



A Sysmex Group Company



Lietošanas instrukcija

REF: LPH 067-S/LPH 067

## Komplekts CLL PROFILER Kit



TIKAI PROFESIONĀLAM LIETOJUMAM



www.cytocell.com

Papildinformācija un informācija citās valodās ir pieejama vietnē  
www.ogt.com

### Ierobežojumi

Šī ierīce ir paredzēta tādu genomisko zudumu noteikšanai, kuru lielums pārsniedz reģionu, ko nosedz zaļais un sarkanais klons šajā zonžu komplektā un kas ietver P53 (TP53), ATM un D13S319 reģionus, vai pieaugumu noteikšanai, kuru lielums pārsniedz reģionu, ko nosedz zilais klons šajā zonžu komplektā, kurā ietilpst 12. hromosomas centromērs. Izmantojot šo produktu, var netikt noteikti genomiskie pieaugumi/zudumi ārpus šiem reģioniem vai daļēji šo reģionu pieaugumi vai zudumi.

Šis tests nav paredzēts: izmantošanai autonoma diagnostikas līdzekļa statusā, prenatalai testēšanai, konkrētu populāciju skrīningam, testēšanai ārpus laboratorijas un paštestēšanai. Šis produkts ir paredzēts tikai profesionālai lietošanai laboratorijās; visu rezultātu interpretēšana jāveic atbilstoši kvalificētiem darbiniekiem, ņemot vērā citu attiecināmo testu rezultātus.

Šis produkts nav apstiprināts lietošanai tādu tipu paraugiem vai slimībām, kas nav norādīti informācijā par paredzēto lietojumu.

Zināšana par luminiscētās *in situ* hibridizācijas rezultātiem un to interpretēšana ir jāveic atbilstoši profesionālajiem prakses standartiem un ir jāņem vērā cita klīniskā un diagnostiskā informācija. Šis komplekts ir paredzēts kā citu diagnostisko laboratorijas testu palīg līdzeklis, un lēmumus par terapiju nedrīkst pieņemt, vadoties tikai pēc luminiscētās *in situ* hibridizācijas rezultātiem.

Neievērojot attiecīgo protokolu, var tikt ietekmēta veikspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi vai kļūdaini negatīvi rezultāti.

Šis komplekts nav apstiprināts izmantošanai nolūkiem, kas neatbilst norādītajam paredzētajam lietojumam.

### Paredzētais lietojums

Komplekts CytoCell CLL PROFILER Kit ir kvalitatīvs, neautomatizēts luminiscētās *in situ* hibridizācijas (fluorescence *in situ* hybridisation — FISH) tests, kas paredzēts hromosomālo delēciju noteikšanai 11. hromosomas reģionā 11q22.3, 17. hromosomas reģionā 17p13.1 vai 13. hromosomas reģionā 13q14.2-q14.3 un/vai 12. hromosomas centromēriskā reģiona pieauguma noteikšanai Karnuā šķīdumā (3:1 metanols/etānskābe) fiksētās hematoloģiskās ieguūtās šūnu suspensijās no pacientiem, kuriem ir konstatēta hroniska limfocitiskā leikēmija (HLL).

### Indikācijas

Šis produkts ir paredzēts kā citu klīnisko un histopatoloģisko testu papildinājums atzītās diagnostikas un klīniskās aprūpes metodēs, kad informācija par P53 (TP53) delēcijas, ATM delēcijas vai D13S319 delēcijas statusu un/vai 12. hromosomas centromēra pieauguma statusu ir svarīga klīniskajai pārvaldībai.

### Testa principi

Luminiscētā *in situ* hibridizācija (Fluorescence *in situ* hybridisation — FISH) ir metode, kas ļauj noteikt DNS sekvences metafāzu hromosomās vai interfāzes kodolos fiksētām citogēniskiem paraugiem. Šajā metodē tiek izmantotas DNS sondes, kas hibridizējas ar veselām hromosomām vai atsevišķām unikālām sekvencēm un kalpo kā efektīvs G joslu citogēniskās analīzes palīg līdzeklis. Šo metodi tagad var lietot kā būtisku izmeklēšanas instrumentu prenatalajā, hematoloģiskajā un solidu audzēju hromosomālajā analizē. Mērķa DNS pēc fiksācijas un denaturēšanas ir pieejama hibridizācijai ar līdzīgi denaturētu, luminiscējoši marķētu DNS zondi, kurai ir papildu sekvence. Pēc hibridizācijas nesaistītā un nespecifiski saistītā DNA zonde tiek aizvākta un DNS tiek

kontrastēta vizualizācijai. Pēc tam, izmantojot luminiscences mikroskopiju, hibridizēto zondi var vizualizēt mērķa materiālā.

### Informācija par zondi

Komplekts CytoCell CLL PROFILER Kit ir paredzēts TP53, ATM un D13S319 delēciju noteikšanai, kā arī 12. hromosomas centromēra sekvenču pieauguma noteikšanai perifēro asiņu vai kaulu smadzeņu paraugos pacientiem, kuri cieš no hroniskas limfocitiskās leikēmijas (HLL).

### Zonžu kombinācija P53 (TP53)/ATM Probe Combination

Gēns TP53 (*onkoproteīns p53*), kas atrodas 17p13.1, ir viens no svarīgākajiem antionkogēniem, kā arī spēcīgs iedarbības transkripcijas faktors, kuram ir būtiska loma ģenētiskās stabilitātes nodrošināšanā. TP53 zudums ir konstatējams 10% pacientu, kuri cieš no HLL, un tiek uzskatīts par visnelabvēlīgākās prognozes marķieri šajā saslimšanā<sup>1,2</sup>.

ATM (*ATM serīna/treonīna kināzes*) gēns, kas atrodas 11q22.3, ir svarīgs kontrolpunkta gēns, kas iesaistīts šūnu bojājumu pārvaldībā; tā funkcijas ir DNA bojājumu šūnā līmeņa novērtēšana un mēģināšana tās izlabot, fosforilējot galvenos substrātus, kas iesaistīti reaģēšanas uz DNS bojājumiem ceļā<sup>3</sup>. ATN zudums ir konstatējams 18% pacientu, kuri cieš no HLL, un tiek uzskatīts par nelabvēlīgas prognozes marķieri šajā saslimšanā<sup>4</sup>.

ATM/TP53 mijiedarbības HLL ietvaros analīzes rezultāti norāda, ka TP53 un ATM ir svarīga loma limfātiskās sistēmas vēža proliferācijā<sup>5</sup>. Ir konstatēts, ka ATM pastiprina TP53 fosforilāciju, ja bojājumi ir tik lieli, ka ir nepieciešama šūnas apoptoze (ko mediē TP53). ATM delēcija noņem šo kontrolpunkta aktivitāti un līdz ar to TP53 aktivizēšanu. Līdz ar to nenotiek bojāto šūnu labošanas vai apoptozes mēģinājumi par spīti TP53 klātbūtnē. Ja ATM nepastāv, bojāto šūnu proliferācija var turpināties<sup>5</sup>.

### Zonde D13S319/13qter/12cen Deletion/Enumeration

Delēcijas, kas ietekmē 13q14, arī ir visbiežāk sastopamās strukturālās ģenētiskās aberācijas hroniskā limfocitiskajā leikēmijā (HLL)<sup>6,7,8</sup>. 30–60% HLL pacientu ir konstatēta šī reģiona heterozigota delēcija, savukārt 10–20% HLL pacientu ir konstatēta šī reģiona homozigota delēcija<sup>9</sup>. Izdzīvošanas koeficients šīm abām grupām ir vienāds<sup>10</sup>. Pacienti ar 13q14 delēcijām tiek klasificēti kā ļoti zema riska grupas pārstāvji, ja nav nekādu citu ģenētisku bojājumu<sup>1</sup>.

Divi nekodējošas RNS gēni, DLEU1 (*deletēts limfocitiskajā leikēmijā 1*) un DLEU2 (*deletēts limfocitiskajā leikēmijā 2*), kā arī ģenētiskais marķieris D13S319 atrodas patogēni kritiskajā reģionā 13q14.11. DLEU1 tiek uzskatīts par vistamāko ar HLL saistīto antionkocandidātgēnu reģionā 13q14<sup>12</sup>. 12. hromosomas trisomija ir anormalitāte ar tendenci atkārtoties, tā ir konstatējama 20% HLL gadījumos<sup>13</sup> un bieži ir novērojama kā unikāla citogēniska aberācija (40–60% gadījumu ar 12. hromosomas trisomiju)<sup>7</sup>. Pacienti ar 12. hromosomas trisomiju tiek klasificēti kā piederīgi pie zema riska grupas, ja nav nekādu citu ģenētisku bojājumu<sup>1</sup>.

### Zondes specifikācija

#### Zonde D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe

D13S319, 13q14.2, sarkana

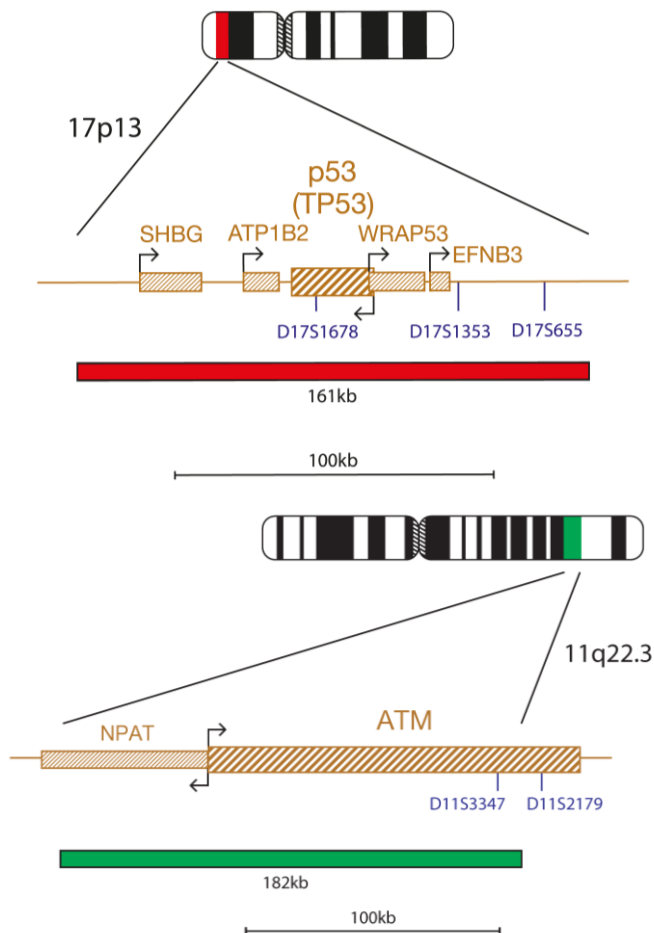
13qter, 13q34, zila

D12Z3, 12p11.1-q11.1, zaļa



Zonde Chromosome 12 Alpha Satellite Probe ir atkārtotas sekvenču zonde, marķēta zaļā krāsā, un atpazīst centromērisko atkārtoto sekvenci D12Z3. Zonde D13S319, marķēta sarkanā krāsā, nosedz 156kb reģionu, tostarp visu DLEU1 gēnu un lielāko daļu DLEU2 gēna, kā arī D13S319, D13S272 un RH47934 marķierus. 13qter subtelo-mēriskā specifiskā zonde, kas marķēta zilā krāsā, ļauj identificēt 13. hromosomu un darbojas kā kontrolzonde.

**P53 (TP53)/ATM**  
P53, 17p13.1, sarkana  
ATM, 11q22.3, zaļa



P53 komponentā ietilpst 161kb zonde, marķēta sarkanā krāsā, kas nosedz visu P53 (TP53) gēnu un tam piegulošos reģionus. ATM komponentā ietilpst 182kb zonde, marķēta sarkanā krāsā, kas nosedz NPAT gēna telomērisko galu un ATM gēna centromērisko galu aiz D11S3347 marķiera.

#### Nodrošinātie materiāli

##### Zonde D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe:

50 µl flakonā (5 testi) vai 100 µl flakonā (10 testi)

##### Zonde P53 (TP53)/ATM Probe:

50 µl flakonā (5 testi) vai 100 µl flakonā (10 testi)

Zondes tiek nodrošinātas iepriekš sajauktā veidā hibridizācijas šķīdumā (formamīds; dekstrāna sulfāts; citrāta fizioloģiskais šķīdums (salīne-sodium citrate — SSC)) un ir gatavas lietošanai.

##### Kontrasta krāsviela: 150 µl flakonā (15 testi)

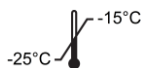
Kontrasta krāsviela ir DAPI luminiscences uzturēšanas šķīdums (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindols)).

#### Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

1. Paredzēts lietošanai *in vitro* diagnostikā. Tikai profesionālai lietošanai.
2. Apejoties ar DNS zondēm un DAPI kontrasta krāsvielu, valkājiet cimdus.
3. Zondes maisījumos ietilpst formamīds, kas ir teratogēns, tādēļ nedrīkst pieļaut to izgarojumu ieelpošanu un nonākšanu saskarē ar ādu. Rīkojieties ar to piesardzīgi; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku.
4. DAPI ir potenciāli kancerogēna viela. Rīkojieties ar to piesardzīgi; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku.
5. Atbrīvojieties no visām bīstamajām vielām atbilstoši jūsu iestādē spēkā esošajām vadlīnijām attiecībā uz bīstamu atkritumu utilizāciju.
6. Operatoriem jāspēj atšķirt sarkano, zilo un zaļo krāsu.
7. Neievērojot norādīto protokolu un norādījumus par reaģentiem, var tikt ietekmēta veikspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi vai kļūdaini negatīvi rezultāti.
8. Zondi nedrīkst atšķaidīt vai veidot maisījumus ar citām zondēm.
9. Ja protokola priekšdeklarācijas fāzes laikā netiek izmantoti 10 µl zondes, var tikt ietekmēta veikspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi vai kļūdaini negatīvi rezultāti.

#### Uzglabāšana un apiešanās

Komplekts ir jāglabā saldētavā, temperatūras diapazonā no -25 °C līdz -15 °C, līdz pat derīguma termiņa beigai datumam, kas norādīts uz komplekta marķējuma. Zondes un kontrasta krāsvielas flakoni ir jāuzglabā tumšā.



Zonde paliek stabila normālas lietošanas gaitā notiekošajos sasaldēšanas/atkausēšanas ciklos (vienu ciklu veido zondes izņemšana no saldētavas un ievietošana atpakaļ saldētavā) un ir fotostabila līdz pat 48 stundām pēc nonākšanas pastāvīgā apgaismojumā. Ir jāveic viss iespējams, lai ierobežotu gaismas un temperatūras svārstību ietekmi.

#### Aprīkojums un materiāli, kas ir nepieciešami, bet nav iekļauti komplektācijā

Ir jāizmanto kalibrēts aprīkojums.

1. Sildierīce (ar cietu sildvirsmu un precīzu temperatūras regulēšanu līdz pat 80 °C)
2. Kalibrētas dažāda tilpuma mikropipetes un uzgaļi 1–200 µl diapazonā.
3. Ūdens vanna ar precīzu temperatūras regulēšanu — 37 °C un 72 °C
4. Mikrocentrifūgas mēģenes (0,5 ml)
5. Luminiscences mikroskops (sk. sadaļu Ieteikumi attiecībā uz luminiscences mikroskopu)
6. Fāžu kontrasta mikroskops
7. Tīri plastmasas, keramikas vai karstumizturīga stikla Koplina trauki
8. Pincete
9. Kalibrēta pH mērierīce (vai pH indikatora strēmeles, ar kurām var veikt mērījumus pH 6,5–8,0 diapazonā)
10. Kontainers ar mitru vidi
11. Luminiscencei atbilstoša mikroskopa objektīva iegremdēšanas eļļa
12. Galda centrifūga
13. Mikroskopa priekšmetstiklīni
14. 24x24 mm segstiklīni
15. Taimeris
16. 37 °C inkubators
17. Gumijas līme
18. Virpuļmaisītājs
19. Mērcilindri
20. Magnētiskais maisītājs
21. Kalibrēts termometrs

#### Papildaprīkojums, kas nav ietverts komplektācijā

1. Citoģenētiskā žāvēšanas kamera

#### Nepieciešamie reaģenti, kas nav ietverti komplektācijā

1. 20x citrāta fizioloģiskais šķīdums (salīne-sodium citrate — SSC)
2. 100% etanols
3. Tween-20
4. 1M nātrija hidroksīds (NaOH)
5. 1M sālsskābe (HCl)
6. Attīrīts ūdens

#### Uz luminiscences mikroskopu attiecināmie ieteikumi

Lai nodrošinātu optimālu vizualizāciju, izmantojiet 100 W dzīvsudraba spuldzi vai ekvivalentu gaismas avotu un eļļu iegremdējamus 60/63x vai 100x objektīvus. Šajā zonžu komplektā izmantotie fluorofori tiks ierosināti un izstaros tālāk norādītā garuma viļņos.

Fluorofors	Ierosme <sub>maks.</sub> [nm]	Izstarošana <sub>maks.</sub> [nm]
Zils	418	467
Zaļš	495	521
Sarkans	596	615

Nodrošiniet, lai mikroskops būtu aprīkots ar iepriekš norādītajiem viļņa garumiem atbilstošiem ierosmes un izstarošanas filtriem. Lai nodrošinātu optimālu zaļo un sarkano fluoroforu vienlaicīgu vizualizāciju, izmantojiet trīsjoslu DAPI/zaļā spektra/sarkanā spektra filtru vai divjoslu zaļā spektra/sarkanā spektra filtru. Izmantojiet vienjoslu zilā spektra filtru zilā spektra optimālai vizualizācijai vai trīsjoslu sarkanā spektra/zaļā spektra/zilā spektra filtru vienlaicīgai zaļo, sarkano un zilo fluoroforu vizualizācijai.

Pirms lietošanas pārbaudiet luminiscences mikroskopu, lai pārliecinātos, vai tas darbojas pareizi. Izmantojiet iegremdēšanas eļļu, kas piemērota luminiscences mikroskopijai un nodrošina zemu autoluminiscences līmeni. Izvairieties no DAPI luminiscences uzturēšanas šķīduma sajaukšanās ar mikroskopa iegremdēšanas eļļu, jo pretējā gadījumā radīsies signāla traucējumi. Rīkojieties atbilstoši ražotāja ieteikumiem attiecībā uz spuldzes un filtru kalpošanas ilgumu.

#### Paraugu sagatavošana

Šis komplekts ir paredzēts izmantošanai ar perifēro asiņu vai kaula smadzeņu šūnām, kas fiksētas Karnuā šķīdumā (3:1 metanols/etiķskābe) fiksatorā un ir sagatavotas atbilstoši laboratorijā vai iestādē spēkā esošajām vadlīnijām. Sagatavojiet gaisā nožāvētus paraugus uz mikroskopa priekšmetstiklīņiem atbilstoši standarta citoģenētiskajām procedūrām. AGT *citoģenētiskās laboratorijas rokasgrāmata* ir ietverti ieteikumi par paraugu ņemšanu, kultivēšanu, ievākšanu un priekšmetstiklīņu sagatavošanu<sup>14</sup>.

## Šķīdumu sagatavošana

### Etanola šķīdumi

Atšķaidiet 100% ar attīrītu ūdeni atbilstoši tālāk norādītajām proporcijām un rūpīgi samaisiet.

- 70% etanols — 7 daļas 100% etanola ar 3 daļām attīrīta ūdens
- 85% etanols — 8,5 daļas 100% etanola ar 1,5 daļām attīrīta ūdens

Glabājiet šķīdumus līdz pat 6 mēnešiem istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

### 2xSSC šķīdums

Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 9 daļām attīrīta ūdens un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 mēnešu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

### 0,4xSSC šķīdums

Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 49 daļām attīrīta ūdens un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 mēnešu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

### 2xSSC, 0,05% Tween-20 šķīdums

Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 9 daļām attīrīta ūdens. Pievienojiet 5 µl Tween-20 uz 10 ml un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 mēnešu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

### Luminiscētās in situ hibridizācijas protokols

(Piezīme. Nodrošiniet, lai zonde un kontrasta krāsviela pēc iespējas mazāk tiktu pakļauta laboratorijas apgaismojuma iedarbībai.)

### Priekšmetstiklīņa sagatavošana

1. Novietojiet šūnu paraugu uz mikroskopa priekšmetstiklīņa, kas izgatavots no stikla. Ļaujiet nožūt. **(Pēc izvēles, ja tiek izmantota citoģenētiska žāvēšanas kamera:** priekšmetstiklīņa sagatavošanai jāizmanto citoģenētiskā žāvēšanas kamera. Lai nodrošinātu optimālu šūnu parauga sagatavošanu, kamera jādarbina, iestatot aptuveni 25 °C temperatūru un 50% mitrumu. Ja citoģenētiskā žāvēšanas kamera nav pieejama, kā alternatīvu var izmantot gāzu nosūcēju).
2. Iegremdējiet priekšmetstiklīņu 2xSSC šķīdumā istabas temperatūrā uz 2 minūtēm, neveicot maisīšanu.
3. Veiciet dehidrēšanas etanolā sērijas (70%, 85% un 100%), katru 2 minūtes istabas temperatūrā.
4. Ļaujiet nožūt.

### Priekšdenaturēšana

5. Izņemiet zondi no saldētavas un ļaujiet tai sasilt līdz istabas temperatūrai. Pirms mēģeņu lietošanas brīdī tās centrifugējiet.
6. Izmantojot pipeti, pārliecinieties, vai zondes šķīdums ir viendabīgi samaisīts.
7. Paņemiet 10 µl zondes šķīduma katram testam un pārnesiet to uz mikrocentrifūgas mēģeni. Atlikušo zondes šķīdumu nekavējoties ievietojiet atpakal saldētavā.
8. Novietojiet zondi un parauga priekšmetstiklīņu uz sildierīces un veiciet priekšsildīšanu 37 °C (+/- 1 °C) temperatūrā 5 minūtes.
9. Uzlieciet 10 µl zondes maisījuma uz šūnu parauga un rūpīgi uzlieciet segstiklīņu. Hermetizējiet ar gumijas līmi un ļaujiet līmei pilnībā nožūt.

### Denaturēšana

10. Veiciet parauga un zondes vienlaicīgu denaturēšanu, sildot priekšmetstiklīņu uz sildierīces 75 °C (+/- 1 °C) temperatūrā 2 minūtes.

### Hibridizācija

11. Ievietojiet priekšmetstiklīņu gaismu necaurlaidīgā konteinerā ar mitru vidi un atstājiet to 37 °C (+/- 1 °C) temperatūrā līdz nākamajai dienai.

### Skalošana pēc hibridizācijas

12. Izņemiet DAPI no saldētavas un ļaujiet tam sasilt līdz istabas temperatūrai.
13. Noņemiet segstiklīņu un rūpīgi notīriet visas līmes atliekas.
14. Iegremdējiet priekšmetstiklīņu 0,4xSSC (pH 7,0) 72 °C (+/- 1 °C) temperatūrā uz 2 minūtēm netaisot.
15. Noteciniet šķīdumu no priekšmetstiklīņa un iegremdējiet to 2xSSC, 0,05% Tween-20 šķīdumā istabas temperatūrā (pH 7,0) uz 30 sekundēm netaisot.
16. Noteciniet šķīdumu no priekšmetstiklīņa un katram paraugam pievienojiet 10 µl DAPI luminiscences uzturēšanas līdzekli.
17. Uzlieciet segstiklīņu, likvidējiet burbuļus un ļaujiet krāsai tumsā atstāties 10 minūtes.
18. Skatiet luminiscences mikroskopā (sk. **Ieteikumi attiecībā uz luminiscences mikroskopu**).

### Sagatavoto priekšmetstiklīņu stabilitāte

Sagatavotie priekšmetstiklīņi ir analizējami 1 mēneša periodā, ja tiek glabāti tumsā istabas temperatūrā vai par istabas temperatūru zemākā temperatūrā.

### Ieteikumi attiecībā uz procedūru

1. Priekšmetstiklīņu karsēšana vai novecošana var samazināt signāla luminiscenci.
2. Tādu reaģentu izmantošana, kas nav uzņēmuma CytoceLL Ltd. nodrošinātie vai ieteiktie reaģenti, var nelabvēlīgi ietekmēt hibridizācijas apstākļus.
3. Šķīdumu, ūdens vannu un inkubatoru temperatūras mērīšanai jāizmanto kalibrēts termometrs, jo norādītās temperatūras ievērošana ir kritiski svarīga produkta optimālas veikspējas nodrošināšanai.

4. Skalošanas šķīdumu koncentrācijas, pH vērtības un temperatūras vērtības ir svarīgas, jo pārāk lielas pielaišanas gadījumā iespējama nespecifiska sasaiste, savukārt pārāk mazas pielaišanas gadījumā iespējama signāla nepietiekamība.
5. Nepilnīga denaturēšana var izraisīt signāla nepietiekamību, savukārt pārmērīga denaturēšana arī var izraisīt nespecifisku sasaisti.
6. Pārmērīgas hibridizācijas dēļ iespējami papildu vai neparedzēti signāli.
7. Pirms testa izmantošanas diagnostikas nolūkiem lietotājiem ir jāveic protokola optimizācija atbilstoši saviem paraugiem.
8. Ja apstākļi nav pietiekami optimāli, iespējama nespecifiska sasaiste, kas var tikt nepareizi interpretēta kā zondes signāls.

### Rezultātu interpretēšana

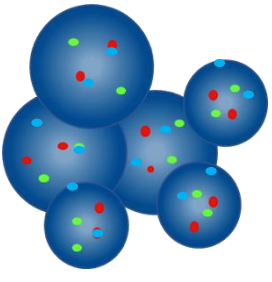
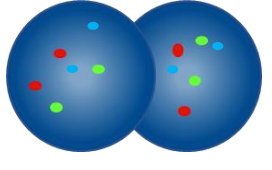
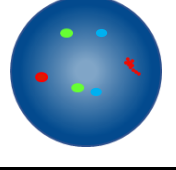
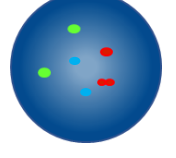
#### Sagatavotā priekšmetstiklīņa ar paraugu kvalitātes novērtēšana

Paraugu nedrīkst analizēt tālāk norādītajos gadījumos.

- Signāli ir pārāk vāji analizēšanai atsevišķos filtros — lai veiktu analīzi, signāliem jābūt spīgtiem, labi izšķiramiem un viegli novērtējamiem.
- Ir daudz salīpušu/pārklājošos šūnu, kas traucē veikt analīzi.
- >50% šūnu nav hibridizētas.
- Starp šūnām atrodas pārāk daudz luminiscējošo daļiņu un/vai luminiscējošs aizmiglojums, kas rada signāla traucējumus, — optimālā priekšmetstiklīņā ar paraugu fonam jābūt tumšam vai melnam un tīram.
- Šūnu kodolu robežas nav izšķiramas un nav veselas.

#### Uz analīzi attiecināmās vadlīnijas

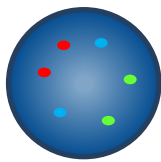
- Katra parauga analīzi un interpretēšanu ir jāveic diviem laboratorijas speciālistiem. Visas neatbilstības ir jānovērš, novērtēšanu veicot trešajam laboratorijas speciālistam.
- Katram laboratorijas speciālistam jābūt attiecīgi kvalificētam atbilstošās spēkā esošajiem valsts līmeņa standartiem.
- Katram laboratorijas speciālistam neatkarīgi jāveic novērtēšana 100 kodoliem no katra parauga. Pirmajam laboratorijas speciālistam jāskatās analīze no priekšmetstiklīņa kreisās puses, savukārt otram laboratorijas speciālistam — no priekšmetstiklīņa labās puses.
- Katram laboratorijas speciālistam jādokumentē savi rezultāti atsevišķās lapās.
- Ir jāanalizē tikai veselī kodoli, nevis pārklājošies kodoli, sablīvējušies kodoli vai kodoli, kurus sedz citoplazmatiskās atliekas vai augsta līmeņa autoluminiscence.
- Jāizvairās no zonām ar pārmērīgu citoplazmatisko atlieku apjomu vai nespecifisku hibridizāciju.
- Signāla intensitāte var būt mainīga, pat vienā kodolā. Šādos gadījumos izmantojiet atsevišķus filtrus un/vai pielāgojiet fokālo plakni.
- Ja apstākļi nav pietiekami optimāli, signāli var šķīst izkliedēti. Ja divi vienādas krāsas signāli savstarpēji saskaras vai attālumš starp tiem nepārsniedz divus signāla platumus, vai arī abus signālus savieno tikko redzams pavediens, šie signāli ir uzskatāmi par vienu signālu.
- Ja pastāv šaubas, vai šūna ir analizējama, neveiciet tās analīzi.

Uz analīzi attiecināmās vadlīnijas	
	Neskaitīt — kodoli atrodas pārāk tuvu viens otram, lai varētu noteikt to robežas
	Neskaitīt pārklājošos kodolus — nav redzamas visas abu kodolu zonas
	Skaitīt kā divus sarkanus signālus, divus zilus signālus un divus zaļus signālus — viens no abiem sarkanajiem signāliem ir difūzs
	Skaitīt kā divus sarkanus signālus, divus zilus signālus un divus zaļus signālus — atstarpe vienā sarkanajā signālā ir mazāka nekā divi signāla platumi

## Paredzamie rezultāti

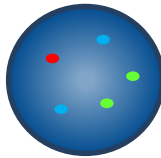
### Zonde D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe

#### Paredzamais normālu signālu modelis

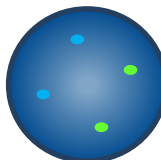


Normālā šūnā ir paredzami divi sarkani, divi zili un divi zaļi signāli (2S, 2Zi, 2Z).

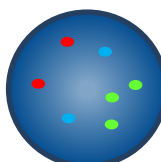
#### Paredzami anormālo signālu modeļi



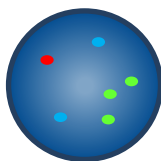
Šūnā ar hemizigotu D13S319 lokusa delēciju paredzamais signālu modelis ir viens sarkans, divi zili un divi zaļi signāli (1S, 2Zi, 2Z).



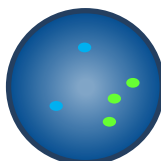
Šūnā ar homozigotu D13S319 lokusa delēciju paredzamais signālu modelis ir divi zili un divi zaļi signāli, bez sarkaniem signāliem (0S, 2Zi, 2Z).



Šūnā ar 12. hromosomas trisomiju un normālu D13S319 statusu paredzamais signālu modelis ir divi sarkani signāli, divi zili signāli un trīs zaļi signāli (2S, 2Zi, 3Z).



Šūnā ar 12. hromosomas trisomiju un hemizigotu D13S319 delēciju paredzamais signālu modelis ir viens sarkans signāls, divi zili signāli un trīs zaļi signāli (1S, 2Zi, 3Z).

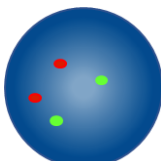


Šūnā ar 12. hromosomas trisomiju un homozigotu D13S319 delēciju paredzamais signālu modelis ir divi zili signāli un trīs zaļi signāli, bez sarkaniem signāliem (0S, 2Zi, 3Z).

Citi signālu modeļi ir iespējami aneiploīdos/nelīdzsvarotos paraugos.

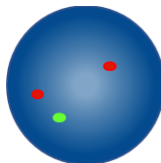
### Zonde P53/ATM Probe

#### Paredzamais normālu signālu modelis

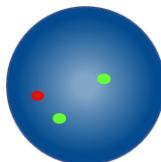


Normālā šūnā ir paredzami divi sarkani un divi zaļi signāli (2S, 2Z).

## Paredzami anormālo signālu modeļi



Šūnā ar ATM delēciju paredzamais signālu modelis ir divi sarkani signāli un viens zaļš signāls (2S, 1Z).



Šūnā ar P53 delēciju paredzamais signālu modelis ir viens sarkans un divi zaļi signāli (1S, 2Z).

Citi signālu modeļi ir iespējami aneiploīdos/nelīdzsvarotos paraugos.

### **Zināmā krusteniskā reakcija**

Zaļā D12Z3 zonde var uzrādīt krustenisko hibridizāciju ar 3c, 6c, 7c un 10c.

### **Ziņošana par nevēlamiem notikumiem**

Ja uzskatāt, ka ir radušies šīs ierīces darbības traucējumi vai tās veikta pējas rādītāji ir pasliktinājušies, iespējami izraisot nelabvēlīgu notikumu (piemēram, novēlotu vai nepareizu diagnozi, novēlotu vai nepiemērotu terapiju), par to nekavējoties jāziņo ražotājam (**e-pasta adrese: vigilance@ogt.com**).

Bar šādu notikumu arī var būt jāziņo kompetentajai iestādei attiecīgajā valstī. Kontaktpersonu medicīnas ierīču kontroles jautājumos saraksts ir atrodams šajā vietnē: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

### **Specifiskās veiktspējas raksturlielumi**

#### **Analitiskais specifiskums**

Analitiskais specifiskums tiek izteikts kā to signālu procentuālā vērtība, kas hibridizējas ar pareizo lokusu un nekādu citu vietu. Analitiskais specifiskums tika noteikts, veicot 200 mērķa lokusu analīzi. Analitiskais specifiskums tika noteikts, luminiscentās in situ hibridizācijas signālu, kas hibridizējās ar pareizo lokusu, skaitu izdalot ar hibridizēto luminiscentās in situ hibridizācijas signālu kopskaitu.

#### 1. tabula Komplekta CLL PROFILERKit analītiskais specifiskums

Komplekts	Zonde	Mērķa lokuss	Ar pareizo lokusu hibridizēto signālu skaits	Hibridizēto signālu kopskaits	Specifiskums (%)
D13S319/ Zonde 13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	Sarkanā D13S319	13q14.2	200	200	100
	Zilā 13qter	13q34	200	200	100
	Zaļa, D12Z3	12p11.1- q11.1	200	200	100
Zonde P53/ATM Probe	Sarkans P53	17p13	200	200	100
	Zaļa ATM	11q22.3	200	200	100

#### **Analitiskais jutīgums**

Analitiskais jutīgums tiek izteikts kā novērtējamu interfāzes šūnu ar paredzamu normālo signālu modeli procentuālā vērtība. Analītiskais jutīgums tika noteikts, analizējot interfāzes šūnas dažādos normālos paraugos. Jutīgums tika aprēķināts kā novērtējamo šūnu ar paredzamo signālu modeli procentuālā vērtība (ar 95% ticamības intervālu).

#### 2. tabula Komplekta CLL PROFILERKit analītiskais jutīgums

Komplekts	Sūnu ar paredzamiem signālu modeļiem skaits	Sūnu ar novērtējamiem signāliem skaits	Jutīgums (%)	95% ticamības intervāls
D13S319/ Zonde 13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	467	500	93,4	2,6
Zonde P53/ATM Probe	479	500	95,8	1,7

#### **Normalitātes robežvērtību raksturojums**

Uz luminiscentās in situ hibridizācijas zondēm attiecināmā normalitātes robežvērtība ir novērtējamu interfāzes šūnu ar specifisku anormālo signālu modeli, ar kādu paraugs ir uzskatāms par normālu attiecībā uz šādu signālu modeli, maksimālā procentuālā vērtība.

Normalitātes robežvērtība tika noteikta, izmantojot paraugus no normāliem un pozitīviem pacientiem. Katram paraugam tika reģistrēti 100 šūnu signālu modeļi. Tika aprēķināts Jūdena indekss, lai noteiktu robežvērtību, kurai ir maksimizēts jutīgums + specifiskums -1.

### 3. tabula Komplekta CLL PROFILER Kit normalitātes robežvērtību raksturojums

Komplekts	Pārkārtojums	Anomālu signālu modelis	Jūdena indekss	Normalitātes robežvērtība (%)
D13S319/ Zonde 13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	D13S319 hemizigota delēcija	1S, 2Zi, 2Z	0,96	6
	12. hromosomas trisomija	2S, 2Zi, 3Z	0,99	4
Zonde P53/ATM Probe	P53 delēcija	1S, 2Z	0,99	8
	ATM delēcija	2S, 1Z	0,99	8

Laboratorijām jāveic robežvērtību verifikācija, izmantojot savus datus<sup>15,16</sup>.

#### Precizitāte un reproducējamība

Precizitāte ir testa dabīgo atšķirību rādītājs, testu atkārtojot vairākas reizes vienādos apstākļos. Šis rādītājs tika noteikts, analizējot atkārtotu viena parauga testēšanu ar zondēm no vienas partijas, vienādos apstākļos un vienā dienā.

Reproducējamība ir testa variabilitātes rādītājs un ir noteikta, ņemot vērā paraugu līmeņa, dienas līmeņa un partijas līmeņa variabilitāti. Dienas līmeņa reproducējamība tika noteikta, analizējot vienus un tos pašus paraugus trīs dažādās dienās. Partijas līmeņa reproducējamība tika noteikta, vienā dienā analizējot vienus un tos pašus paraugus un izmantojot zondes no trīs dažādām partijām. Paraugu līmeņa reproducējamība tika noteikta, analizējot trīs parauga replikātus vienā dienā. Katram paraugam tika reģistrēti 100 interfāzes šūnu signālu modeļi un tika aprēķināta šūnu ar paredzamo signālu modeli procentuālā vērtība.

Reproducējamība un precizitāte tika aprēķinātas kā standartnovirze (Standard Deviation — STDEV) starp replikātiem katram mainīgajam, kā arī vispārējā vidējā STDEV.

### 4. tabula Komplekta CLL PROFILER Kit reproducējamība un precizitāte

Mainīgais	Standartnovirze (STDEV)	
	Zonde D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	Zonde P53/ATM Probe
Precizitāte	1,28	1,37
Paraugu līmeņa	1,30	1,60
Dienas līmeņa	4,12	2,27
Partijas līmeņa	2,04	1,77
Vispārīgā novirze	3,30	1,98

#### Klīniskā veiktspēja

Klīniskā veiktspēja tika noteikta, izmantojot produkta paredzēto populāciju reprezentējošu paraugu. Katram paraugam tika reģistrēti  $\geq 100$  interfāzes šūnu signālu modeļi. Normalitāte/anormalitāte tika noteikta, salīdzinot šūnu ar specifisku anomālo signālu modeli procentuālo vērtību ar normalitātes robežvērtību. Rezultāti pēc tam tika salīdzināti ar zināmo parauga statusu.

Klīnisko datu rezultāti tika analizēti, lai iegūtu jutīguma, specifiskuma un normalitātes vērtības, izmantojot viendimensionālu pieeju.

### 5. tabula Komplekta CLL PROFILER Kit klīniskā veiktspēja

Pārkārtojums	Klīniskais jutīgums (pareizi pozitīvo rezultātu rādītājs (true positive rate — TPR))	Klīniskais specifiskums (pareizi negatīvo rezultātu rādītājs (true negative rate — TNR))	Kļūdaini pozitīvo rezultātu rādītājs (false positive rate — FPR) = 1 – specifiskums
<i>Zonde D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe</i>			
D13S319 delēcija	96,6%	99,5%	0,5%
12. hromosomas trisomija	100%	100,0%	0%
<i>Zonde P53/ATM Probe</i>			
P53 delēcija	100%	100%	0%
ATM delēcija	100%	100%	0%

#### Papildinformācija

Lai saņemtu papildinformāciju par produktu, sazinieties ar CytoCell tehniskā atbalsta nodaļu.

Tālr.: +44 (0)1223 294048

E-pasts: techsupport@cytoCELL.com

Timeklī: www.ogt.com

#### Atsauces

- 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;1-13
- 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, 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.

#### Simbolu skaidrojums

REF	Iv: Kataloga numurs
IVD	Iv: <i>In vitro</i> diagnostikai paredzēta medicīnas ierīce
LOT	Iv: Partijas kods
	Iv: Skatīt lietošanas instrukciju
	Iv: Ražotājs
	Iv: Derīguma termiņš
	Iv: Temperatūras ierobežojums
	Iv: Sargāt no saules gaismas
	Iv: Saturs ir pietiekams <n> testiem
CONT	Iv: Saturs

#### Patenti un preču zīmes

CytoCell ir SIA CytoCell reģistrēta preču zīme.



#### CytoCell Ltd.

Oxford Gene Technology,  
418 Cambridge SciencePark,  
Milton Road,  
Cambridge, CB4 0PZ, Apvienotā Karaliste  
Tālr.: +44(0)1223 294048  
Fakss: +44(0)1223 294986  
E-pasts: probes@cytoCELL.com  
Timeklī: www.ogt.com