



A Sysmex Group Company



Bruksanvisning

REF: LPH 067-S/LPH 067

CLL PROFILER Kit



ENDAST FÖR PROFESSIONELLT BRUK



Mer information och andra språkversioner finns på www.ogt.com

Begränsningar

Produkten används för att upptäcka genomförluster som är större än den region som täcks av de röda och gröna klonerna i denna sonduppsättning vilken innefattar region P53 (TP53), ATM och D13S319, eller genomtillskott som är större än den region som täcks av den blå klonen i denna sonduppsättning vilken innefattar centromeren på kromosom 12. Genomtillskott eller -förluster utanför dessa regioner, eller partiella tillskott eller förluster av dessa regioner, upptäcks inte alltid av denna produkt.

Testet är inte avsett för: fristående diagnostisering, prenatal testning, populationsbaserad screening, patientnära testning eller egentestning. Denna produkt är endast avsedd för professionellt bruk i laboratorium. Alla resultat ska tolkas av kvalificerad personal och med beaktande av andra relevanta testresultat. Produkten har inte validerats för användning på andra provtyper eller sjukdomstyper än dem som den enligt specifikationen är avsedd för.

Rapportering och tolkning av FISH-resultat ska överensstämma med professionell praxis och annan klinisk och diagnostisk information bör beaktas. Detta kit är avsett som komplement till andra diagnostiska laboratorietester och behandling bör inte sättas in enbart på grundval av FISH-resultaten.

Underlåtenhet att följa anvisningarna kan påverka prestanda och medföra falskt positiva/negativa resultat.

Kitet har inte validerats för ändamål som faller utanför den avsedda användning som anges.

Användning som rådgivare

CytoCell CLL PROFILER Kit är ett kvalitativt, icke-automatiserat fluorescerande *in situ*-hybridiseringstest (FISH) som används för att upptäcka kromosomdeletioner i region 11q22.3 på kromosom 11, region 17p13.1 på kromosom 17 eller region 13q14.2-q14.3 på kromosom 13 och/eller tillskott i centromerregionen på kromosom 12 i hematologiskt erhållna celluspensioner fixerade i Carnoy's lösning (3:1 metanol/ättiksyra) från patienter med kronisk lymfatisk leukemi (KLL).

Indikationer

Produkten är avsedd att vara ett komplement till övriga kliniska och histopatologiska undersökningar inom ramen för sedvanlig diagnostik och sjukvård, där kännedom om deletionsstatus för P53 (TP53), ATM eller D13S319 och/eller tillskott i centromeren på kromosom 12 skulle ha betydelse för den kliniska handläggningen.

Principer för testet

In situ-hybridisering med fluorescens (FISH) är en teknik som gör att DNA-sekvenser kan upptäckas på metafaskromosomer eller interfaskärnor från fixerade cytogenetiska prover. Tekniken använder DNA-sonder som hybridiserar till hela kromosomer eller enstaka unika sekvenser och fungerar som ett kraftfullt komplement till cytogenetisk analys med Giemsa-färgning. Denna teknik kan nu tillämpas som ett viktigt undersökningsverktyg vid prenatala och hematologiska kromosomanalyser liksom vid kromosomanalyser av solida tumörer. Mål-DNA kan efter fixering och denaturering hybridisera till en likaledes denaturerad, fluorescensmärkt DNA-sond som har en komplementär sekvens. Efter hybridisering avlägsnas obunden och ospecifikt bunden DNA-probe, och DNA kontrastfärgas för visualisering. Fluorescensmikroskopi synliggör den hybridiserade proben på målmaterialet.

Information om sonden

CytoCell CLL PROFILER Kit används för att upptäcka deletioner av TP53, ATM och D13S319 samt tillskott i centromera gensekvenser på kromosom 12 i perifert blod eller benmärg från patienter med kronisk lymfatisk leukemi (KLL).

P53(TP53)/ATMProbe Combination

Genen TP53 (*tumor protein p53*) på 17p13.1 är en av de viktigaste antionkogenerna. Den fungerar som en kraftfull transkriptionsfaktor och spelar en avgörande roll för att bibehålla genetisk stabilitet. Förlust av TP53 rapporteras hos 10 % av alla patienter med KLL och anses vara den sämsta prognosmarkören vid denna sjukdom^{1,2}.

ATM (*ATM serine/threonine kinase*) på 11q22.3 är en viktig checkpoint-gen som är involverad i hanteringen av cellskada. Dess funktion är att bedöma graden av DNA-skada i cellen och försöka reparera den genom att fosforylera viktiga substrat som är inblandade i svarsreaktionen på DNA-skada³. Förlust av ATM rapporteras hos 18 % av alla patienter med KLL och anses vara en dålig prognosmarkör vid denna sjukdom⁴.

Analys av interaktionen mellan ATM och TP53 vid KLL har påvisat att TP53 och ATM spelar en viktig roll för tillväxten av lymfoid cancer⁵. Det har påvisats att ATM förstärker fosforyleringen av TP53 om skadan blir så stor att cellen måste förstöras via apoptos (som aktiveras av TP53). Deletion av ATM avlägsnar denna kontrollaktivitet och därmed aktiveringen av TP53. Således sker det inga försök att reparera skadade cell eller låta dem genomgå apoptos, trots att TP53 finns närvarande. När ATM saknas tillåts skadade celler att fortsätta föröka sig⁵.

D13S319/13qter/12cen Deletion/Enumeration

Deletioner som påverkar 13q14 är också de vanligaste strukturella genetiska avvikelserna vid kronisk lymfatisk leukemi (KLL)^{6,7,8}. Deletion av denna region är heterozygot hos 30–60 % och homozygot hos 10–20 % av alla KLL-patienter⁹. Överlevnaden har påvisats vara likartad i de två grupperna¹⁰. Patienter med 13q14-deletioner klassificeras som mycket låg risk om inga andra genetiska lesioner föreligger¹.

Två icke-kodande RNA-gener, DLEU1 (*deleted in lymphocytic leukemia 1*) och DLEU2 (*deleted in lymphocytic leukemia 2*), samt den genetiska markören D13S319 sträcker sig över den patogena kritiska regionen i 13q14¹¹. DLEU1 anses vara den mest sannolika KLL-associerade antionkogenkandidaten inom 13q14-regionen¹². Trisomi 12 är en återkommande avvikelse vid KLL som ses i 20 % av fallen¹³ och ofta förekommer som den enda cytogenetiska avvikelserna (40–60 % av fallen med trisomi 12)⁷. Patienter med trisomi 12 klassificeras som låg risk om inga andra genetiska defekter föreligger¹.

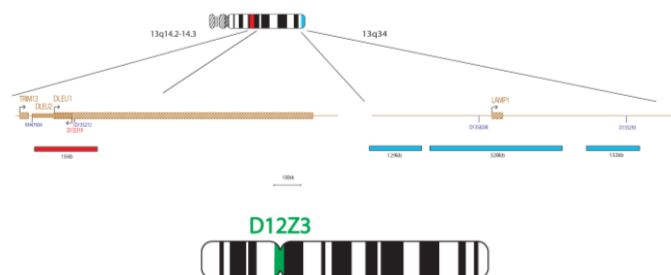
Sondens specifikationer

D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe

D13S319, 13q14.2, röd

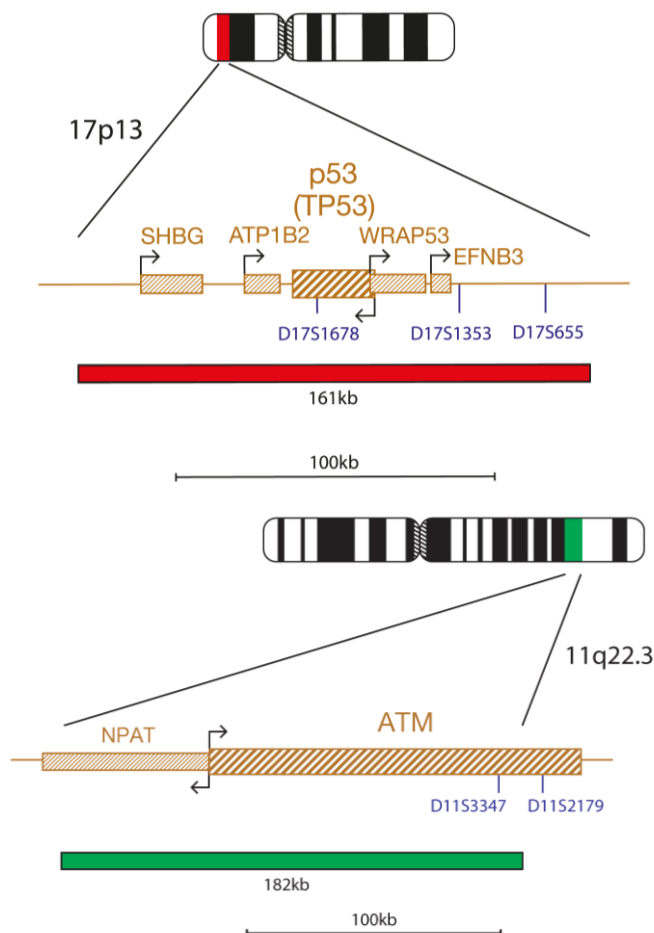
13qter, 13q34, blå

D12Z3, 12p11.1-q11.1, grön



Sonden Chromosome 12 Alpha Satellite Probe är en sond för upprepade sekvenser, märkt med grönt, som känner igen den upprepade centromersekvensen D12Z3. Sonden för D13S319, märkt med rött, täcker en 156 kb stor region som innefattar hela DLEU1-genen och det mesta av DLEU2-genen samt markörerna D13S319, D13S272 och RH47934. Den subtelomerspecifika sonden för 13qter, märkt med blått, möjliggör identifiering av kromosom 13 och fungerar som kontrollsond.

P53 (TP53)/ATM
P53, 17p13.1, röd
ATM, 11q22.3, grön



P53-komponenten består av en sond på 161 kb märkt med rött som täcker hela P53 (TP53)-genen och de omgivande regionerna. ATM-komponenten består av en 182 kb stor sond märkt med grönt och täcker den telomera änden av NPAT-genen och den centromera änden av ATM-genen bortom markören D11S3347.

Material som medföljer

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

50 µl per flaska (5 tester) eller 100 µl per flaska (10 tester)

P53 (TP53)/ATMProbe:

50 µl per flaska (5 tester) eller 100 µl per flaska (10 tester)

Sonderna tillhandahålls förblandade i hybridiseringslösning (formamid, dextransulfat, natriumklorid-natriumcitrat (SSC-buffert)) och är färdiga att användas.

Kontrastfärg: 150 µl per flaska (15 tester)

Kontrastfärgen är DAPI blekningsfri (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol)).

Varningar och försiktighetsåtgärder

1. För *in vitro*-diagnostik. Endast för professionellt bruk.
2. Använd handskar vid hantering av DNA-prober och DAPI-kontrastfärg.
3. Probeblandningarna innehåller formamid som är en teratogen. Undvik inandning av ångorna och hudkontakt. Hantera varsamt. Använd handskar och laboratorierock.
4. DAPI är potentiellt cancerframkallande. Hantera varsamt. Använd handskar och laboratorierock.
5. Kasta allt farligt material enligt institutionens riktlinjer för hantering av riskavfall.
6. Alla användare måste kunna skilja mellan färgerna rött, blått och grönt.
7. Underlåtenhet att följa det föreskrivna protokollet och reagenserna kan påverka prestandan och leda till falskt positiva/negativa resultat.
8. Proben får inte spädas eller blandas med andra prober.
9. Underlåtenhet att använda 10µl sond i protokollsteget före denaturering kan påverka prestandan och leda till falskt positiva/negativa resultat.

Förvaring och hantering



Kitet ska förvaras mellan -25 °C och -15 °C i frysfrys fram till det utgångsdatum som anges på etiketten. Sonden och flaskorna med kontrastfärg måste förvaras mörkt.



Sonden är stabil under frysnings- och upptinningscykler vid normal användning (när en cykel utgörs av att sonden tas ut och sätts tillbaka i frysen) och är fotostabil i upp till 48 timmar efter exponering för kontinuerlig belysning. Undvik noggrant exponering för ljus och temperaturförändringar.

Utrustning och material som behövs men inte medföljer

Utrustningen som används måste vara kalibrerad:

1. Värmeplatta (med en fast platta och exakt temperaturreglering upp till 80 °C)
2. Kalibrerade inställningsbara mikropipetter och spetsar med volym från 1 µl till 200 µl
3. Vattenbad med exakt temperaturreglering vid 37 °C och 72 °C
4. Mikrocentrifugrör (0,5 ml)
5. Fluorescensmikroskop (se avsnittet om rekommendationer för fluorescensmikroskop)
6. Faskontrastmikroskop
7. Rena kyvetter av plast, keramiskt material eller värmeståligt glas
8. Tång
9. Kalibrerad pH-mätare (eller indikatorremsor som mäter pH 6,5–8,0)
10. Behållare med befuktning
11. Immersionsolja för linser till fluorescensmikroskop
12. Bänkcentrifug
13. Objektglas
14. Täckglas 24 x 24 mm
15. Timer
16. 37 °C inkubator
17. Gummilösning
18. Vortexblandare
19. Mätglas
20. Magnetomrörare
21. Kalibrerad termometer

Valfri utrustning som inte medföljer

1. Cytogenetisk torkkammare

Reagenser som behövs men inte medföljer

1. 20 x natriumcitratlösning (SSC)
2. 100 % etanol
3. Tween-20
4. 1 M natriumhydroxid (NaOH)
5. 1 M saltsyra (HCl)
6. Renat vatten

Rekommendation för fluorescensmikroskop

Använd en 100 W kvicksilverlampa eller motsvarande och plana akromatiska objektiv med oljeimmersion 60/63 x eller 100 x för optimal visualisering. De fluoroformer som används i detta probekit framkallas och emitteras vid följande våglängder:

Fluorofor	Excitation _{max} [nm]	Emission _{max} [nm]
Aqua	418	467
Grön	495	521
Röd	596	615

Se till att mikroskopet är försett med rätt excitations- och emissionsfilter för de ovan angivna våglängderna. Använd ett tredubbel bandpassfilter för DAPI/grönt spektrum/rött spektrum eller ett dubbel bandpassfilter för grönt/rött spektrum för optimal samtidig visualisering av de gröna och röda fluoroformerna. Använd ett enkelt bandpassfilter för aquaspektrumet för optimal visualisering av aquaspektrumet, eller ett tredubbel bandpassfilter för rött/grönt/aquafärgat spektrum för samtidig visualisering av de gröna, röda och aquafärgade fluoroformerna.

Kontrollera fluorescensmikroskopet före användning för att säkerställa att det fungerar ordentligt. Använd immersionsolja som är lämplig för fluorescensmikroskopi och har en sammansättning med låg autofluorescens. Undvik att blanda DAPI antifade med immersionsolja för mikroskopet eftersom detta gör signalerna otydliga. Följ tillverkarnas rekommendationer beträffande lampans livslängd och filtrens ålder.

Provbereidning

Kitet är utformat för att användas på celler från perifert blod eller benmärg fixerade i Carnoys lösning (3:1 metanol/ättiksyra) och beredda enligt laboratoriets eller institutionens riktlinjer. Bered lufttorkade prover på objektglas i enlighet med cytogenetiska standardförfaranden. AGT Cytogenetics Laboratory Manual innehåller rekommendationer för provtagning, odling, insamling och montering på objektglas¹⁴.

Lösningsberedning

Etanollösningar

Späd 100-procentig etanol med renat vatten i följande förhållanden och blanda noggrant:

- 70-procentig etanol – 7 delar 100-procentig etanol med 3 delar renat vatten
 - 85-procentig etanol – 8,5 delar 100-procentig etanol med 1,5 delar renat vatten
- Förvara lösningarna upp till 6 månader i rumstemperatur i en lufttätt behållare.

2 x SSC-lösning

Späd 1 del 20 x SSC-lösning med 9 delar renat vatten och blanda noggrant. Kontrollera pH-värdet och justera till 7,0 pH med den mängd NaOH eller HCl som krävs. Förvara lösningen upp till 4 veckor i rumstemperatur i en lufttät behållare.

0,4 x SSC-lösning

Späd 1 del 20 x SSC-lösning med 49 delar renat vatten och blanda noggrant. Kontrollera pH-värdet och justera till 7,0 pH med den mängd NaOH eller HCl som krävs. Förvara lösningen upp till 4 veckor i rumstemperatur i en lufttät behållare.

2 x SSC, 0,05 % Tween-20-lösning

Späd 1 del 20 x SSC-lösning med 9 delar renat vatten. Tillsätt 5 µl Tween-20 per 10 ml och blanda väl. Kontrollera pH-värdet och justera till 7,0 pH med den mängd NaOH eller HCl som krävs. Förvara lösningen upp till 4 veckor i rumstemperatur i en lufttät behållare.

FISH-protokoll

(Obs: Se till att proben och kontrastfärgen aldrig utsätts för mer än begränsat med laboratoriebelysning).

Montering på objektglas

1. Applicera cellprovet på ett objektglas. Låt torka. (Om en cytogenetisk torkkammare används: applicera prov på objektglaset med en cytogenetisk torkkammare. Kammaren ska användas vid cirka 25 °C och 50 % luftfuktighet för optimal applicering av cellprovet. Om en cytogenetisk torkkammare inte finns att tillgå är ett dragskåp ett alternativ.)
2. Lägg objektglaset i 2 x SSC i 2 minuter i rumstemperatur utan att röra det.
3. Dehydrera i tre etanolbad efter varandra (70 %, 85 % och 100 %), vart och ett under 2 minuter i rumstemperatur.
4. Låt torka.

Före denaturering

5. Ta ut sonden ur frysen och låt den värmas till rumstemperatur. Centrifugera rören lätt före användning.
6. Säkerställ att probelösningen är väl blandad med en pipett.
7. Avlägsna 10 µl av proben per test och överför till ett mikrocentrifugrör. Lägg snabbt tillbaka återstående sond i frysen.
8. Låt proben och objektglaset förvärmas på en värmeplatta vid 37 °C (+/- 1 °C) i 5 minuter.
9. Applicera 10 µl av probeblandningen på cellprovet och lägg försiktigt på ett täckglas. Försegla med gummilösning och låt torka helt.

Denaturering

10. Denaturera probet och proben samtidigt genom att värma objektglaset på en värmeplatta vid 75 °C (+/- 1 °C) i 2 minuter.

Hybridisering

11. Lägg objektglaset över natten i en fuktig, ljusstät behållare vid 37 °C (+/- 1 °C).

Tvättar efter hybridisering

12. Ta ut DAPI ur frysen och låt den värmas till rumstemperatur.
13. Ta bort täckglaset och alla spår av lim noggrant.
14. Låt objektglaset ligga i 0,4 x SSC (pH 7,0) vid 72 °C (+/- 1 °C) i 2 minuter utan omrörning.
15. Låt objektglaset rinna av och låt det ligga stilla i 2 x SSC, 0,05 % Tween-20 vid RT (pH 7,0) under 30 sekunder.
16. Låt objektglaset rinna av och applicera 10 µl DAPI antifade på varje prov.
17. Lägg ett täckglas över, avlägsna eventuella bubblor och låt färgen utvecklas i mörker i 10 minuter.
18. Granska i ett fluorescensmikroskop (se **Rekommendationer för fluorescensmikroskop**).

Hållbarhet för färdigmonterade objektglas

Färdigmonterade objektglas är analyserbara i upp till 1 månad om de förvaras i mörker vid eller under rumstemperatur.

Rekommendationer för förbandet

1. Objektglas som har bränts eller åldrats ger en svagare fluorescenssignal
2. Hybridiseringen kan påverkas negativt vid användning av andra reagenser än de som tillhandahålls eller rekommenderas av Cytocell Ltd.
3. Använd en kalibrerad termometer för att mäta temperaturen på lösningar, vattenbad och inkubatorer eftersom dessa temperaturer är avgörande för att produkten ska fungera optimalt.
4. Vätskekoncentration, pH-värden och temperaturer är viktiga eftersom för låg noggrannhet kan leda till icke-specifik bindning av sonden och för hög noggrannhet kan innebära att signalerna uteblir.
5. Ofullständig denaturering kan innebära att signalerna uteblir och överdenaturering kan även leda till icke-specifik bindning.
6. Överhybridisering kan ge extra eller oväntade signaler.
7. Användaren bör optimera protokollet för sina egna prover innan testet används för diagnostik.
8. Bristfälliga förhållanden kan resultera i icke-specifik bindning som kan misstolkas som en sondsignal.

Tolkning av resultaten

Bedömning av objektglasets kvalitet

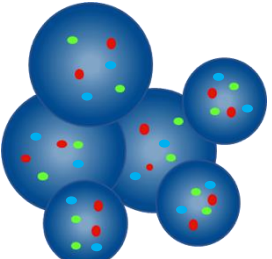
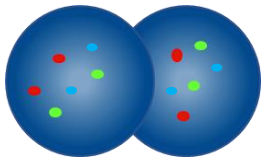
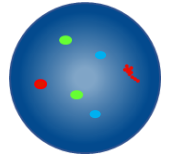
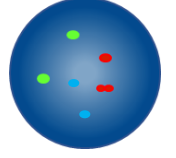
Objektglaset ska inte analyseras i följande fall:

- Signalerna är för svaga för analys i enstaka filter – för att fortsätta analysen ska signalerna framträda klart och tydligt och vara lätta att utvärdera
- Det finns väldigt många hopklumpade/överlappande celler som försvårar analysen
- >50 % av cellerna inte är hybridiserade

- Det finns en stor mängd fluorescerande partiklar mellan cellerna och/eller ett fluorescerande dis som stör signalerna – optimalt ska bakgrunden framstå mörk eller svart och ren
- Cellkärnornas gränser går inte att urskilja och är inte intakta

Riktlinjer för analysen

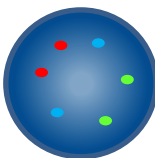
- Två analytiker bör analysera och tolka alla prover. Eventuella avvikelser bör avgöras av en tredje analytiker.
- Alla analytiker ska ha lämpliga kvalifikationer enligt godkänd nationell standard
- Varje analytiker ska oberoende av de andra bedöma 100 kärnor i varje prov. Den första analytikern ska börja från vänster på objektglaset och den andra analytikern från höger
- Varje analytiker ska dokumentera sina resultat på separata papper
- Analysera endast hela kärnor, inte kärnor som är överlappande eller hopklumpade eller täckta av cytoplasmiskt skräp eller har hög grad av autofluorescens
- Undvik områden med stora mängder cytoplasmiskt skräp eller icke-specifik hybridisering
- Signalens intensitet kan variera även med en enskild kärna. Använd i så fall enkla filter och/eller justera fokalplanet
- Vid bristfälliga förhållanden kan signalerna vara otydliga. Om två signaler med samma färg vidrör varandra, om avståndet mellan dem är högst två signalbredder eller om en tunn sträng förenar de båda signalerna ska de betraktas som en signal
- Om det finns tvivel om huruvida en cell går att analysera eller inte, låt bli att analysera den

Riktlinjer för analysen	
	Räkna inte – kärnorna ligger för nära varandra för att avgränsningarna ska kunna bedömas.
	Räkna inte överlappande kärnor – alla områden i båda kärnor kan inte ses.
	Räkna som två röda, två blå och två gröna signaler – en av de två röda signalerna är diffus.
	Räkna som två röda, två blå och två gröna signaler – mellanrummet i en av de röda signalerna är mindre än två signalbredder.

Förväntade resultat

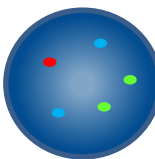
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe

Förväntat normalt signalmönster

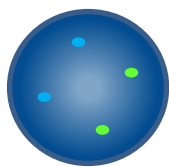


I en normal cell förväntas två röda, två blå och två gröna signaler (2R, 2B, 2G).

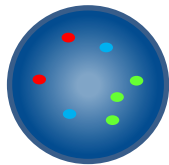
Förväntade onormala signalmönster



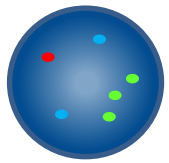
I en cell med en hemizygot deletion av D13S319-locus är det förväntade signalmönstret en röd, två blå och två gröna signaler (1R, 2B, 2G).



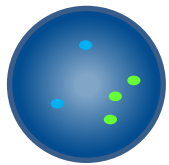
I en cell med en homozygot deletion av D13S319-locus är det förväntade signalmönstret ingen röd, två blå och två gröna signaler (0R, 2B, 2G).



I en cell med trisomi 12 och normal D13S319 är det förväntade signalmönstret två röda, två blå och tre gröna signaler (2R, 2B, 3G).



I en cell med trisomi 12 och hemizygot deletion av D13S319 är det förväntade signalmönstret en röd, två blå och tre gröna signaler (1R, 2B, 3G).

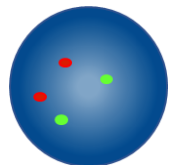


I en cell med trisomi 12 och homozygot deletion av D13S319 är det förväntade signalmönstret ingen röd, två blå och tre gröna signaler (0R, 2B, 3G).

Andra signalmönster är möjliga i aneuploida/oregelbundna prover.

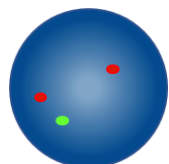
P53/ATM-sond

Förväntat normalt signalmönster

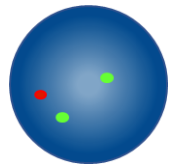


I en normal cell förväntas två röda och två gröna signaler (2R, 2G).

Förväntade onormala signalmönster



I en cell med en ATM-deletion är det förväntade signalmönstret två röda och en grön signal (2R, 1G).



I en cell med en P53-deletion är det förväntade signalmönstret en röd och två gröna signaler (1R, 2G).

Andra signalmönster är möjliga i aneuploida/oregelbundna prover.

Känd korsreaktivitet

Den gröna D12Z3-sonden kan korshybridisera med 3c, 6c, 7c och 10c.

Rapportering av oönskade händelser

Om du tror att denna produkt har fungerat dåligt eller att dess prestanda har försämrats och att detta har bidragit till en oönskad händelse (t.ex. försenad eller

felaktig diagnos, försenad eller felaktig behandling) ska detta omedelbart rapporteras till tillverkaren (**e-post**: vigilance@ogt.com).

I tillämpliga fall ska händelsen även rapporteras till behörig nationell myndighet. En förteckning över kontaktpunkter för säkerhetsövervakning finns på <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Specifika prestanda

Analytisk specificitet

Analytisk specificitet är den procentandel signaler som hybridiserar till rätt locus och ingen annan plats. Den analytiska specificiteten fastställdes genom analys av 200 mållokus. Den analytiska specificiteten beräknades som antalet FISH-signalerna som hybridiserade till rätt locus dividerat med det totala antalet hybridiserade FISH-signalerna.

Tabell 1. Analytisk specificitet för CLL PROFILER Kit

Kit	Sond	Mållocus	Antal signaler hybridiserade till rätt locus	Totalt antal hybridiserade signaler	Specificitet (%)
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	Röd D13S319	13q14.2	200	200	100
	Blå 13qter	13q34	200	200	100
	Grön D12Z3	12p11.1-q11.1	200	200	100
P53/ATM-sond	Röd P53	17p13	200	200	100
	Grön ATM	11q22.3	200	200	100

Analytisk sensitivitet

Analytisk sensitivitet är den procentandel bedömningsbara interfasceller som har det förväntade normala signalmönstret. Den analytiska sensitiviteten fastställdes genom analys av interfasceller i olika normala prover. Sensitiviteten beräknades som den procentandel bedömningsbara celler som hade det förväntade signalmönstret (med 95 % konfidensintervall).

Tabell 2. Analytisk sensitivitet för CLL PROFILER Kit

Kit	Antal celler med förväntat signalmönster	Antal celler med bedömningsbara signaler	Sensitivitet (%)	95 % konfidensintervall
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	467	500	93,4	2,6
P53/ATM-sond	479	500	95,8	1,7

Beskrivning av normala cut-off-värden

Det normala cutoff-värdet i samband med FISH-prober är högsta procentandelen bedömningsbara interfasceller med ett specifikt onormalt signalmönster där ett prov anses normalt för det signalmönstret.

Det normala cutoff-värdet fastställdes med hjälp av prover från normala och positiva patienter. För varje prov registrerades signalmönstret i 100 celler. Youden-index beräknades för att finna tröskelvärdet vid vilket sensitivitet + specificitet - 1 är maximal.

Tabell 3. Beskrivning av normala cut-off-värden för CLL PROFILER Kit

Kit	Rearrangemang	Onormalt signalmönster	Youden-index	Normalt cut-off-värde (%)
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	D13S319 hemizygot deletion	1R, 2B, 2G	0,96	6
	Trisomi 12	2R, 2B, 3G	0,99	4
P53/ATM-sond	P53-deletion	1R, 2G	0,99	8
	ATM-deletion	2R, 1G	0,99	8

Laboratorierna måste verifiera cut-off-värden med hjälp av sina egna data^{15,16}.

Precision och reproducerbarhet

Precision är ett mått på den naturliga variationen för ett test som upprepas flera gånger under samma förhållanden. Denna bedömdes genom upprepade analyser av probe med samma lotnummer som testades på samma prov under samma förhållanden på samma dag.

Reproducerbarhet är ett mått på variabiliteten hos ett test och har fastställts beträffande variabiliteten från prov till prov, dag till dag och tillverkningsatts till tillverkningsatts. Reproducerbarheten från dag till dag bedömdes genom analys av DS214/CE-sv v008.00/2020-12-01 (H040 v5/H041 v5/H073 v2/H074 v2)

samma prover på tre olika dagar. Reproducerbarheten från tillverkningsatts till tillverkningsatts bedömdes genom analys på samma dag av samma prover med användning av prover från tre olika tillverkningsatts. Reproducerbarheten från prov till prov bedömdes genom analys av tre upprepningar av ett prov samma dag. För varje prov registrerades signalmönstren hos 100 interfasceller, och antalet celler i procent med det förväntade signalmönstret beräknades.

Reproducerbarheten och precisionen beräknades som standardavvikelsen (STDEV) mellan kopian av varje variabel och det generella medelvärdet för STDEV.

Tabell 4. Reproducerbarhet och precision för CLL PROFILER Kit

Variabel	Standardavvikelse (STDEV)	
	D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	P53/ATM-sond
Precision	1,28	1,37
Prov till prov	1,30	1,60
Dag till dag	4,12	2,27
Tillverkningsatts till tillverkningsatts	2,04	1,77
Generell avvikelse	3.30	1.98

Kliniska prestanda

Kliniska prestanda fastställdes med ett representativt stickprov från målpopulationen för produkten. För varje prov registrerades signalmönstren för ≥ 100 interfasceller. En bestämning av normalt/onormalt gjordes genom jämförelse mellan procentandelen celler med det specifika onormala signalmönstret och det normala cut-off-värdet. Resultaten jämfördes sedan med provets kända status.

Resultaten från kliniska data analyserades i syfte att få fram värdena för sensitivitet, specificitet och cut-off genom ett endimensionellt förfarande.

Tabell 5. Kliniska prestanda för CLL PROFILER Kit

Rearrangemang	Klinisk sensitivitet (sant positivt resultat, TPR)	Klinisk specificitet (sant negativt resultat, TNR)	Falskt positivt resultat (FPR) = 1 – specificitet
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe			
D13S319-deletion	96,6%	99,5%	0,5%
Trisomi 12	100%	100,0%	0%
P53/ATM-sond			
P53-deletion	100%	100%	0%
ATM-deletion	100%	100%	0%

Mer information

För ytterligare information om produkten, kontakta CytoCells tekniska support.
Tfn: +44 (0) 1223 294048
E-post: techsupport@cytozell.com
Hemsida: www.ogt.com

Referenser

- 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
- Puiggras *et al.*, Biomed Res Int 2014;1-13
- Kasar *et al.*, Nature Communications 2015;6:1-12
- Hammarlund 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.

Teckenförklaringar

REF	sv: Katalognummer
IVD	sv: Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik
LOT	sv: Kod för tillverkningsattsen
	sv: Se bruksanvisningen
	sv: Tillverkare
	sv: Används före-datum
	sv: Temperaturgräns
	sv: Skyddas mot solljus
	sv: Innehållet räcker till <n> tester
CONT	sv: Innehåll

Patent och varumärken

CytoCell är ett registrerat varumärke som tillhör Cytozell Ltd.



Cytozell Ltd.
Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, UK
Tfn: +44 (0) 1223 294048
Fax: +44 (0) 1223 294986
E-post: probes@cytozell.com
Hemsida: www.ogt.com