, 2S, 3V).

Muut signaalikuviot ovat mahdollisia aneuploidisissa / epätasapainoisissa näytteissä.

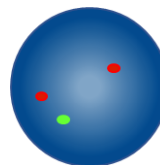
**P53/ATM Probe -koetin**

Odotettavissa oleva normaali signaalikuvio

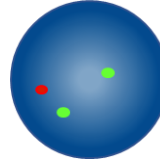


Tavallisessa solussa on odotettavissa kaksi punaista ja kaksi vihreää signaalia (2P, 2V).

Odotettavissa olevat epänormaalit signaalikuviot



Solussa, jossa on ATM-deleetio, odotettavissa oleva signaalikuvio on kaksi punaista ja yksi vihreä signaali (2P, 1V).



Jos solussa on P53-deleetio, odotettavissa oleva signaalikuvio on yksi punainen ja kaksi vihreää signaalia (1P, 2V).

Muut signaalikuviot ovat mahdollisia aneuploidisissa / epätasapainoisissa näytteissä.

**Tunnettu ristireaktiivisuus**

Vihreä D12Z3-koetin voi osoittaa ristihybridisaatiota 3c:lle, 6c:lle, 7c:lle ja 10c:lle.

**Haittatapahtumista raportointinen**

Jos uskot, että tässä laitteessa on ilmennyt toimintahäiriö tai että sen suorituskykyominaisuuksissa 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](mailto:vigilance@ogt.com)).

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

**Erityiset suorituskykyominaisuudet**

**Analyttinen spesifisyys**

Analyttinen spesifisyys on prosenttiosuus signaaleista, jotka hybridisoidaan oikeaan lokukseen eikä muihin sijainteihin. Analyttinen spesifisyys määritettiin analysoimalla yhteensä 200 kohdelokusta. Analyttinen spesifisyys laskettiin sellaisten FISH-signaalien määräksi, jotka hybridisoituivat oikeaan lokukseen jaettuna hybridisoituneiden FISH-signaalien kokonaismäärällä.

Taulukko 1. CLL PROFILER Kit -sarjan analyttinen spesifisyys

Kit	Koetin	Kohdelokus	Oikeaan lokukseen hybridisoituneiden signaalien määrä	Kaikkien hybridisoituneiden signaalien kokonaismäärä	Spesifisyys (%)
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe -koetin	Punainen D13S319	13q14.2	200	200	100
	Sininen 13qter	13q34	200	200	100
	Vihreä D12Z3	12p11.1-q11.1	200	200	100
P53/ATM Probe -koetin	Punainen P53	17p13	200	200	100
	Vihreä ATM	11q22.3	200	200	100

**Analyttinen herkkyys**

Analyttinen herkkyys on prosenttiosuus tulosten laskennassa käytettävistä interfaasisoluista, joiden odotettavissa oleva signaalikuvio on normaali. Analyttinen herkkyys määritettiin analysoimalla interfaasisoluja erilaisten normaalien näytteiden halki. Herkkyys laskettiin prosenttiosuudeksi tulosten laskennassa käytettävistä interfaasisoluista, joilla on odotettavissa oleva signaalikuvio (95 %:n luottamusväli).

Taulukko 2. CLL PROFILER Kit -sarjan analyttinen herkkyys

Kit	Sellaisten solujen määrä, joilla on odotettavissa olevat signaalikuviot	Sellaisten solujen määrä, joilla on tulosten laskennassa käytettävät signaalit	Herkkyys (%)	95 %:n luottamusväli
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe -koetin	467	500	93,4	2,6
P53/ATM Probe -koetin	479	500	95,8	1,7

**Normaalien raja-arvojen luokittelu**

Normaali raja-arvo on yhdessä FISH-koetinten kanssa maksimiprosenttiosuus DS214/CE-fi v008.00/2020-12-01 (H040 v5 / H041 v5 / H073 v3 / H074 v1)  
Sivu 4 / 5

tulosten laskennassa käytettävistä interfaasisoluista, joilla on spesifinen epänormaali signaalikuvio, jonka kohdalla näyte katsotaan normaaliksi kyseisen signaalikuvion osalta.

Normaali raja-arvo määritettiin käyttämällä normaaleilta ja positiivisilta potilailta saatuja näytteitä. Kunkin näytteen kohdalla tallennettiin 100 solun signaalikuvioita. Youden-indeksi laskettiin sellaisen kynnyksen löytämiseksi, jonka herkkyys + spesifisyys-1 on maksimoitu.

**Taulukko 3. CLL PROFILER Kit -sarian normaalien raja-arvojen luokittelu**

Kit	Uudelleenjärjestely	Epänormaali signaalikuvio	Youden-indeksi	Normaali raja-arvo (%)
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe -koetin	D13S319:n hemisygoottinen deleetio	1P, 2S, 2V	0,96	6
	12-trisomia	2P, 2S, 3V	0,99	4
P53/ATM Probe -koetin	P53-deleetio	1P, 2V	0,99	8
	ATM-deleetio	2P, 1V	0,99	8

Laboratorioiden on tarkistettava raja-arvot käyttäen omia tietojaan<sup>15, 16</sup>.

#### Tarkkuus ja uusittavuus

Tarkkuus on testin luonnollisen vaihtelun mitta, kun testi toistetaan useita kertoja samoissa olosuhteissa. Tämä arvioitiin analysoimalla saman eränumeron koetinta, jota testattiin samalla näytteellä samoissa olosuhteissa ja samana päivänä.

Uusittavuus on testin vaihtelevuuden mitta, ja se on määritetty vaihtelevuutena näytteestä toiseen, päivästä toiseen ja erästä toiseen. Uusittavuutta päivästä toiseen arvioitiin analysoimalla samat näytteet kolmena eri päivänä. Uusittavuutta erästä toiseen arvioitiin analysoimalla samat näytteet käyttämällä kolmen eri eränumeron koettimia samana päivänä. Uusittavuutta näytteestä toiseen arvioitiin analysoimalla näytteen kolmea replikaatiota samana päivänä. Kunkin näytteen kohdalla tallennettiin 100 interfaasisolua ja laskettiin sellaisten solujen prosenttiosuus, joilla oli odotettavissa oleva signaalikuvio.

Uusittavuus ja tarkkuus laskettiin kunkin muuttujan replikaatioiden kokonaisvaltaisen keskimääräisen STDEV-arvon välisenä vakiopoitteamana (STDEV).

**Taulukko 4. CLL PROFILER Kit -sarian uusittavuus ja tarkkuus**

Muuttuja	Vakiopoitteama (STDEV)	
	D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe -koetin	P53/ATM Probe -koetin
Tarkkuus	1,28	1,37
Näytteestä toiseen	1,30	1,60
Päivästä toiseen	4,12	2,27
Erästä toiseen	2,04	1,77
Kokonaispoitteama	3,30	1,98

#### Kliininen suorituskyky

Kliininen suorituskyky määritettiin näytteestä, joka edustaa tuotteen aiotua kohdeväestöä. Kunkin näytteen kohdalla tallennettiin  $\geq 100$  interfaasisolun signaalikuvioita. Normaali / epänormaali määrittäminen tehtiin vertaamalla sellaisen solujen prosenttiosuus, jolla oli spesifinen epänormaali signaalikuvio normaaliin raja-arvoon verrattuna. Tuloksia verrattiin sen jälkeen näytteen tunnettuun tilaan.

Kliinisten tietojen tulokset analysoitiin herkkyuden, spesifisyyden ja raja-arvojen aikaansaamiseksi yksilöluotteista lähestymistapaa käyttämällä.

**Taulukko 5. Kliininen suorituskyky, CLL PROFILER Kit**

Uudelleenjärjestely	Kliininen herkkyys (oikea positiivinen aste, TPR)	Kliininen spesifisyys (oikea negatiivinen aste, TNR)	Väärä positiivinen aste (FPR) = 1 - spesifisyys
<i>D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe -koetin</i>			
D13S319-deleetio	96,6%	99,5%	0,5%
12-trisomia	100%	100,0%	0%
<i>P53/ATM Probe -koetin</i>			
P53-deleetio	100%	100%	0%
ATM-deleetio	100%	100%	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

- Rossi D, *et al.*, Blood. 2013 Feb 21;121(8):1403-12
- Baliakas P, *et al.*, Leukemia. 2014;(April):1-8
- Stankovic *et al.*, Blood 2004;103(1):291-300
- Dohner *et al.*, N Eng J Med 2000;343:1910-1916
- Khanna *et al.*, Nature Genetics 1998;20(4):398-400
- Juliusson G *et al.*, N Eng J Med 1990;323:720-4

- Puiggros *et al.*, Biomed Res Int 2014;1:1-13
- Kasar *et al.*, Nature Communications 2015;6:1-12
- Hammarsund M *et al.*, FEBS Letters 2004;556:75-80
- Van Dyke DL *et al.*, Br J Haematology 2009;148:544-50
- Liu Y *et al.*, Oncogene 1997;15:2463-73
- Wolf S *et al.*, Hum Mol Genet 2001;10:1275-85
- Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
- Arsham, MS., Barch, M.J. 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

<b>REF</b>	fi: Kuvastonumero
	fi: Lääkinnällinen laite <i>in vitro</i> -diagnostiikkaan
	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  
F: +44 (0) 1223 294986  
Sähköposti: probes@cytozell.com  
Verkkosivut: www.ogt.com

