



A Sysmex Group Company



Bruksanvisning

REF: LPH 087-S / LPH 087

CLL Plus Screening Panel



ENDAST FÖR PROFESSIONELLT BRUK



www.cytocell.com

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

Begränsningar

Produkten används för att upptäcka genomförluster eller -tillskott som är större än regionerna som avgränsas av de röda klonerna i denna sonduppsättning, vilken innefattar region 13q14.3, *ATM*, *P53 (TP53)* och *MYB* samt centromeren på kromosom 12. Genomförluster eller -tillskott 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.

Användningsområde

CLL Plus Screening Panel 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 och/eller deletioner som involverar MYB-regionen på kromosom 6 på 6q23.3 i hematologiskt erhållna cellsuspensioner fixerade i Carnoys 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

En uppsättning hematologiska sonder och en alfa-satellitsond för kronisk lymfatisk leukemi (KLL).

Alpha Satellite 12 Plus for CLL

Trisomi 12 är en återkommande avvikelse vid KLL som ses i 20 % av fallen¹ och ofta förekommer som den enda cytogenetiska avvikelser (40–60 % av fallen med trisomi 12)². Patienter med trisomi 12 klassificeras som låg risk om inga andra genetiska defekter föreligger³. Denna produkt finns också i storlekar med 5 (LPH 069-S) och 10 (LPH 069) testkit och har optimerats för hybridisering över natten.

13q14.3

Deletioner som påverkar 13q14 är de vanligaste strukturella genetiska avvikelserna vid KLL^{3,4,5}. Deletion av denna region är heterozygot hos 30–60 % och homozygot hos 10–20 % av alla KLL-patienter⁶. Patienter med 13q14-deletioner klassificeras som mycket låg risk om inga andra genetiska lesioner föreligger³.

P53 (TP53) (17p13.1)

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^{3,7}.

ATM (11q22.3)

Genen 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-skada⁸. Förlust av ATM rapporteras hos 18 % av alla patienter med KLL och anses vara en dålig prognosmarkör vid denna sjukdom⁹.

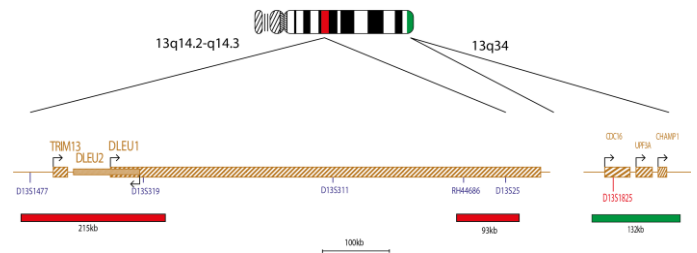
MYB (6q23.3)

Deletioner i kromosom 6q är återkommande vid KLL. Genen MYB (*MYB proto-oncogene, transcription factor*) är av avgörande vikt vid proliferation och differentiering av hematopoetiska celler^{10,11}. Den sitter på band 6q23.3 och tillhandahålls som markör för deletion i 6q.

Sondens specifikationer

13q14.3 Deletion Probe

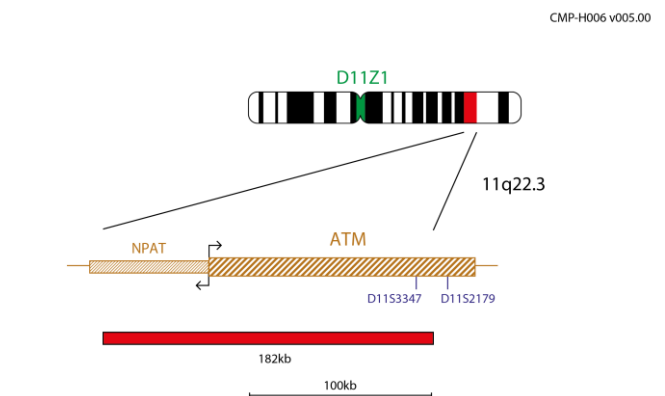
13q14.2–q14.3, röd
13qter, 13q34, grön



Sonderna 13q14.2–q14.3, märkta med rött, täcker markörerna D13S319 och D13S25. Den subtelomerspecifika sonden för 13qter (klon 163C9), märkt med grönt, möjliggör identifiering av kromosom 13 och fungerar som kontrollsond.

ATM Deletion Probe

ATM, 11q22.3, röd
D11Z1, 11p11.1-q11.1, grön



ATM-sonden är 182 kb stor, märkt med rött och täcker den telomera änden av NPAT-genen och den centromera änden av ATM-genen till precis bortom markören D11S3347. Sondblandningen innehåller också en kontrollsond för centromeren på kromosom 11 (D11Z1) märkt med grönt.

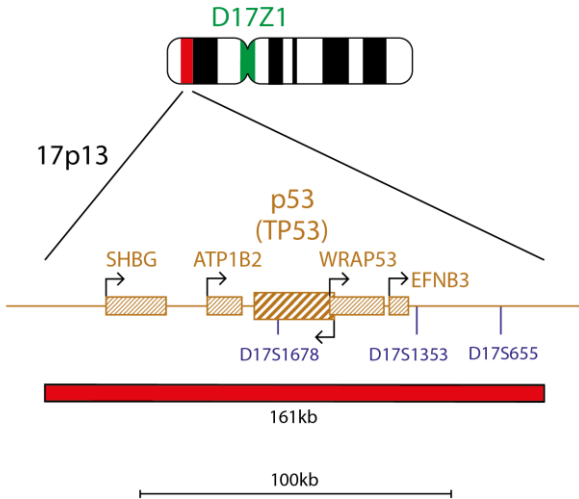
Alpha Satellite 12 Plus for CLL
D12Z3, 12p11.1-q11.1, röd



Alpha-Satellite 12 Plus är en sond för upprepade sekvenser, märkt med rött, som känner igen den upprepade centromersekvensen D12Z3.

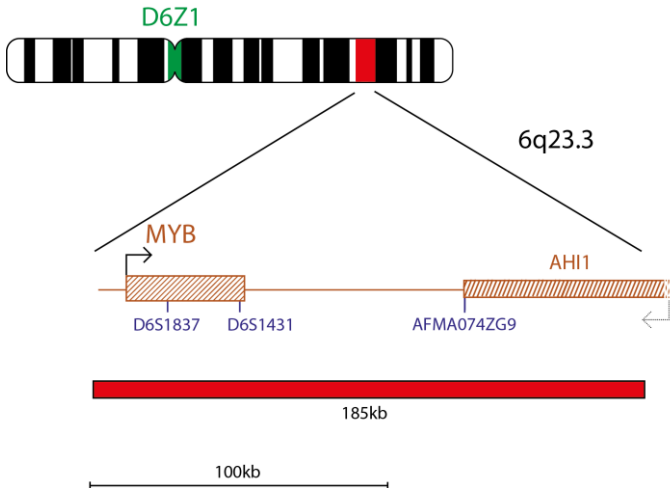
P53 (TP53) Deletion Probe
P53, 17p13, röd
D17Z1, 17p11.1-q11.1, grön

CMP-H039 V007.00



Sonden för p53 (TP53) är 161 kb stor och märkt med rött. Den täcker hela p53 (TP53) och intilliggande regioner. Sondblandningen innehåller också en kontrollsond för centromeren på kromosom 17 (D17Z1), märkt med grönt.

MYB Deletion Probe
MYB, 6q23.3, röd
D6Z1, 6p11.1-q11.1, grön



Sondblandningen för MYB består av en sond på 185 kb, märkt med rött, som täcker hela MYB-genen och en region som ligger telomert om genen som innefattar en centromer del av AHI1-genen. Sondblandningen innehåller också en kontrollsond för centromeren på kromosom 6 (D6Z1) märkt med grönt.

Material som medföljer

Sonder: 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-fenylnindol)).

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 10 µl 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 fryns fram till det utgångsdatum som anges på etiketten. Sonden och flaskorna med kontrastfärg måste förvaras mörkt.



Sonden är stabil under fryns- 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 indikatorresor som mäter pH 6,5–8,0)
10. Behållare med befuktning
11. Immersionsolja för linser till fluorescensmikroskop
12. Bänkcenrifug
13. Objektglas
14. Täckglas 24 x 24 mm
15. Timer
16. 37 °C inkubator
17. Gummilösning
18. Vortexblandare
19. Mätglas
20. Magnetorrörare
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 fluoroforer som används i detta probekit framkallas och emitteras vid följande våglängder:

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

Se till att mikroskopet är försett med rätt excitation- 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 fluoroforererna.

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.

Provberedning

Kitet är utformat för att användas på hematologiskt erhållna cellsuspensioner fixerade i Carnoy's 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 objektglas¹².

Lösningssberedning

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 lufttät 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 provet 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 förfarandet

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 sondersignal.

Tolkning av resultaten

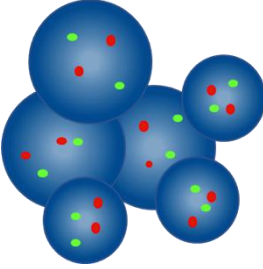
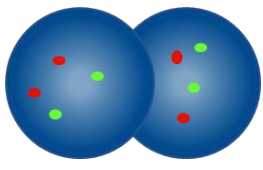
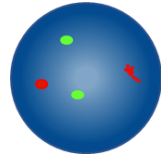
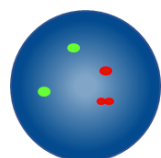
Bedömning av objektglasets kvalitet

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

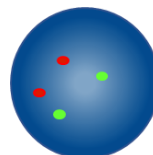
- Två analytiker bör analysera och tolka alla prover. Eventuella avvikelser bör avgöras av en tredje analytiker.
- Alla analytiker ska ha lämpliga kvalifikationer enligt godkänd nationell standard
- Varje analytiker ska oberoende av de andra bedöma 100 kärnor i varje prov. Den första analytikern ska 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 signaler och två gröna signaler – en av de två röda signalerna är diffus.
	Räkna som två röda signaler och två gröna signaler – mellanrummet i en av de röda signalerna är mindre än två signalbredder.

Förväntade resultat

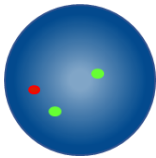
13q14.3 Deletion Probe

Förväntat normalt signalmönster

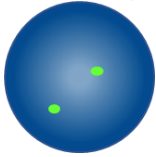


I en normal cell förväntas två röda och två gröna signaler (2R, 2G).

Förväntade onormala signalmönster



I en cell med en hemizygot deletion av 13q14.3 är det förväntade signalmönstret en röd och två gröna signaler (1R, 2G).



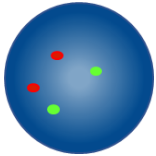
I en cell med en homozygot deletion är det förväntade signalmönstret ingen röd signal och två gröna signaler (0R, 2G).

13q-deletioner vid KLL identifieras som heterogena. En liten deletion inom 13q-regionen kan ge en liten restsignal med denna sonduppsättning.

Andra signalmönster är möjliga i aneuploida/oregelbundna prover.

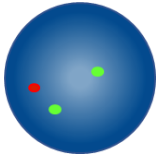
ATM Deletion Probe

Förväntat normalt signalmönster



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

Förväntat onormalt signalmönster

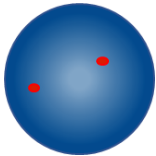


I en cell med en ATM-deletion är det förväntade signalmönstret en röd och två gröna signaler (1R, 2G).

Andra signalmönster är möjliga i aneuploida/oregelbundna prover.

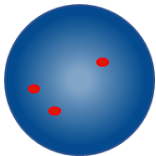
Alpha Satellite 12 Plus for CLL

Förväntat normalt signalmönster



I en normal cell förväntas två röda signaler (2R).

Förväntat onormalt signalmönster

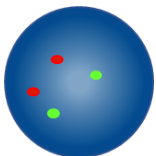


I en cell med trisomi 12 är det förväntade signalmönstret tre röda signaler (3R).

Andra signalmönster är möjliga i aneuploida/oregelbundna prover.

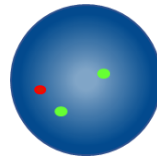
P53 (TP53) Deletion Probe

Förväntat normalt signalmönster



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

Förväntat onormalt signalmönster

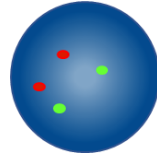


I en cell med en P53-deletion är det förväntade signalmönstret en röd och två gröna signaler (1R, 2G).

Andra signalmönster är möjliga i aneuploida/oregelbundna prover.

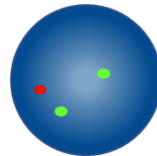
MYB Deletion Probe

Förväntat normalt signalmönster



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

Förväntat onormalt signalmönster



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

Andra signalmönster är möjliga i aneuploida/oregelbundna prover.

Känd korsreaktivitet

Sond	Känd korsreaktivitet
13q14.3 Deletion Probe	Den gröna 13qter-sonden kan uppvisa korshybridisering med centromeren på kromosom 19 och p-armarna på andra kromosomer.
ATM Deletion Probe	Den gröna D11Z1-sonden kan uppvisa upp till 4 signaler för korshybridisering med Xc och 17c.
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	Sonden kan korshybridisera i rött med 3c, 6c, 7c och 10c.
P53 Deletion Probe	Den gröna D17Z1-sonden kan uppvisa korshybridisering med centromererna på kromosom 11 och X.
MYB Deletion Probe	Ingen känd korshybridisering.

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 lokus och ingen annan plats. Den analytiska specificiteten fastställdes genom analys av 200 mållokus. Den analytiska specificiteten beräknades som antalet FISH-signaler som hybridiserade till rätt lokus dividerat med det totala antalet hybridiserade FISH-signaler.

Tabell 1. Analytisk specificitet för CLL *Plus* Screening Panel

Kit	Sond	Mållocus	Antal signaler hybridiserade till rätt locus	Totalt antal hybridiserade signaler	Specificitet (%)
13q14.3 Deletion Probe	Röd 13q14.3	13q14.3	200	200	100
	Grön 13qter	13qter, 13q34	200	200	100
ATM Deletion Probe	Röd ATM	11q22.3	200	200	100
	Grön D11Z1	11q11.1-q11.1	200	200	100
Alpha Satellite 12 <i>Plus</i> for CLL	D12Z3 röd	12p11.1-q11.1	200	200	100
P53 Deletion Probe	Röd P53	17p13.1	200	200	100
	Grön D17Z1	17p11.1-q11.1	200	200	100
MYB Deletion Probe	Röd MYB	6q23	200	200	100
	Grön D6Z1	6p11.1-q11.1	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 *Plus* Screening Panel

Kit	Antal celler med förväntade signalmönster	Antal celler med bedömningsbara signaler	Sensitivitet (%)	95 % konfidensintervall
13q14.3 Deletion Probe	481	500	96,2	1,6
ATM Deletion Probe	482	500	96,4	1,0
Alpha Satellite 12 <i>Plus</i> for CLL	487	500	97,4	1,0
P53 Deletion Probe	471	500	94,2	2,7
MYB Deletion Probe	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 *Plus* Screening Panel

Kit	Onormalt signalmönster	Youden-index	Normalt cut-off-värde (%)
13q14.3 Deletion Probe	1R, 2G eller 0R, 2G	0,95	7
ATM Deletion Probe	1R, 2G	0,99	9
Alpha Satellite 12 <i>Plus</i> for CLL	3R	0,99	3
P53 Deletion Probe	1R, 2G	0,90	10
MYB Deletion Probe	1R, 2G	0,97	8

Laboratorierna måste verifiera cut-off-värden med hjälp av sina egna data^{13,14}.

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 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 *Plus* Screening Panel

Variabel	Standardavvikelse (STDEV)				
	13q14.3 Deletion Probe	ATM Deletion Probe	Alpha Satellite 12 <i>Plus</i> for CLL	P53 Deletion Probe	MYB Deletion Probe
Precision	0,72	0,38	0,72	2,63	1,09
Prov till prov	0,58	0,38	0,89	2,30	1,19
Dag till dag	0,96	0,58	0,51	2,39	1,20
Tillverkningsatts till tillverkningsatts	1,40	1,27	1,27	1,68	0,90
Generell avvikelse	1,03	1,01	1,15	2,16	1,06

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 cutoff-värdet. Resultaten jämfördes sedan med provets kända status.

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

Tabell 5. Kliniska prestanda för CLL *Plus* Screening Panel

Sond	Klinisk sensitivitet (sant positivt resultat, TPR)	Klinisk specificitet (sant negativt resultat, TNR)	Falskt positivt resultat (FPR) = 1 - specificitet
13q14.3 Deletion Probe	96,3 %	99,1%	0,9%
ATM Deletion Probe	100%	99,2%	0,8%
Alpha Satellite 12 <i>Plus</i> for CLL	100%	100%	0%
P53 Deletion Probe	92,5%	97,1%	2,9%
MYB Deletion Probe	97,8%	99,6%	0,4%

Mer information

För ytterligare information om produkten, kontakta CytoCells tekniska support.

Tfn: +44 (0) 1223 294048










E-post: techsupport@cytoCELL.com

Hemsida: www.ogt.com

Referenser

- Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
- Puiggros *et al.*, Biomed Res Int 2014;1-13
- Rossi *et al.*, Blood 2013;121(8):1403-1412
- Juliusson G *et al.*, N Eng J Med 1990;323:720-4
- Kasar *et al.*, Nature Communications 2015;6:1-12
- Hammarsund M *et al.*, FEBS Letters 2004;556:75-80
- 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
- Clappier *et al.*, Blood 2007;110(4):1251-1261
- Stilgenbauer *et al.*, Leukemia, 1999;13:1331-1334
- 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
	sv: Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik
	sv: Kod för tillverkningsplatsen
	sv: Se bruksanvisningen
	sv: Tillverkare
	sv: Används före-datum
	sv: Temperaturgräns
	sv: Skyddas mot solljus
	sv: Innehållet räcker till <n> tester
	sv: Innehåll

Patent och varumärken

CytoCell är ett registrerat varumärke som tillhör CytoCell Ltd.



CytoCell 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@cytoCell.com
Hemsida: www.ogt.com