



A Sysmex Group Company



## Kasutusjuhend

REF: LPH 067-S / LPH 067

## CLL PROFILER komplekt



AINULT ERIALASEKS KASUTAMISEKS



www.cytoCELL.com

Lisateave ja muud keeled on saadaval aadressil [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

### Piirangud

Seade on loodud tuvastama genoomilisi kadusid, mis on suuremad kui sondikomplekti punase ja rohelise kloni kaetudpiirkond, mis sisaldab P53 (TP53), ATM ja D13S319 piirkondi, või lisasid, mis on suuremad kui sondikomplekti sinise kloni kaetud piirkond, mis sisaldab 12. kromosoomi tsentromeeri. Piirkonnast väljapoole jäävaid genoomilisi lisasid/kadusid või piirkondade osalisi lisasid/kadusid ei pruugita selle tootega tuvastada.

See analüüs pole ette nähtud kasutamiseks iseseisva diagnostilise vahendina, prenataalseks analüüsimiseks, populatsioonipõhiseks skriininguks, patsiendilähedaseks analüüsimiseks või iseendal analüüsimiseks. See toode on ette nähtud vaid erialaseks laboratoorseks kasutamiseks; kõiki tulemusi tuleks tõlgendada vastava väljaõppega personali poolt võttes arvesse teisi asjakohaseid analüüsitulemusi.

Seda toodet ei ole valideeritud kasutamiseks muude proovitüüpide ega haigustüüpide korral, kui ainult nende, mis on kasutusotstarbes täpsustatud.

FISH-i tulemuste tõlgendamine ja teavitamine peab vastama erialastele kutsesstandarditele ja peaks arvesse võtma muud kliinilist ja diagnostilist teavet. See komplekt on ette nähtud muude laboratoorsete analüüside täiendamiseks ja ravi ei tohiks alustada, põhinedes vaid FISH-i tulemustel.

Protokoll järgimata jätmine võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/negatiivseid tulemusi.

Seda komplekti ei ole valideeritud kasutamiseks muul kui kasutusotstarbes esitatud eesmärgil.

### Kasutusotstarve

CytoCell CLL PROFILER komplekt on kvalitatiivne, mitteautomaatne, fluorestsents *in situ* hübriidatsiooni (FISH) uuring, mida kasutatakse 11. kromosoomi 11q22.3 piirkonna, 17. kromosoomi 17p31.1 piirkonna või 13. kromosoomi 13q14.2–q14.3 piirkonna kromosomaalsete deletsioonide ja/või 12. kromosoomi tsentromeeri piirkonna lisade tuvastamiseks Carnoy lahuses (3:1 metanool/atseetaap) fikseeritud hematoloogilist tuletatud rakususpensioonides, mis pärinevad kinnitatud või kahtlustatud kroonilise lümfotsütaarse leukeemiaga (CLL) patsientidelt.

### Näidustused

See toode on loodud täiendusena teistele kliinilistele ja histopatoloogilistele uuringutele tunnustatud diagnostilistes ja kliinilistes raviteedes, kus teadmised P53 (TP53), ATM-i deletsiooni või D13S319 deletsiooni oleku ja/või 12. kromosoomi tsentromeeri lisa kohta on kliinilise ravi seisukohalt olulised.

### Analüüsi põhimõte

Fluorestsents *in situ* hübriidatsiooni (FISH) on meetod DNA järjestuste tuvastamiseks metafasi kromosoomides või fikseeritud tsütogeneetiliste proovide interfasi tuumades. Meetod kasutab DNA sonde, mis hübriidseeritakse kogu kromosoomi või üksiku unikaalse järjestusega ning toimib G-vöödi tsütogeneetiliste analüüside võimeka täiendusena. Seda meetodit saab nüüd rakendada prenataalse, hematoloogilise ja tahke kasvaja kromosomaalse analüüsi esmatahtsa uuringu tööriistana. Fikseeritud ja denatureeritud sihtmärk-DNA on saadaval sarnase denatureeritud, fluorestsentsmarkeriga DNA sondiga paardumiseks, millel on komplementaarne järjestus. Peale hübriidseerimist eemaldatakse seondumata ja ebaspetsiifiliselt seotud DNA sond ning DNA visualiseeritakse vastandvärvimisega. Seejärel võimaldab fluorestsentsmikroskoopia hübriidseeritud sondi visualiseerimist sihtmärkmaterjalil.

### Sondi teave

CytoCell CLL PROFILER komplekt on loodud tuvastama TP53, ATM-i ja D13S319 deletsioone ning 12. kromosoomi tsentromeeri järjestuste lisasid perifeerse vere või luuüdi proovides, mis pärinevad kroonilise lümfotsütaarse leukeemiaga (CLL) patsientidelt.

### Sond P53(TP53)/ATMProbe Combination

TP53 (*tuumorivalk p53*) geen asukohas 17p13.1 on üks olulisemaid tuumorsupressorgeene. See toimib tugeva transkriptsioonifaktorina, millel on põhiline roll geneetilise stabiilsuse säilitamisel. TP53 kadu on leitud 10% CLL-ga patsiendil ja seda peetakse haiguse halvima prognoosiga markeriks<sup>1,2</sup>.

ATM (*ATM-i seriini/treonini kinaas*) geen asukohas 11q22.3 on oluline kontrollgeen, mis on seotud rakukahjustuse kontrollimisega. Selle funktsioon on hinnata raku DNA kahjustuse taset ja üritada kahjustusi parandada, fosforüüldes põhisubstraate, mis osalevad DNA kahjustuse signaalirajas<sup>3</sup>. ATM-ikadu on leitud 18% CLL-ga patsiendil ja seda peetakse haiguse halvima prognoosiga markeriks<sup>4</sup>.

ATM/TP53 interaktsiooni analüüs CLL-i korral on näidanud, et TP53 ja ATM mängivad olulist rolli lümfoidse vähi proliferatsioonis<sup>3</sup>. On näidatud, et ATM parandab TP53 fosforüülimist, kui kahjustus on sellise ulatusega, et rakk tuleb apoptoosi teel hävitada (mida vahendab TP53). ATM-i deletsioon eemaldab selle kontrolltegevuse ja seega TP53 aktivatsiooni. Seega puudub katse kahjustatud rakke parandada või apoptoosi juhtida, vaatamata TP53 olemasolule. ATM-i puudumisel jätkub kahjustatud rakkude proliferatsioon<sup>5</sup>.

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

13q14 mõjutavad deletsioonid on samuti kõige sagedasemad kroonilise lümfotsütaarse leukeemia (CLL) struktuursed geneetilised aberratsioonid<sup>6,7,8</sup>. On leitud, et piirkonnas on heterosügootne deletsioon 30–60% ja homosügootne deletsioon 10–20% KLL-ga patsientidest<sup>9</sup>. Elulemus on mõlemas rühmas sarnane<sup>10</sup>. 13q14 deletsioonidega patsiendid on klassifikatsiooni järgi väga madal riskiga ilma muude geneetiliste kahjustuteta<sup>1</sup>.

Patogeenne kriitiline 13q14 piirkond hõlmab kahte mittekodeerivat RNA-geeni DLEU1 (*deleted in lymphocytic leukemia 1*) ja DLEU2 (*deleted in lymphocytic leukemia 2*) pluss geneetilist markerit D13S319<sup>11</sup>. DLEU1 peetakse kõige tõenäolisemaks CLL-ga seotud kandidaat-tuumorsupressorgeenis 13q14 piirkonnas<sup>12</sup>. 12. trisoomia on rekurrentne kõrvalekalle CLL-ga ja seda esineb 20% juhtudest<sup>13</sup> ning sageli avaldub see kordumatu tsütogeneetilise aberratsioonina (40–60% 12. trisoomia juhtudest)<sup>7</sup>. 12. trisoomiaga patsiendid on klassifikatsiooni järgi madal riskiga ilma muude geneetiliste kahjustuteta<sup>1</sup>.

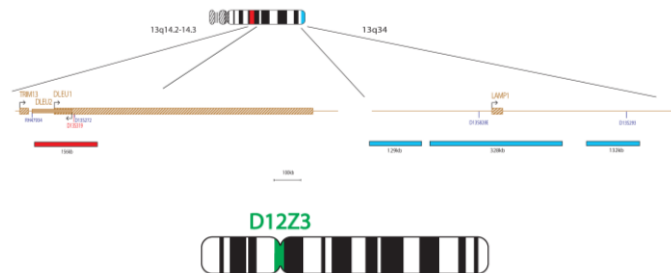
### Sondi spetsifikatsioon

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

D13S319, 13q14.2, punane

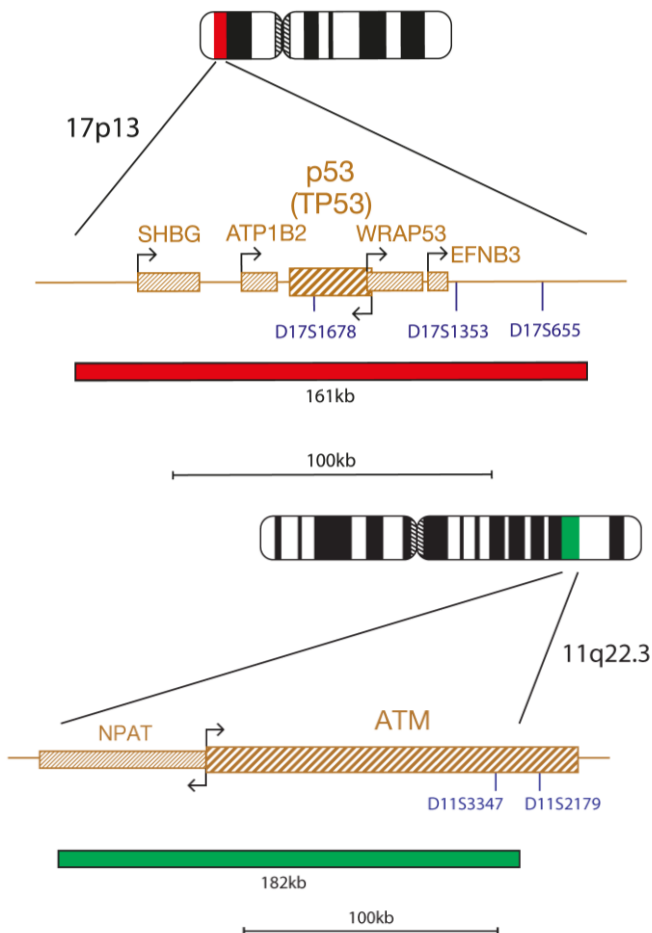
13qter, 13q34, sinine

D12Z3, 12p11.1-q11.1, roheline



Sond Chromosome 12 Alpha Satellite Probe on rohelisega märgistatud korduva järjestuse sond, mis tuvastab tsentromeerse korduvajärjestuse D12Z3. Punasega märgistatud D13S319 sond hõlmab 156 kb piirkonda, mis sisaldab kogu DLEU1 geeni ja suuremat osa DLEU2 geenist ja markereid D13S319, D13S272 ja RH47934. Sinisega märgistatud 13qter subtelomeeri spetsiifiline sond võimaldab tuvastada 13. kromosoomi ja toimib kontrollsondina.

**P53 (TP53)/ATM**  
P53, 17p13.1, punane  
ATM, 11q22.3, roheline



P53 komponent sisaldab kogu P53 (TP53) geeni ja piirnevaid piirkondi hõlmavat punasega märgistatud 161 kb sondi. ATM-i komponent sisaldab 182 roheline märgistatud sondi, mis hõlmab NPAT geeni telomeerset otsa ja ATM geeni tsentromeerset otsa markerist D11S3347 kaugemale.

#### Tarnitavad materjalid

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

50 µl viali kohta (5 analüüsi) või 100 µl viali kohta (10 analüüsi)

##### **Sond P53 (TP53)/ATM Probe:**

50 µl viali kohta (5 analüüsi) või 100 µl viali kohta (10 analüüsi)

Sondid tarnitakse hübriidiseerimislahusega eelsegatuna (formamid, dekstraansulfaat; naatriumsitraadi soolalahus (saline-sodium citrate, SSC)) ja on valmis kasutamiseks.

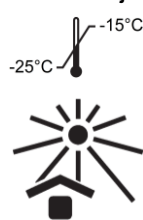
#### Vastandvärv 150 µl viali kohta (15 analüüsi)

Vastandvärv on DAPI, pleekimisvastane (Sisaldus: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenüülnodol).

#### Hoiatused ja ettevaatusabinõud

1. *In vitro* diagnostiliseks kasutamiseks. Ainult erialaseks kasutamiseks.
2. DNA sondide ja DAPI vastandvärv käsitsemisel kandke kindaid.
3. Sondi segud sisaldavad formamiidi, mis on teratogeenne; ärge hingake sisse auru ning vältige kontakti nahaga. Käsitsege ettevaatlikult; kasutage kindaid ja laborikitlit.
4. DAPI on potentsiaalne kartsinogeen. Käsitsege ettevaatlikult; kasutage kindaid ja laborikitlit.
5. Vabanee kõrgist ohtlikest jäätmest oma asutuse ohtlike jäätmete käitlemise eeskirjade kohaselt.
6. Kasutajad peavad olema suutelised eristama punast, sinist ja rohelist värvi.
7. Esitatud protokoll ja reaktiivide järgimata jätmise võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.
8. Sondi ei tohiks lahjendada ega segada teiste sondidega.
9. Sondi 10µl kasutamata jätmise protokoll denatüreerimiseelses etapis võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.

#### Säilitamine ja käsitsemine



Komplekti tuleks säilitada külmutatuna temperatuurivahemikus -25...-15 °C kuni kehtivusaaja lõpuni, mis on esitatud toote etiketil. Sondi ja vastandvärv viale tuleb säilitada pimedas.

Sond säilitab stabiilsuse normaalse kasutamise ajal esinevate sulatamise ja külmutamise tsüklite kestel (kus üks tsüklil kestab sondi eemaldamisest külmikust kuni sinna tagasipanekuni) ja on fotostabiilne kuni 48 tundi peale pideva valgusega kokkupuudet. Piirake iga hinna eest kokkupuudet valgusega ja temperatuurimuutustega.

#### Seadmed ja materjalid mis on vajalikud, kuid mida ei tarnita

Kasutada tuleb kalibreeritud seadmeid.

1. Kuumutusplaat (täisplaadi ja täpse temperatuuriregulaatoriga kuni 80 °C)
2. Kalibreeritud erineva mahuga mikropipetid ja otsikud vahemikus 1–200 µl
3. Vesivann, täpse temperatuuriregulaatoriga 37 °C ja 72 °C juures
4. Mikrotsentrifugi katsutid (0,5 ml)
5. Fluorestsentsmikroskoop (vt fluorestsentsmikroskoobi soovitusete lõiku)
6. Faasikontrastmikroskoop
7. Läbipaistvast plastist, keraamilised või kuumakindlast klaasist Coplin anumad
8. Pintsetid
9. Kalibreeritud pH-meeter (või pH indikaatorribad vahemikus pH 6,5–8,0)
10. Niiskuskamber
11. Fluorestsentsmikroskoobi immersioonõli
12. Tsentrifuug
13. Mikroskoobi alusklaid
14. 24x24 mm katteklaid
15. Taimer
16. 37 °C inkubaator
17. Katteklasi liim
18. Vortex-segisti
19. Gradueeritud silindrid
20. Magnetsegisti
21. Kalibreeritud termomeeter

#### Valikulised seadmed, mida ei tarnita

1. Tsütogeneetiline kuivatuskamber

#### Vajalikud reaktiivid, mida ei tarnita

1. 20-kordne naatriumsitraadi soolalahus (SSC)
2. 100%-line etanool
3. Tween-20
4. 1M naatriumhüdroksiid (NaOH)
5. 1M vesinikkloriid (HCl)
6. Destilleeritud vesi

#### Fluorestsentsmikroskoobi soovitus

Kasutage optimaalseks visualiseerimiseks 100-vatist elavhõbelampi või sellega samaväärset ning immersioonõliga apokromaatsset objektivi 60/63-kordse või 100-kordse suurendusega. Selles sondi kompleksis kasutatud fluorfoorid aktiveeruvad ja emiteerivad järgnevatel lainepikkustel:

Fluorfoor	Eksitatsioon <sub>max</sub> [nm]	Emissioon <sub>max</sub> [nm]
Sinine	418	467
Roheline	495	521
Punane	596	615

Veenduge, et asjakohased eksitatsiooni- ja emissioonfiltrid, mis hõlmavad eespool esitatud lainepikkusi, on mikroskoopi paigaldatud. Kasutage kolme spektri läbilaskevõimega DAPI/roheline spektri/punase spektri filtrit või kahe spektri läbilaskevõimega roheline spektri/punase spektri filtrit roheline ja punase fluorfoori samaaegseks optimaalseks visualiseerimiseks. Kasutage ühe sinise spektri läbilaskevõimega filtrit sinise spektri optimaalseks visualiseerimiseks või kolme spektri läbilaskevõimega punase spektri/roheline spektri/sinise spektri filtrit roheline, punase ja sinise fluorfoori samaaegseks visualiseerimiseks.

Kontrollige enne kasutamist fluorestsentsmikroskoopi, et veenduda selle korrasolekus. Kasutage immersioonõli, mis on fluorestsentsmikroskoopi jaoks sobiv ja on madala autofluorestsentsiga. Vältige pleekimisvastase DAPI segamist immersioonõliga, kuna see segab signaali. Järgige tootja soovitusi lambi tööea ja filtrite vanuse kohta.

#### Proovi ettevalmistamine

Komplekt on loodud kasutamiseks perifeersete vererakkude või luuüdirakkudega, mis on fikseeritud Carnoy lahuses (3:1 metanool/atseetahape) ja ette valmistatud vastavalt labori või asutuse eeskirjadele. Valmistage ette õhu käes kuivatatud mikroskoobi alusklaid vastavalt tsütogeneetika standardprotseduuridele. AGT *Tsütogeneetika laborijuhend* sisaldab soovitusi proovi kogumise, kultuuri istutamise, kogumise ja slaidi tegemise kohta<sup>14</sup>.

#### Lahuse ettevalmistamine

##### **Etanooli lahused**

Lahjendage 100%-line etanool destilleeritud veega, jälgides suhtarvu ja põhjalikult segades.

- 70%-line etanool – 7 osa 100%-list etanooli suhtes 3 osa destilleeritud vett
  - 85%-line etanool – 8,5 osa 100%-list etanooli suhtes 1,5 osa destilleeritud vett
- Säilitage lahuseid kuni 6 kuud toatemperatuuril õhukindlas nõus.

#### 2x SSC lahuse

DS214/CE-et v008.00/2020-12-01 (H040 v5 / H041 v5 / H073 v2 / H074 v2)

Lahjendage 1 osa 20-kordset SSC lahust 9 osa destilleeritud veega ja segage põhjalikult. Kontrollige pH-d ja kohandage, kuni pH on 7,0, kasutades NaOH või HCl vastavalt vajadusele. Säilitage lahust kuni 4 nädalat toatemperatuuril õhukindlas nõus.

#### 0,4 x SSC lahust

Lahjendage 1 osa 20-kordset SSC lahust 49 osa destilleeritud veega ja segage põhjalikult. Kontrollige pH-d ja kohandage, kuni pH on 7,0, kasutades NaOH või HCl vastavalt vajadusele. Säilitage lahust kuni 4 nädalat toatemperatuuril õhukindlas nõus.

#### 2x SSC, 0,05% Tween-20 lahust

Lahjendage 1 osa 20-kordset SSC lahust 9 osa destilleeritud veega. Lisage 5 µl Tween-20 10 ml kohta ja segage põhjalikult. Kontrollige pH-d ja kohandage, kuni pH on 7,0, kasutades NaOH või HCl vastavalt vajadusele. Säilitage lahust kuni 4 nädalat toatemperatuuril õhukindlas nõus.

#### FISH-i protokoll

(Märkus. Veenduge, et sondi ja vastandvärvi kokkupuude labori valgustusega oleks kogu aeg piiratud).

#### Slaidi ettevalmistamine

- Tilgutage rakuproov mikroskoobi klaasist alusklaasile. Laske kuivada. **(Valikuline, kui kasutatakse tsütogeneetilist kuivatuskambrit:** slaidid tuleks valmistada tsütogeneetilist kuivatuskambrit kasutades. Optimaalseks slaidi valmistamiseks tuleks kambrit kasutada temperatuuril ligikaudu 25 °C ja õhuniiskusel 50%. (Kui tsütogeneetiline kuivatuskamber ei ole kättesaadav, kasutage alternatiivina tõmbekappi).
- Kastke slaidid toatemperatuuril 2 minutiks 2-kordsesse SSC lahusesse ilma segamata.
- Dehüdreerige etanoolilahuste seerias (70%, 85% ja 100%), igas 2 minutit toatemperatuuril.
- Laske kuivada.

#### Enne denaturatsiooni

- Eemaldage sond külmikust ja laske sel soojeneda toatemperatuurile. Tsentrifugeerige katsuteid lühidalt enne kasutamist.
- Veenduge, et sondi lahus on ühtlaselt segunenud, kasutades pipetti.
- Eemaldage 10 µl sondi analüüsi kohta ja viige see mikrotsentrifuug katsutisse üle. Tagastage ülejäänud sond kiiresti külmikusse.
- Asetage sond ja proovislaid 5 minutiks kuumutusplaadile eelsoojenema temperatuurile 37 °C (+/-1 °C).
- Tilgutage 10 µl sondisegu rakuproovile ja asetage ettevaatlikult katteklasi. Lisage katteklasi liim ja laske liimil täielikult kuivada.

#### Denaturatsioon

- Denatureerige proov ja sond üheaegselt, kuumutades slaidi kuumutusplaadil temperatuuril 75 °C (+/-1 °C) 2 minutit.

#### Hübridisatsioon

- Asetage slaid niiskesse valguskindlasse kambris temperatuurile 37 °C (+/-1 °C), laske seista üleöö.

#### Hübridisatsioonijärgsed pesud

- Eemaldage DAPI külmikust ja laske soojeneda toatemperatuurile.
- Eemaldage ettevaatlikult katteklasiid ja kõik liimijäljed.
- Kastke slaidid 2 minutiks ilma segamata 0,4-kordsesse SSC lahusesse (pH 7,0) temperatuuril 72 °C (+/-1 °C).
- Kuivatage slaid ja kastke see 30 sekundiks ilma segamata 2-kordsesse SSC lahusesse, 0,05% Tween-20 lahusesse, toatemperatuuril (pH 7,0).
- Kuivatage slaid ja lisage igale proovile 10 µl pleekimisvastast DAPI-d.
- Katke katteklasi, eemaldage mullid ja laske värvil pimedas kujuneda 10 minutit.
- Vaadake fluorestsentsmikroskoobiga (vt **Fluorestsentsmikroskoobi soovitus**).

#### Valmis slaidide stabiilsus

Valmis slaidid on analüüsivad kuni 1 kuu, kui neid hoitakse pimedas toatemperatuuril või alla selle.

#### Protseduuri soovitus

- Slaidide keetmine või aegumine võib fluorestsentssignaali nõrgendada.
- CytoCell Ltd poolt toodetud või soovitatud reaktiivide asemel muude reaktiivide kasutamine võib ebasoodsalt mõjutada hübridiseerimistingimusi
- Kasutage lahuste, vesivannide ja inkubaatorite temperatuuri mõõtmisel kalibreeritud termomeetrit, sest need temperatuurid on toote optimaalseks toimimiseks kriitilise tähtsusega.
- Pesukontsentratsioonid, pH ja temperatuurid on olulised, kuna vähene rangus võib põhjustada sondi ebaspetsiifilist sidumist ja liiga suur rangus võib põhjustada signaali puudumist
- Mittetäielik denatureerimine võib põhjustada signaali puudumist ja üleliigne denatureerimine võib samuti põhjustada ebaspetsiifilist seondumist
- Üleliigne hübridiseerimine võib põhjustada täiendavaid või ootamatuid signaale
- Kasutajad peaksid enne analüüsi kasutamist diagnostilisel eesmärgil protokoll oma proovidega optimeerima
- Suboptimaalsed tingimused võivad põhjustada ebaspetsiifilist seondumist, mida võidakse ekslikult sondi signaalina tõlgendada

#### Tulemuste tõlgendamine

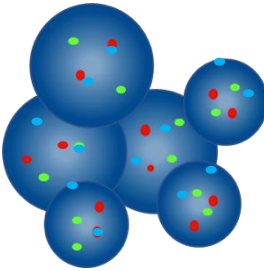
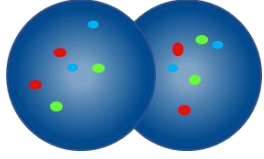
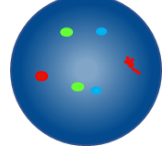
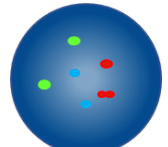
#### Slaidi kvaliteedi hindamine

Slaidi ei tohiks analüüsida, kui

- signaalid on ühe filtriga analüüsimiseks liiga nõrgad – analüüsi jätkamiseks peaksid signaalid olema eredad, selged ja lihtsalt hinnatavad;
- liiga palju kokkukleepunud/kattuvaid rakke segavad analüüsimist;
- üle 50% rakkudest pole hübridiseeritud;
- rakkude vahel on üleliigsed fluorestsentsosakesed ja/või fluorestsentshüü, mis segab signaali – optimaalsetel slaididel peaks taust tunduma tume või must ja puhas;
- rakutuuma piire ei saa eristada ja need pole terviklikud.

#### Analüüsi eeskirjad

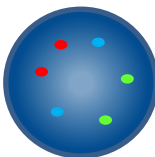
- Igat proovi peaks analüüsima ja tõlgendama kaks analüütikut. Kõik lahkevused tuleks lahendada kolmanda analüütiku hinnanguga
- Analüütikud peaks olema riiklikult tunnustatud standardite kohase väljaõppega.
- Iga analüütik peaks hindama eraldi 100 tuuma iga proovi kohta. Esimene analüütik peaks alustama slaidi vasakult küljelt ja teine analüütik paremat küljelt.
- Iga analüütik peaks oma tulemused üles märkima eraldi andmekandjale.
- Analüüsige vaid terviklikke tuumi, mitte kattuvaid või kokkukleepunud või tsütoplasma jääkidega kaetud ega autofluorestsereivaid tuumi.
- Vältige alasid, kus esineb liigseid tsütoplasma jääke või ebaspetsiifilist hübridiseerimist.
- Signaali tugevus võib vahelduda, isegi ühe tuuma piires. Sellistel juhtudel kasutage üksikfiltrid ja/või kohandage fokaaltasandit.
- Suboptimaalsete tingimuste korral võivad signaalid hajuda. Kui kaks sama värvi signaali puutuvad kokku või nendevaheline kaugus on väiksem kui kaks signaalipikkust või signaale ühendab ähmane niit, lugege signaalid üheks.
- Kui kahtlete, kas proov on analüüsimiseks sobiv, siis ärge analüüsige seda.

Analüüsi eeskirjad	
	Mitte lugeda, kui tuumad on piiride määramiseks üksteisele liiga lähedal
	Mitte lugeda kattuvaid tuumasid, sest mõlema tuumi kõik alasid ei ole näha
	Lugeda kahe punase signaalina, kahe sinise signaalina ja kahe rohelise signaalina, kui üks kahest punasest signalist on difuusne
	Lugeda kahe punase signaalina, kahe sinise signaalina ja kahe rohelise signaalina, kui ühe punase signaali tühimik on kahest signaalipikkusest väiksem

#### Eeldatavad tulemused

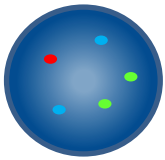
Sond D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe

Eeldatav normaalne signaalimuster

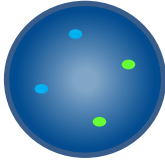


Normaalse raku eeldatav tulemus on kaks punast, kaks sinist ja kaks rohelist signaali (2P, 2S, 2R).

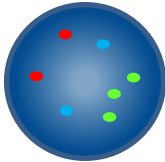
#### Eeldatavad ebanormaalsed signaalimustrid



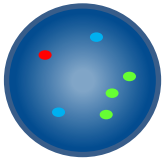
D13S319 lookuse hemisügootse deletsiooniga rakus on eeldatav signaalimuster üks punane, kaks sinist ja kaks rohelist signaali (1P, 2S, 2R).



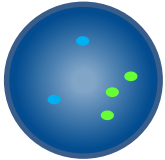
D13S319 lookuse homosügootse deletsiooniga rakus on eeldatav signaalimuster null punast, kaks sinist ja kaks rohelist signaali (0P, 2S, 2R).



12. trisoomiaga ja normaalse D13S319 olekuga rakus on eeldatav signaalimuster kaks punast, kaks sinist ja kolm rohelist signaali (2P, 2S, 3R).



12. trisoomiaga ja D13S319 hemisügootse deletsiooniga rakus on eeldatav signaalimuster üks punane, kaks sinist ja kolm rohelist signaali (1P, 2S, 3R).

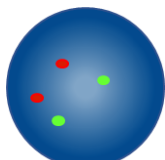


12. trisoomiaga ja D13S319 homosügootse deletsiooniga rakus on eeldatav signaalimuster puuduv punane, kaks sinist ja kolm rohelist signaali (0P, 2S, 3R).

Aneuploidsete/tasakaalustamata proovides võivad esineda teised signaalimustrid.

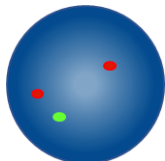
#### Sond P53/ATM Probe

Eeldatav normaalne signaalimuster

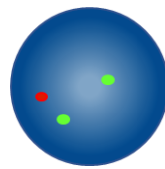


Normaalse raku eeldatav tulemus on kaks punast ja kaks rohelist signaali (2P, 2R).

Eeldatavad ebanormalsed signaalimustrid



ATM-i deletsiooniga rakus on eeldatav signaalimuster kaks punast ja üks roheline signaal (2P, 1R).



P53 deletsiooniga rakus on eeldatav signaalimuster üks punane ja kaks rohelist signaali (1P, 2R).

Aneuploidsete/tasakaalustamata proovides võivad esineda teised signaalimustrid.

#### Teadaolev ristreaktiivsus

Roheline D12Z3 sond võib näidata ristiühendiseid 3c, 6c, 7c ja 10c suhtes.

#### Kõrvalnähtudest teatamine

Kui usute, et see toode ei toimi või selle toimivus on halvenenud ning selle toimel võis esineda kõrvalnäht (nt hilinevad või valediagnoos, hilinevad või ebasobiv ravi), tuleb sellest tootjat kohe teavitada (**email**: vigilance@ogt.com).

Kui see on kohandatav, tuleks sündmusest teavitada riiklikule pädevale asutusele. Pädevate ametiasutuste loend on esitatud lehel: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

#### Spetsiifilised toimivuskarakteristikud

##### Analüütiline spetsiifilisus

Analüütiline spetsiifilisus on vaid õige lookusega hübriidiseeritud signaalide protsent. Analüütiline spetsiifilisus saavutati kokku 200 sihtmärk-lockuse analüüsimisel. Analüütiline spetsiifilisus arvatati, jagades õige lookusega hübriidiseeritud FISH-i signaalide arvu kogu hübriidiseeritud FISH-i signaali arvuga.

Tabel 1. Sondikomplekti CLL PROFILER analüütiline spetsiifilisus

Komplekt	Sond	Sihtmärklookus	Õige lookusega hübriidiseeritud signaalide arv	Hübriidiseeritud signaalide koguarv	Spetsiifilisus (%)
D13S319/ 13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	Punane D13S319	13q14.2	200	200	100
	Sinine 13qter	13q34	200	200	100
	Roheline D12Z3	12p11.1– q11.1	200	200	100
Sond P53/ATM Probe	Punane P53	17p13	200	200	100
	Roheline ATM	11q22.3	200	200	100

##### Analüütiline tundlikkus

Analüütiline tundlikkus on hinnatavate interfaasi rakkude protsent eeldatava normaalse signaalimustri suhtes. Analüütiline tundlikkus saavutati interfaasi rakkude analüüsimisel erinevates normaalsetes proovides. Tundlikkus arvatati hinnatavate rakkude ja eeldatava signaalimustri protsentsuhtena (95%-lise usaldusvahemikuga).

Tabel 2. Sondikomplekti CLL PROFILER analüütiline tundlikkus

Komplekt	Eeldatava signaalimustri rakkude arv	Hinnatava signaaliga rakkude arv	Tundlikkus (%)	95% usaldusvahemik
D13S319/ 13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	467	500	93,4	2,6
Sond P53/ATM Probe	479	500	95,8	1,7

##### Normaalse väljaarvamise piirväärtuste kirjeldus

FISH-i sondidega seotud normaalse väljaarvamise piirväärtus on hinnatavate, teatud ebanormaalse signaalimustri interfaasi rakkude suurim protsent, mille juures proov hinnatakse normaalseks.

Normaalne väljaarvamise piirväärtus saavutati, kasutades normaalsete ja positiivsete patsientide proove. Iga proovi kohta salvestati 100 raku signaalimustrid. Arvatati Youdeni koefitsient, et leida läviväärtus, mille korral Tundlikkus + Spetsiifilisus-1 on maksimaalne.



Tabel 3. Sondikomplekti CLL *PROFILER* normaalse väljaarvamise piirväärtuste kirjeldus

Komplekt	Ümberkorraldus	Ebanormaalne signaalimuster	Youden koefitsient	Normaalne väljaarvamise piir (%)
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	D13S319 hemisügootne deletsioon	1P, 2S, 2R	0,96	6
	12. trisoomia	2P, 2S, 3R	0,99	4
Sond P53/ATM Probe	P53 deletsioon	1P, 2R	0,99	8
	ATM-i deletsioon	2P, 1R	0,99	8

Laborid peavad oma andmete põhjal väljaarvamise piiri kinnitama<sup>15,16</sup>.

#### Täpsus ja reprodutseeritavus

Täpsus on analüüsi loomulik varieeruvus korduvalt, samades tingimustes läbiviimisel. Seda hinnati, analüüsides sama partiumbriga sondi kordusanalüüse samal proovil, samades tingimustes, samal päeval.

Reprodutseeritavus on analüüsi varieeruvus ja see saavutatakse, hinnates varieeruvust proov-prooviga, päev-päevaga ja partii-partiiga. Päev-päevaga reprodutseeritavust hinnati sama proovi analüüsimisel kolmel erineval päeval. Partii-partiiga reprodutseeritavust hinnati ühe proovi ühe sondi kolme erineva partiiga analüüsimisel samal päeval. Proov-prooviga reprodutseeritavust hinnati proovi kolme replikaadi analüüsimisel samal päeval. Iga proovi kohta salvestati 100 interfaasi raku signaalimuster ja arutati eeldatava signaalimustriga rakkude protsent.

Reprodutseeritavus ja täpsus arvutati replikaatide vahelise standardhälvena (SH) iga muutuja kohta ning üldise keskmise SH suhtarvuna.

Tabel 4. Sondikomplekti CLL *PROFILER* reprodutseeritavus ja täpsus

Muutuja	Standardhälve (SH)	
	Sond D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	Sond P53/ATM Probe
Täpsus	1,28	1,37
Proov-prooviga	1,30	1,60
Päev-päevaga	4,12	2,27
Partii-partiiga	2,04	1,77
Hälve	3,30	1,98

#### Kliiniline toime

Kliiniline toime saavutati toote sihtgrupi esindusproovil. Iga proovi kohta salvestati ≥ 100 interfaasi raku signaalimustrid. Normaalne/ebanormaalne hinnang anti, võrreldes teatud ebanormaalse signaalimustriga rakkude protsenti normaalse väljaarvamise piirväärtusega. Siis võrreldi tulemusi proovi teadadeva olekuga.

Kliiniliste andmete tulemused analüüsiti selleks, et saavutada tundlikkus, spetsiifilisus ja väljaarvamise piirväärtused ühemõttelise meetodiga.

Tabel 5. Sondikomplekti CLL *PROFILER* kliiniline toime

Ümberkorraldus	Kliiniline tundlikkus (tõeselt positiivsete määr) (true positive rate, TPR)	Kliiniline spetsiifilisus (tõeselt negatiivsete määr) (true negative rate, TNR)	Valepositiivsete määr (false positive rate, FPR) = 1 – spetsiifilisus
Sond D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe			
D13S319 deletsioon	96,6%	99,5%	0,5%
12. trisoomia	100%	100,0%	0%
Sond P53/ATM Probe			
P53 deletsioon	100%	100%	0%
ATM-i deletsioon	100%	100%	0%

#### Lisateave

Lisateavet saate kontakteerudes ettevõtte CytoCell tehnilise toe osakonnaga.

Tel: +44 (0)1223 294048

E-mail: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

#### Viited

- 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.

#### Sümbolite seletus

REF	et: Kataloogi number
IVD	et: <i>In vitro</i> diagnostiline meditsiiniseade
LOT	et: Partii number
	et: Vt kasutusjuhised
	et: Tootja
	et: Kõlblik kuni
	et: Temperatuuripiirang
	et: Hoidke päikesevalguse eest kaitstult
	et: Sisaldus piisav <n> analüüsi jaoks
CONT	et: Sisu

#### Patendid ja kaubamärgid

CytoCell on CytoCELL Ltd registreeritud kaubamärk.

#### CytoCELL Ltd.

Oxford Gene Technology,  
418 Cambridge Science Park,  
Milton Road,  
Cambridge, CB4 0PZ, UK  
Tel: +44(0)1223 294048  
Faks: +44(0)1223 294986  
E-mail: probes@cytoCELL.com  
W: www.ogt.com

