



A Sysmex Group Company



## Käyttöohje

REF: LPH 066-S / LPH 066

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



VAIN AMMATTIKÄYTTÖÖN



www.cytocell.com

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

#### Rajoitukset

Tämä laite on suunniteltu havaitsemaan genomien puutteita suuremmalta alueelta kuin tämän koetin sarjan D13S319-kloonin kattama alue tai lisääntymisiä alueelta, joka on suurempi kuin tämän koetin sarjan D12Z3-kloonin kattama alue, johon sisältyy kromosomin 12 sentromeeri. Tämä tuote ei ehkä havaitse kyseisten alueiden ulkopuolisia genomien lisäyksiä/puutteita tai osittaisia lisääntymisiä/puuttumista.

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

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

FISH-tulosten raportoinnin ja tulkinnan on oltava yhdenmukainen ammattimaisten käytäntöstandardien kanssa, ja niissä on otettava huomioon muut kliiniset ja diagnostiset tiedot. Sarja on tarkoitettu muiden diagnostisten laboratoriostien apuvälineeksi, eikä hoitoa saa käynnistää yksinomaan FISH-tuloksen perusteella.

Mikäli protokollaa ei noudateta, se saattaa vaikuttaa suorituskykyyn ja johtaa virheellisiin positiivisiin/negatiivisiin tuloksiin.

Tätä sarjaa ei ole validoitu mainitusta aiotusta käyttötarkoituksesta poikkeavaan käyttöön.

#### Aiottu käyttötarkoitus

CytoCell D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe -koetin on kvalitatiivinen, ei-automatisoitu FISH (fluorescence *in situ* hybridisation) -testi, jota käytetään kromosomien deleetioiden havaitsemiseen kromosomin 13 alueella 13q14.2-q14.3 ja/tai lisääntymisen havaitsemiseen kromosomin 12 sentromeerisellä alueella Carnoy'n liuokseen (3:1 metanoli/etikkahappo) fiksoiduille, hematologisesti johdetuille solususpensioille potilailta, joilla on vahvistettu tai epäilty krooninen lymfaattinen leukemia (CLL).

#### Käyttöaiheet

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

#### Testin periaatteet

Fluoresenssi *in situ* -hybridisaatio (FISH) on tekniikka, jonka avulla DNA-sekvenssejä voidaan havaita metafaseikromosomeista tai fiksoitujen sytogeneettisten näytteiden interfaasitumista. Tekniikassa käytetään DNA-koettimia, joiden avulla hybridisaatio koskee kokonaisia kromosomeja tai yksittäisiä, ainutkertaisia sekvenssejä ja jotka toimivat tehokkaana sytogeneettisen G-raita-analyysin apuvälineenä. Tätä tekniikkaa voidaan nyt käyttää olennaisena tutkimustyökaluna raskauden aikaiseen, hematologiseen ja kiinteiden tumorien kromosomianalyysiin. Kohde-DNA on fiksaation ja denaturaation jälkeen saatavilla palautumiseksi samalla tavoin denaturoituun, fluoresenssimerkittyyn DNA-koettimeen, jolla on täydentävä sekvenssi. Hybridisaation jälkeen sitomaton ja muu kuin spesifisesti sidottu DNA-koetin poistetaan, ja DNA vastavärijätään

visualisointia varten. Sen jälkeen hybridisoitu koetin voidaan visualisoida fluoresenssimikroskopian avulla kohdemateriaalissa.

#### Koettimen tiedot

Raitaan 13q14 vaikuttavia deleetioita ja kromosomin 12 trisomia tavataan usein kroonisessa lymfaattisessa leukemiassa (CLL).

Deleetiot, jotka vaikuttavat alueeseen 13q14, ovat myös yleisin rakenteellinen geneettinen poikkeama kroonisessa lymfaattisessa leukemiassa (CLL)<sup>1,2,3</sup>. Alueen todetaan olevan heterotsygoottisesti deleetoinut 30–60 prosentilla ja homotsygoottisesti deleetoinut 10–20 prosentilla CLL-potilaista<sup>4</sup>. Eloonjäämisprosentin on todettu olevan samanlainen kummallakin potilasryhmällä<sup>5</sup>. Potilaat, joilla on 13q14-deleetioita, on luokiteltu hyvin pienen riskin potilaiksi, ellei heillä ole muita geneettisiä vaurioita<sup>6</sup>.

Kaksi ei-koodittavaa RNA-geeniä, DLEU1 (*deleetoinut lymfaattisessa leukemiassa 1*) ja DLEU2 (*deleetoinut lymfaattisessa leukemiassa 2*), sekä geneettinen markkeri D13S319, kattavat 13q14:n patogeenisen kriittisen alueen<sup>7</sup>. DLEU1-geeniä pidetään todennäköisempänä CLL-leukemiaan liittyvänä ehdokastuumorisuppressorigeeninä 13q14-alueella<sup>8</sup>.

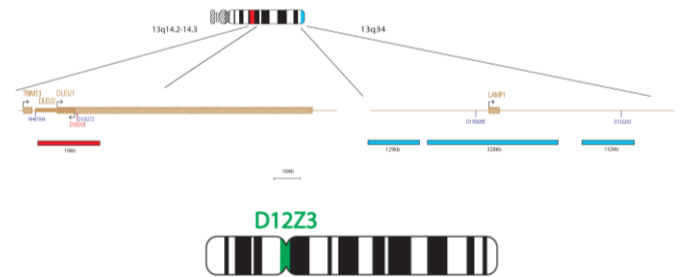
12-trisomia on usein tavattu poikkeavuus CLL-potilailla, ja sitä tavataan 20 prosentissa tapauksia<sup>9</sup>. Se esiintyy usein ainoana sytogeneettisenä poikkeavuutena (40–60 prosentissa 12-trisomian tapauksista)<sup>2</sup>. Potilaiden, joilla on 12-trisomia, riski luokitellaan vähäiseksi, ellei muita geneettisiä leesioita ole<sup>6</sup>.

#### Koettimen tekniset tiedot

D13S319, 13q14.2 – q14.3, punainen

13qter, 13q34, sininen

D12Z3, 12p11.1-q11.1, vihreä



Chromosome 12 Alpha Satellite -koetin on leimattu vihreällä, ja se tunnistaa sentromeerisen toistosekvenssin D12Z3. D13S319-koetin koostuu punaisella leimatusta 156 kb:n koetimesta, joka kattaa DLEU1:n sentromeerisen pään ja sisältää suurimman osan DLEU2-geenistä. Se myös kattaa D13S319- ja D13S272-markkerit. Sinisellä leimattu 13qter-subtelomeerikohtainen koetin mahdollistaa kromosomin 13 tunnistamisen ja toimii kontrollikoettimena.

#### Toimitettavat materiaalit

**Koetin:** 50 µl pulloa kohti (5 testiä) tai 100 µl pulloa kohti (10 testiä)

Koettimet toimitetaan ennalta sekoitettuna hybridisaatioliuokseen (formamidi, dekstraanisulfaatti, suolaliuos-natriumsitraatti (SSC)), ja ne ovat valmiita käytettäväksi.

**Vastaväri:** 150 µl pulloa kohti (15 testiä)

Vastaväri on DAPI häipymistä ehkäisevä (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenyyli-indoli)).

#### Varoitukset ja varoimet

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

## Säilytys ja käsittely



Sarjaa on säilytettävä pakastimessa  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ...  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ :n lämpötilassa sarjan etiketissä ilmoitettuun eräpäivään saakka. Koetinta ja vastaväripulloja on säilytettävä pimeässä.



Koetin pysyy vakaana normaalissa käytössä ilmenevien pakastus- ja sulatusjaksojen ajan (jolloin yhden jakson aikana koetin poistetaan pakastimesta ja laitetaan takaisin pakastimeen), ja se on fotostabiili jopa 48 tuntia altistuttuaan jatkuville valaistusolosuhteille. On ryhdyttävä kaikkiin mahdollisiin toimenpiteisiin valolle ja lämpötilan muutoksille altistumisen rajoittamiseksi.

## Laitteisto ja materiaalit Tarvitvat mutta pakkaukseen sisällymättömät

Kalibroituja laitteistoja on käytettävä:

1. Lämpölevy (kiinteällä levyllä ja tarkalla lämpötilan hallinnalla  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ :n lämpötilaan saakka)
2. Kalibroidut tilavuudeltaan vaihtelevat mikropipetit ja kärjet, 1–200  $\mu\text{l}$
3. Vesikylypy tarkalla lämpötilan hallinnalla  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ :n ja  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ :n lämpötilassa
4. Mikrosentrifugiletkut (0,5 ml)
5. Fluoresenssimikroskoopi (katso Fluoresenssimikroskooppisuositus-osio)
6. Vaihekontrastimikroskoopi
7. Coplin-purkit puhdasta muovista, keramiikkaa tai lämmönkestävää lasia
8. Pihdit
9. Kalibroitu pH-mittari (tai pH-indikaattoriliuskat, joilla voidaan mitata 6,5–8,0:n pH-arvo)
10. Kostutettu säiliö
11. Fluoresenssiluokan mikroskooppilinnin immersioöljy
12. Työpöytäseentrifugi
13. Mikroskooppiobjekttilasi
14. 24 x24 mm:n peitelasit
15. Ajustin
16.  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ :n inkubaattori
17. Kumiliuosliima
18. Pyörresekoitin
19. Mittasylinterit
20. Magneettinen sekoitin
21. Kalibroitu lämpömittari

## Valinnainen laitteisto, ei sisälly pakkaukseen

1. Sytogeneettinen kuivauskammio

## Tarvitvat reagenssit, jotka eivät sisälly pakkaukseen

1. 20x suolaliuos-natriumsitraattiliuos (SSC)
2. 100 % etanolia
3. Tween-20
4. 1M natriumhydroksidi (NaOH)
5. 1M suolahappo (HCl)
6. Akkuvesi

## Fluoresenssimikroskooppisuositus

Käytä 100 watin elohopealampua tai vastaavaa ja öljyimmersiosuunnitelman 60/63x- tai 100x-apokromaattiohjelmia parhaaseen mahdolliseen visualisointiin. Tässä koetinsarjassa käytettävät loisteaineet virittyvät ja säteilevät seuraavilla aaltopituuksilla:

| Loisteaine | Viritysmaks [nm] | Emissiomaks [nm] |
|------------|------------------|------------------|
| Sininen    | 418              | 467              |
| Vihreä     | 495              | 521              |
| Punainen   | 596              | 615              |

Varmista, että mikroskooppiin on sovitettu asianmukaiset viritys- ja emissiosuodattimet, jotka kattavat yllä luettellut aallonpituudet. Käytä DAPI-/vihreän spektrin/punaisen spektrin kolmoiskaistanpäästösuoatinta tai vihreän spektrin/punaisen spektrin kaksoiskaistanpäästösuoatinta vihreän ja punaisen loisteaineen optimaaliseen samanaikaiseen visualisointiin. Käytä sinisen spektrin yksinkertaista kaistanpäästösuoatinta sinisen spektrin optimaaliseen visualisointiin tai punaisen spektrin/vihreän spektrin/sinisen spektrin kolmoiskaistanpäästösuoatinta vihreän, punaisen ja sinisen loisteaineen samanaikaiseen visualisointiin.

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

## Näytteen valmistelu

Sarja on suunniteltu käytettäväksi hematologisesti johdettuihin solususpensioihin, jotka on fiksatoitu Carnoy'n liuosfiksatiiviiin (3:1 metanoli/etikahappo), jotka on valmistettu laboratorion tai laitoksen suuntaviivojen mukaisesti. Valmistele ilmakuivatut näytteet mikroskoopin objektiivilaseille sytogeneettisten vakio-toimenpiteiden mukaisesti. AGT-sytogenetiikkalaboratorion opaskirja sisältää suosituksia näytteen keräämisestä, viljelystä, poiminnasta ja objektiivilasian valmistelusta<sup>10</sup>.

## Liuksen valmistus

### Etanoliliuokset

Laimenna 100 % etanoli akkuviedellä seuraavissa suhteissa ja sekoita huolellisesti:

- 70 % etanolia – 7 osaa 100 % etanolia ja 3 osaa akkuvettä
- 85 % etanolia – 8,5 osaa 100 % etanolia ja 1,5 osaa akkuvettä

Säilytä liuosta enintään 6 kuukautta huoneenlämpötilassa ilmatiiviissä säiliössä.

### 2 x SSC-liuosta

Laimenna 1 osa 20 x SSC-liuosta 9 osaan akkuvettä ja sekoita huolellisesti.

Tarkista pH ja säädä pH-arvoon 7,0 käyttäen natriumhydroksidia tai vetykloridia tarpeen mukaan. Säilytä liuosta enintään 4 viikkoa huoneenlämpötilassa ilmatiiviissä säiliössä.

### 0,4 x SSC-liuos

Laimenna 1 osa 20 x SSC-liuosta 49 osaan akkuvettä ja sekoita huolellisesti.

Tarkista pH ja säädä pH-arvoon 7,0 käyttäen natriumhydroksidia tai vetykloridia tarpeen mukaan. Säilytä liuosta enintään 4 viikkoa huoneenlämpötilassa ilmatiiviissä säiliössä.

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

Laimenna 1 osa 20 x SSC-liuosta 9 osaan akkuvettä. Lisää 5  $\mu\text{l}$  Tween-20-liuosta

10 ml kohti ja sekoita huolellisesti. Tarkista pH ja säädä pH-arvoon 7,0 käyttäen natriumhydroksidia tai vetykloridia tarpeen mukaan. Säilytä liuosta enintään 4 viikkoa huoneenlämpötilassa ilmatiiviissä säiliössä.

## FISH-protokolla

(Huomautus: Varmista, että koettimen ja vastavärin altistuminen laboratoriovalolle on aina rajallista).

### Objektiivilasin valmistelu

1. Laita pisara solunäytettä mikroskooppiobjekttilasille. Anna kuivua. (Vaihtoehtoisesti, jos käytetään sytogeneettistä kuivauskammioita: mikroskooppiobjekttilaseille on asetettava pisara näytettä sytogeneettisen kuivauskammion avulla. Kammiota on käytettävä noin  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ :n lämpötilassa ja 50 %:n kosteudessa, jotta solunäytepisara voidaan asettaa optimaalisesti lasille. Mikäli sytogeneettistä kuivauskammioita ei ole saatavilla, käytä vaihtoehtoisesti vetokaappia).
2. Upota objektiivilasi 2 x SSC-liuokseen 2 minuutiksi huoneenlämpötilassa ravistamatta.
3. Kuivaa kutakin etanolisarjassa (70 %, 85 % ja 100 %) 2 minuuttia huoneenlämpötilassa.
4. Anna kuivua.

### Esidenaturaatio

5. Poista koetin pakastimesta ja anna sen lämmitä huoneenlämpötilaan. Sentrifugoi putkia lyhyen aikaa ennen käyttöä.
6. Varmista, että koetinliuos on sekoitettu yhtenäisesti pipetillä.
7. Poista 10  $\mu\text{l}$  koetinta testiä kohti ja siirrä se mikrosentrifugiputkeen. Palauta jäljelle jäänyt koetin nopeasti pakastimeen.
8. Aseta koetin ja näyteobjektiivilasi esilämpimään  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ :n (+/-  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) lämpölevylle 5 minuutiksi.
9. Laita 10  $\mu\text{l}$  koetinseosta solunäyteelle ja aseta peitelasi varoen paikalleen. Sulje kumiliuosliimalla ja anna liiman kuivua täysin.

### Denaturaatio

10. Denaturoi näyte ja koetin samanaikaisesti kuumentamalla objektiivilasia lämpölevyllä 2 minuutin ajan  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ :n (+/-  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) lämpötilaan.

### Hybridisaatio

11. Laita objektiivilasi yöksi kosteaan valonkestävään säiliöön  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ :n (+/-  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) lämpötilaan.

### Hybridisaation jälkeiset pesut

12. Poista DAPI pakastimesta ja anna sen lämmitä huoneenlämpötilaan.
13. Poista peitelasi ja kaikki liimajäljet huolellisesti.
14. Upota objektiivilasi 0,4 x SSC-liuokseen (pH 7,0) 2 minuutiksi  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ :n (+/-  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) lämpötilassa ravistamatta.
15. Tyhjennä objektiivilasi ja upota se 30 sekunniksi 2 x SSC-liuokseen ja 0,05 % Tween-20-liuokseen huoneenlämpötilassa (pH 7,0) ravistamatta.
16. Tyhjennä objektiivilasi ja laita kuhunkin näytteeseen 10  $\mu\text{l}$  häipymistä ehkäisevää DAPIa.
17. Peitä peitelasilla, poista mahdolliset kuplat ja anna värin kehittyä pimeässä 10 minuuttia.
18. Tarkastele fluoresenssimikroskoopilla (Katso Fluoresenssimikroskooppisuositus).

### Valmiiden objektiivilasiensa vakaus

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

### Toimenpidesuosituksukset

1. Objektiivilasiensa sintraaminen tai ikäännyttäminen saattaa heikentää signaalien fluoresenssia
2. Muiden kuin CytoCELL Ltd -yhtiön toimittamien tai suosittelemien reagenssien käyttö saattaa vaikuttaa haitallisesti hybridisaatio-olosuhteisiin.
3. Käytä liuosten, vesikylypyjen ja inkubaattorien lämpötilojen mittaukseen kalibroituja lämpömittaria, sillä nämä lämpötilat ovat ratkaisevan tärkeitä tuotteen optimaalisen suorituskyvyn kannalta.
4. Pesupitoisuudet, pH-arvo ja lämpötilat ovat tärkeitä, sillä liiallinen löyhyyys saattaa johtaa koettimen epäspesifiseen sitoutumiseen ja liiallinen ankaruus signaalin puuttumiseen.

- Epätäydellinen denaturaatio saattaa johtaa signaalin puuttumiseen ja liiallinen denaturaatio saattaa myös johtaa epäspesifiseen sitoutumiseen.
- Liiallinen hybridisaatio saattaa johtaa ylimääräisiin tai odottamattomiin signaaleihin.
- Käyttäjien on optimoitava omien näytteidensä protokolla ennen testiä käyttöä.
- Suboptimaaliset olosuhteet saattavat johtaa epäspesifiseen sitoutumiseen, jotka saatetaan tulkita koetinsignaaleiksi.

#### Tulosten tulkitseminen

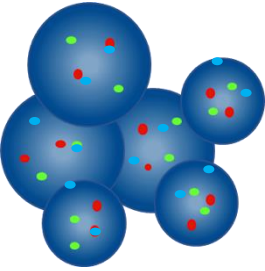
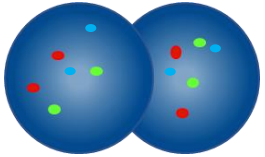
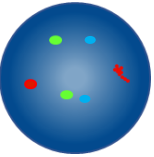
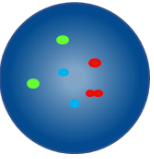
##### Objektiivilasin laadun arviointi

Objektiivilasia ei tarvitse analysoida, jos:

- Yksittäisten signaalien signaalit ovat liian heikkoja analysoitavaksi – jotta analyysia voidaan jatkaa, signaalien on näytävä kirkkaina, selkeinä ja helposti arvioitavina
- Analyysejä vaikeuttaa suuri määrä yhteen kasautuneita / päällekkäisiä soluja
- >50 % soluista ei ole hybridisoituneita
- Solujen välissä on liikaa fluoresoivia hiukkasia ja/tai fluoresoivaa utua, joka häiritsee signaaleita – optimaalisissa objektiivilaseissa taustan pitäisi näkyä tummana tai mustana ja puhtaana
- Solun tuman rajoja ei voida erottaa, eivätkä ne ole eheitä

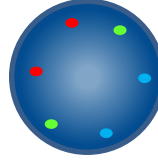
##### Analysointiohjeet

- Kahden analyytikon pitäisi analysoida ja tulkita jokainen näyte. Kaikki eriävyydet on annettava kolmannen analyytikon arvioitavaksi
- Jokaisella analyytikolla on oltava sopiva pätevyys tunnustettujen kansallisten standardien mukaan.
- Jokaisen analyytikon pitäisi saada riippumattomasti 100 tumaa kustakin näytteestä. Ensimmäisen analyytikon pitäisi käynnistää analyysi objektiivilasin vasemmalta puolelta ja toisen analyytikon oikealta puolelta
- Kunkin analyytikon on dokumentoitava tuloksiaan erillisillä arkeilla
- Analyysoi vain eheitä tumia, ei päällekkäisiä tai yhteen kasautuneita tumia tai sellaisia tumia, jotka ovat sytoplasmajätteen peitossa tai joissa on runsaasti autofluoresenssia.
- Vältä alueita, joilla on liiallista sytoplasmajätettä tai epäspesifistä hybridisaatiota.
- Signaalin intensiteetti saattaa vaihdella yksittäisenkin tuman kohdalla. Käytä tällaisissa tapauksissa yksittäisiä suodattimia ja/tai säädä fokustasoa.
- Suboptimaalisissa olosuhteissa signaalit saattavat näyttää hajanaisilta. Jos kaksi samanväristä signaalia koskettaa toisiaan, jos niiden välinen etäisyys on enintään yhtä suuri kuin kahden signaalin leveys tai jos kahta signaalia yhdistää heikko säie, katso ne yhdeksi signaaliksi.
- Mikäli on epäilystä siitä, voidaanko solu analysoida, älä analysoi sitä.

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

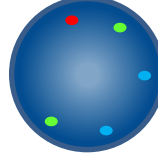
#### Odotettavissa olevat tulokset

##### Odotettavissa oleva normaali signaalikuviot

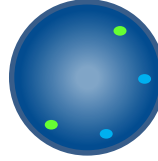


Tavallisessa solussa on odotettavissa kaksi punaista, kaksi vihreää ja kaksi sinistä signaalia (2P, 2V, 2S).

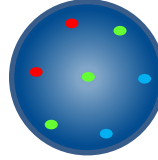
##### Odotettavissa olevat epänormaalit signaalikuviot



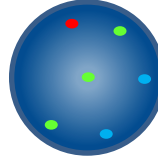
Jos solussa on hemizygoottinen deleetio D13S319-lokuksessa, sen signaalikuviot pitäisi olla yksi punainen, kaksi vihreää ja kaksi sinistä signaalia (1P, 2V, 2S).



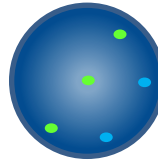
Jos solussa on homizygoottinen D13S319-lokuksen deleetio, sen signaalikuviot pitäisi olla nolla punaista, kaksi vihreää ja kaksi sinistä signaalia (0P, 2V, 2S).



Jos solussa on 12-trisomia ja normaali D13S319-status, signaalikuviot tulisi olla kaksi punaista, kolme vihreää ja kaksi sinistä signaalia (2P, 3V, 2S).



Jos solussa on 12-trisomia ja hemizygoottinen D13S319-deleetio, signaaleissa on yksi punainen, kolme vihreää ja kaksi sinistä signaalia (1P, 3V, 2S).



Jos solussa on 12-trisomia ja homizygoottinen D13S319-deleetio, signaalikuviot tulisi olla nolla punaista, kolme vihreää ja kaksi sinistä signaalia (0P, 3V, 2S).

Muut signaalikuviot ovat mahdollisia aneuploidisissa / epätasapainoisissa näytteissä.

#### Tunnettu ristireaktiivisuus

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

#### Haittatapahtumista raportointinen

Jos uskot, että tässä laitteessa on ilmennyt toimintahäiriö tai että sen suorituskykyominaisuuksissa on tapahtunut huononemista, joka on saattanut myötävaikuttaa haittatapahtumaan (esim. viivästynyt tai virheellinen diagnoosi, viivästynyt tai epäasianmukainen hoito), tästä on ilmoitettava välittömästi valmistajalle (**sähköposti:** [vigilance@ogt.com](mailto:vigilance@ogt.com)).

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

## Erityiset suorituskykyominaisuudet

### Analyttinen spesifisyys

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

Taulukko 1. D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe -koettimen analyttinen spesifisyys

| Koetin           | Kohdelokus      | Oikeaan lokukseen hybridisoituneiden signaalien määrä | Kaikkien hybridisoituneiden signaalien kokonaismäärä | Spesifisyys (%) |
|------------------|-----------------|---|--|-----------------|
| Punainen D13S319 | 13q14.2         | 200   | 200  | 100             |
| Sininen 13qter   | 13q34           | 200   | 200  | 100             |
| Vihreä D12Z3     | 12p11.1-q11.1 - | 200   | 200  | 100             |

### Analyttinen herkkyys

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

Taulukko 2. D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe -koettimen analyttinen herkkyys

| Sellaisten solujen määrä, joilla on odotettavissa olevat signaalikuviot | Sellaisten solujen määrä, joilla on tulosten laskennassa käytettävät signaalit | Herkkyys (%) | 95 %:n luottamusväli |
|---|--|--------------|----------------------|
| 467   | 500  | 93,4         | 2,6                  |

### Normaalien raja-arvojen luokittelu

Normaali raja-arvo on yhdessä FISH-koettimen kanssa maksimiprosenttiosuus tulosten laskennassa käytettävistä interfaasisoluista, joilla on spesifinen epänormaali signaalikuvio, jonka kohdalla näyte katsotaan normaaliksi kyseisen signaalikuvion osalta.

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

Taulukko 3. D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe -koettimen normaalien raja-arvojen luokittelu

| Koetin                         | Epänormaali signaalikuvio | Youden-indeksi | Normaali raja-arvo (%) |
|--------------------------------|---------------------------|----------------|------------------------|
| D13S319 Deletion Probe -koetin | 1P, 2V, 2S                | 0,96           | 6                      |
| Trisomy 12 Probe -koetin       | 2P, 3V, 2S                | 0,99           | 4                      |

Laboratorioiden on tarkistettava raja-arvot käyttäen omia tietojään<sup>11, 12</sup>.

### Tarkkuus ja uusittavuus

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

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

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

Taulukko 4. D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe -koettimen uusittavuus ja tarkkuus

| Muuttuja           | Vakiopoikkeama (STDEV) |
|--------------------|------------------------|
| Tarkkuus           | 1,28                   |
| Näytteestä toiseen | 1,30                   |
| Päivästä toiseen   | 4,12                   |
| Erästä toiseen     | 2,04                   |
| Kokonaispoikkeama  | 3,30                   |

## Kliininen suorituskyky

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

Kliinisten tietojen tulokset analysoitiin herkkyyden, spesifisyyden ja raja-arvojen aikaansaamiseksi yksilöiteistä lähestymistapaa käyttämällä.

Taulukko 5. D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe -koettimen kliininen suorituskyky

| Muuttuja   | Tulos |
|--|-------|
| <b>D13S319 Deletion Probe -koetin</b>                |       |
| Kliininen herkkyys (oikea positiivinen aste, TPR)    | 99,6% |
| Kliininen spesifisyys (oikea negatiivinen aste, TNR) | 99,5% |
| Väärä positiivinen aste (FPR) = 1 - spesifisyys      | 0,5%  |
| <b>Trisomy 12 Probe -koetin</b>                      |       |
| Kliininen herkkyys (oikea positiivinen aste, TPR)    | 100%  |
| Kliininen spesifisyys (oikea negatiivinen aste, TNR) | 100%  |
| Väärä positiivinen aste (FPR) = 1 - spesifisyys      | 0%    |

### Lisätietoja

Tuotteita koskevia lisätietoja on saatavilla ottamalla yhteyttä CytoCellin teknisen tuen osastoon.

Puh.: +44 (0)1223 294048










Sähköposti: techsupport@cytoCELL.com

Verkkosivut: www.ogt.com

### Viitteet

1. Juliusson G *et al.*, N Eng J Med 1990;323:720-4
2. Puiggros *et al.*, Biomed Res Int 2014;1-13
3. Kasar *et al.*, Nature Communications 2015;6:1-12
4. Hammarsund M *et al.*, FEBS Letters 2004;556:75-80
5. Van Dyke DL *et al.*, Br J Haematology 2009;148:544-50
6. Rossi *et al.*, Blood 2013;121(8):1403-1412
7. Liu Y *et al.*, Oncogene 1997;15:2463-73
8. Wolf S *et al.*, Hum Mol Genet 2001;10:1275-85
9. Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
10. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
11. 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.
12. Wiktor AE, Dyke DLV, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16-23.

**Symboliopas**

|   |  |
|---|--|
| <b>REF</b>  | fi: Kuvastonumero  |
|  | fi: Lääkinnällinen laite <i>in vitro</i> - diagnostiikkaan |
|  | fi: Eräkoodi   |
|  | fi: Tutustu käyttöohjeisiin                                |
|  | fi: Valmistaja   |
|  | fi: Käytön eräpäivä  |
|  | fi: Lämpötilaraja  |
|  | fi: Pidettävä poissa auringonvalosta                       |
|  | fi: Riittävä sisältö <n> testiin                           |
|  | fi: Sisältö  |

**Patentit ja tavaramerkit**

CytoCell on CytoCell Ltd.:n rekisteröity tavaramerkki.



**Cytocell Ltd.**  
Oxford Gene Technology,  
418 Cambridge Science Park,  
Milton Road,  
Cambridge, CB4 0PZ, UK  
Puh.: +44 (0) 1223 294048  
F: +44 (0) 1223 294986  
Sähköposti: probes@cytoCell.com  
Verkkosivut: www.ogt.com