



A Systmex Group Company



## Bruksanvisning

REF: LPH 067-S / LPH 067 / LPH 067-20

### CLL PROFILER Kit



KUN TIL BRUK AV FAGFOLK



www.cytocell.com

Du finner mer informasjon og andre språk på [www.cytocell.com](http://www.cytocell.com)

### Begrensninger

Dette utstyret er designet for påvisning av genomiske tap som er større enn området som dekkes av de røde og grønne klonene i dette probesettet, som omfatter P53 (TP53)-, ATM- og D13S319-området, eller forsterkninger som er større enn området som dekkes av den blå klonen i dette probesettet, som omfatter centromeren til kromosom 12. Det er mulig at genomiske forsterkninger/tap utenfor disse områdene, eller delvis forsterkninger/tap av disse områdene, ikke blir påvist med dette produktet.

Testen er ikke ment for: bruk som et frittstående diagnostiseringsmedium, prenatal testing, populasjonsbasert screening, testing i pasientnære omgivelser eller selvtesting. Dette produktet er ment for profesjonell bruk i laboratorier; alle resultater skal tolkes av kvalifisert personell som tar andre relevante testresultater med i betraktningen.

Dette produktet er ikke godkjent for bruk til andre typer prøver eller sykdommer enn det som er spesifisert under Bruksområder.

Rapportering og tolking av FISH-resultater skal være i samsvar med standarder for profesjonell praksis, og annen klinisk og diagnostisk informasjon skal tas i betraktning. Dette settet er ment som et supplement til andre diagnostiske laboratorietester, og behandling skal ikke igangsettes kun på bakgrunn av FISH-resultatet.

Dersom protokollen ikke følges, kan det påvirke testen og føre til falskt positivt / negativt resultat.

Dette settet er ikke godkjent for andre formål enn det som er angitt under Bruksområder:

### Bruksområder

Cytocell® Aquarius CLL PROFILER Kit er en kvalitativ, ikke-automatisert FISH-test (fluorescens *in situ* hybridisering) som brukes for påvisning av delelsjoner i 11q22.3-området på kromosom 11, 17p13.1-området på kromosom 17 eller 13q14.2-q14.3-området på kromosom 13 og/eller forsterkning i centromerområdet på kromosom 12 hos pasienter med kronisk lymfatisk leukemi (KLL). Det benyttes suspensjoner av fikserte, hematologisk deriverte celler i Carnoys oppløsning (3:1 metanol/eddiksyre).

### Indikasjoner

Dette produktet er designet for bruk i tillegg til andre kliniske og histopatologiske tester som foretas under godkjent diagnostisk og klinisk behandling, der kunnskap om eventuell P53 (TP53), ATM -delelsjon eller D13S319 -delelsjon og/eller -forsterkning på kromosom 12 vil være viktig for den kliniske behandlingen.

### Prinsippene bak testen

Fluorescens *in situ* hybridisering (FISH) er en teknikk som gjør det mulig å påvise DNA-sekvenser på kromosomer i metafase eller kjerner i interfase ved hjelp av fikserte cytogenetiske prøver. Teknikken innebærer bruk av DNA-prober som hybridiserer hele kromosomer eller unike sekvenser, og er effektiv som supplement til cytogenetisk G-båndsanalyse. Denne teknikken kan nå brukes som et viktig verktøy for analysing av prenatale og hematologiske kromosomer og kromosomer i solide tumorer. Etter fiksering og denaturering er mål-DNA tilgjengelig for sammenkobling med en fluorescens-merket DNA-probe som er denaturert på lignende måte og som har en komplementær sekvens. Etter hybridisering blir ubundet og ikke spesifikt bundet DNA-probe fjernet, og DNAet blir kontrafarget for visualisering. Fluorescensmikroskopi gjør det da mulig å visualisere den hybridiserte proben på målmaterialet.

### Probeinformasjon

Cytocell CLL PROFILER Kit brukes til påvisning av delelsjoner av TP53, ATM og D13S319, samt forsterkninger av centromersekvenser av kromosom 12. Det benyttes perifert blod eller beinmargsprøver fra pasienter med kronisk lymfatisk leukemi (KLL).

### P53(TP53)/ATM Probe Combination

TP53-genet (genet for *tumorprotein p53*) på 17p13.1 er ett av de viktigste tumorsuppressorgenene. Det virker som en potent transkripsjonsfaktor som spiller en fundamental rolle for opprettholdelse av genetisk stabilitet. TP53-tap er rapportert hos 10 % av pasientene med KLL og betraktes som markøren for dårligst prognose<sup>1,2</sup>.

ATM-genet (genet for *ATM serin/treoninkinase*) på 11q22.3 er et viktig kontrollgen som er involvert i reparasjon av celledskade. Det har som funksjon å måle nivået av DNA-skade i cellen og å forsøke å reparere skaden ved fosforylering av nøkkelsubstrater som er involvert i den signalveien som er en respons på DNA-skade<sup>3</sup>. ATM-tap er rapportert hos 18 % av pasientene med KLL og betraktes som en markør for dårlig prognose ved den sykdommen<sup>4</sup>.

Analyse av ATM/TP53-interaksjonen ved KLL har vist at TP53 og ATM spiller en viktig rolle for proliferasjonen av lymfekreft<sup>5</sup>. Det er vist at ATM forsterker fosforyleringen av TP53 dersom skaden er så stor at cellen må ødelegges ved apoptose (som medieres av TP53). Delelsjon av ATM fjerner denne kontrollpunkt-aktiviteten og aktiverer derved TP53. Det blir derfor ikke gjort noe forsøk på apoptose eller reparasjon av skadede celler, til tross for tilstedeværelsen av TP53. I fravær av ATM kan skadede celler fortsette proliferasjonen<sup>5</sup>.

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

Delelsjoner som påvirker 13q14, er også de vanligste strukturelle genetiske avvikene ved kronisk lymfatisk leukemi (KLL)<sup>6,7,8</sup>. Dette området viste seg å være heterozygotisk deletert hos 30–60 % og homozygotisk deletert hos 10–20 % av KLL-pasienter<sup>9</sup>. Det er vist at overlevelsesraten er omtrent den samme for de to gruppene<sup>10</sup>. Pasienter med 13q14-delelsjoner er klassifisert med svært lav risiko dersom de ikke har andre genetiske lesjoner<sup>1</sup>.

To ikke-kodende RNA-gener, DLEU1 (*deletert ved lymfatisk leukemi 1*) og DLEU2 (*deletert ved lymfatisk leukemi 2*), pluss den genetiske markøren D13S319, strekker seg over det kritiske patogene området av 13q14<sup>11</sup>. Ved KLL antas DLEU1 å være den mest sannsynlige kandidaten som tumorsuppressorgen innenfor 13q14-området<sup>12</sup>. Trisomi 12 er et tilbakevendende avvik ved KLL som ses i 20 % av tilfellene<sup>13</sup> og som ofte forekommer som det eneste cytogenetiske avviket (40–60 % av tilfellene av trisomi 12)<sup>7</sup>. Pasienter med trisomi 12 er klassifisert med lav risiko dersom de ikke har andre genetiske lesjoner<sup>1</sup>.

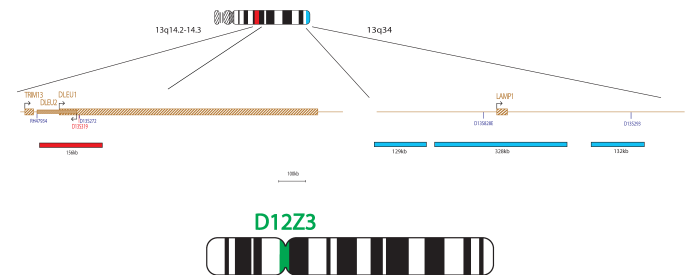
### Probespesifikasjon

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

D13S319, 13q14.2, Rød

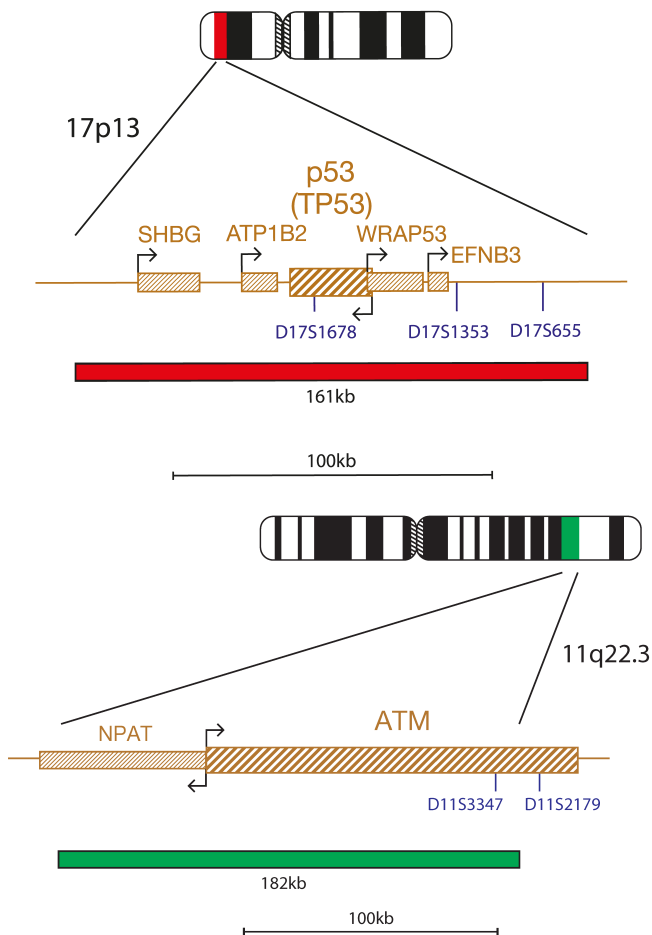
13qter, 13q34, Blå

D12Z3, 12p11.1-q11.1, Grønn



Chromosome 12 Alpha Satellite Probe er en probe for repeterte sekvenser, som er grønnetmerket og gjenkjenner den centromeriske repeterte sekvensen D12Z3. D13S319-proben er rødetmerket og dekker et 156 kb område som omfatter hele DLEU1-genet og det meste av DLEU2-genet, samt D13S319-, D13S272- og RH47934-markøren. 13qter subtelomer-spesifikk probe, som er blåmerket, gjør det mulig å identifisere kromosom 13 og fungerer som en kontrollprobe.

**P53 (TP53)/ATM**  
P53, 17p13.1, Rød  
ATM, 11q22.3, Grønn



P53-probeblandingen består av en 161 kb probe som er rødmerket og dekker hele P53 (TP53)-genet og de flankerende områdene. ATM-komponenten består av en 182 kb probe som er grønnermerket og dekker telomerenden til NPAT-genet og centromerenden til ATM-genet rett nedenfor D11S3347-markøren.

#### Nødvendig materiell

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

50 µl per ampulle (5 tester), 100 µl per ampulle (10 tester) eller 200 µl per ampulle (20 tester)

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

50 µl per ampulle (5 tester), 100 µl per ampulle (10 tester) eller 200 µl per ampulle (20 tester)

Probene leveres forhåndsblandet i hybridiseringsløsning (formamid; dekstransulfat; natriumklorid/natriumsitrat-oppløsning (SSC)) og er klare til bruk.

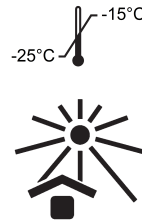
**Kontrafarging:** 150 µl per ampulle (15 tester) eller 500 µl per ampulle (50 tester)  
Kontrafargen er DAPI antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol)).

#### Advarsler og forsiktighetsregler

1. Til *in vitro* diagnostisk bruk. Kun til profesjonell bruk.
2. Bruk hansker ved håndtering av DNA-prober og DAPI-kontrafarge.
3. Probeblandingen inneholder formamid, som er teratogent; unngå hudkontakt og innånding av damp. Utvis forsiktighet ved håndtering; bruk hansker og labfrakk.
4. DAPI er et potensielt karsinogen. Utvis forsiktighet ved håndtering; bruk hansker og labfrakk.
5. Alt farlig materiale skal kasseres i samsvar med din institusjons retningslinjer for kassering av farlig avfall.
6. Brukerne må være i stand til å skille mellom fargene rød, blå og grønn.
7. Dersom de angitte protokollene og reagensene ikke benyttes, kan det påvirke testen og føre til falskt positivt/negativt resultat.
8. Proben skal ikke fortynnes eller blandes med andre prober.
9. Dersom det ikke brukes 10µl probe under protokolltrinnet med pre-denaturering, kan det påvirke testen og føre til falskt positivt/negativt resultat.

#### Oppbevaring og håndtering

Aquarius®-settet skal oppbevares mellom -25 °C og -15 °C i en fryser og kan oppbevares inntil utløpsdatoen som er oppgitt på settets etikett. Ampullene med probe og kontrafarge må oppbevares mørkt.



Ved normal bruk er proben stabil gjennom fryse/tine-syklusene (der én syklus omfatter å ta proben ut av fryseren og sette den inn i igjen), og den er lysstabil i opptil 48 timer etter å ha vært utsatt for kontinuerlig belysning. Eksponering for lys og temperaturforandringer må begrenses i størst mulig grad.

#### Nødvendig utstyr og materiell som ikke medfølger

Det må benyttes kalibrert utstyr:

1. Varmeplate (med fast plate og nøyaktig temperaturkontroll opptil 80 °C)
2. Kalibrerte mikropipetter med forskjellige tupper og for forskjellige volum i området 1–200 µl
3. Vannbad med nøyaktig temperaturkontroll ved 37 °C og 72 °C
4. Mikrosentrifugerør (0,5 ml)
5. Fluorescensmikroskop (se avsnittet Anbefalinger for fluorescensmikroskopering)
6. Fasekonstrastmikroskop
7. Rene Coplin-krukker av plast, keramikk eller varmeresistent glass
8. Pinsett
9. Kalibrert pH-måler (eller strips med pH-indikator som måler pH 6,5–8,0)
10. Fukttekammer
11. Immersjonsolje for fluorescensmikroskopering
12. Benksentrifuge
13. Objektglass for mikroskop
14. 24x24 mm dekkglass
15. Tidtaker
16. 37 °C inkubator
17. Lim (gummioppløsning)
18. Vortex-blander
19. Graderte sylinderglass
20. Magnetrører
21. Kalibrert termometer

#### Valgfritt utstyr som ikke medfølger

1. Cytogenetisk tørkekammer

#### Nødvendige reagenser som ikke medfølger

1. 20x natriumklorid/natriumsitrat-oppløsning (SSC)
2. 100 % etanol
3. Tween-20
4. 1M natriumhydroksid (NaOH)
5. 1M saltsyre (HCl)
6. Renset vann

#### Anbefalinger ved fluorescensmikroskopering

Bruk en 100-watts kvikksølvlampe eller tilsvarende og planslipte, apokromatiske objektglass 60/63x eller 100x for oljeimmersjon og optisk visualisering. Fluoroforene som benyttes i dette probesettet, eksiterer og emitterer ved følgende bølglengder:

Fluorofor	Eksitasjon <sub>max</sub> [nm]	Emisjon <sub>max</sub> [nm]
Blått	418	467
Grønt	495	521
Rødt	596	615

Sørg for at mikroskopet har egnede eksitasjons- og emisjonsfiltre som dekker bølglengdespekteret som er angitt ovenfor. Bruk et trippelt bandpassfilter (DAPI / grønt spektrum / rødt spektrum) eller et dobbelt bandpassfilter (grønt spektrum / rødt spektrum) for optimal simultan visualisering av de grønne og røde fluoroforene. Bruk et enkelt bandpassfilter (blått spektrum) for optimal visualisering av blått spektrum eller et trippelt bandpassfilter (rødt spektrum / grønt spektrum / blått spektrum) for simultan visualisering av de grønne, røde og blå fluoroforene.

Sjekk at fluorescensmikroskopet fungerer som det skal før det brukes. Bruk immersjonsolje som er egnet for fluorescensmikroskopering og som er formulert for lav autofluorescens. Unngå å blande DAPI antifade i immersjonsoljen. Det gjør signalene utydelige. Følg produsentens anbefalinger når det gjelder lampens og filterens levetid.

#### Prøvepreparering

Settet er designet for perifere blodceller eller beinmargsceller som er fiksert i Carnoys oppløsning (3:1 metanol/eddiksyre), som er fremstilt i henhold til laboratoriets eller institusjonens retningslinjer. Preparer lufttørkede prøver på objektglass i henhold til standard cytogenetiske prosedyrer. AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* inneholder anbefalinger for prøvetaking, dyrking, høsting og prøvepreparering<sup>14</sup>.

#### Tilberedning av oppløsninger

##### Etanoloppløsninger

Fortynn 100 % etanol med rensset vann i følgende forhold, og bland godt:

- 70 % etanol – 7 deler 100 % etanol og 3 deler rensset vann
- 85 % etanol – 8,5 deler 100 % etanol og 1,5 deler rensset vann

Oppløsningene kan oppbevares i opptil 6 måneder ved romtemperatur i en lufttett beholder.

### 2xSSC-oppløsning

Fortynn 1 del 20xSSC-oppløsning med 9 deler rensert vann, og bland godt. Sjekk pH, og juster til pH 7,0 ved bruk av NaOH eller HCl etter behov. Oppløsningen kan oppbevares i opptil 4 uker ved romtemperatur i en lufttett beholder.

### 0.4xSSC-oppløsning

Fortynn 1 del 20xSSC-oppløsning med 49 deler rensert vann, og bland godt. Sjekk pH, og juster til pH 7,0 ved bruk av NaOH eller HCl etter behov. Oppløsningen kan oppbevares i opptil 4 uker ved romtemperatur i en lufttett beholder.

### 2xSSC, 0,05 % Tween-20-oppløsning

Fortynn 1 del 20xSSC-oppløsning med 9 deler rensert vann. Tilsett 5 µl Tween-20 per 10 ml, og bland godt. Sjekk pH, og juster til pH 7,0 ved bruk av NaOH eller HCl etter behov. Oppløsningen kan oppbevares i opptil 4 uker ved romtemperatur i en lufttett beholder.

### FISH-protokoll

(Obs! Pass alltid på at prøven og kontrafargen eksponeres minst mulig for laboratoriebelysning).

### Prøvepreparering

1. Legg celleprøven på et objektglass av glass. La lufttørke. (**Valgfritt, dersom det benyttes et cytogenetisk tørkekammer:** prøvene skal legges på objektglassene i et cytogenetisk tørkekammer. For optimal prøvepreparering skal kammeret holde omtrent 25 °C og 50 % fuktighet. Dersom et cytogenetisk tørkekammer ikke er tilgjengelig, kan en avtrekkshette være et alternativ).
2. Legg objektglasset i 2xSSC i 2 minutter ved romtemperatur uten omrøring.
3. Dehydrer i flere etanoloppløsninger (70 %, 85 % og 100 %) ved romtemperatur. 2 minutter i hver oppløsning.
4. La lufttørke.

### Pre-denaturering

5. Ta prøven ut av fryseren, og la den nå romtemperatur. Sentrifuger rørene lett før bruk.
6. Bland probeløsningen med en pipette så den blir homogen.
7. Ta ut 10 µl probe per test, og overfør volumet til et mikrosentrifugerør. Sett straks resterende probe tilbake i fryseren.
8. Forhåndsvarm prøven og prøvepreparatet til 37 °C (+/- 1 °C) på en varmeplate i 5 minutter.
9. Legg 10 µl probeblanding på celleprøven, og legg et dekkglass forsiktig på. Forsegel med lim (gummioppløsning), og la limet tørke helt.

### Denaturering

10. Denaturer prøven og prøven samtidig ved å varme objektglasset på en varmeplate ved 75 °C (+/- 1 °C) i 2 minutter.

### Hybridisering

11. Oppbevar objektglasset i en fuktig, lystett beholder ved 37 °C (+/- 1 °C) over natten.

### Vasking etter hybridisering

12. Ta DAPI ut fra fryseren, og la den nå romtemperatur.
13. Fjern forsiktig dekkglasset og alle limrester.
14. Legg objektglasset i 0,4xSSC (pH 7,0) ved 72 °C (+/- 1 °C) i 2 minutter uten omrøring.
15. La oppløsningen renne av, og legg objektglasset i 2xSSC, 0,05 % Tween-20 ved RT (pH 7,0) i 30 sekunder uten omrøring.
16. La oppløsningen renne av, og legg 10 µl DAPI antifade på hver prøve.
17. Legg på et dekkglass, fjern eventuelle bobler og la fargen utvikles i mørke i 10 minutter.
18. Se på prøven i et fluorescensmikroskop (se **Anbefalinger for fluorescensmikroskopering**).

### Stabiliteten til ferdigpreparerte prøver

Ferdige prøvepreparater kan analyseres i opptil 1 måned dersom de oppbevares i mørke ved romtemperatur eller lavere.

### Prosedyreanbefalinger

1. Uttørkede eller gamle prøver kan gi redusert signalflorescens
2. Hybridiseringsbetingelsene kan bli negativt påvirket dersom det brukes andre reagenser enn det som følger med eller anbefales av Cytocell Ltd
3. Bruk et kalibrert termometer til måling av temperaturen i oppløsninger, vannbad og inkubatorer siden disse temperaturene er viktige for optimal ytelse.
4. Konsentrasjoner, pH-verdier og temperaturer er viktige siden lav stringens kan føre til uspesifikk binding av prøven og for høy stringens kan føre til manglende signal
5. Ufullstendig denaturering kan føre til manglende signal og overdenaturering kan også føre til uspesifikk binding
6. Overhybridisering kan føre til ekstrasygnaler eller uventede signaler
7. Brukerne bør optimalisere protokollen for egne prøver før de bruker testen til diagnostiske formål
8. Suboptimale forhold kan føre til uspesifikk binding som kan bli feiltolket som et probesignal

### Tolking av resultater

#### Vurdering av prøvepreparatets kvalitet

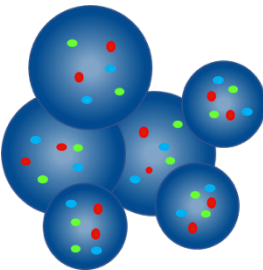
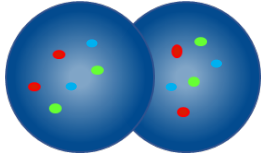
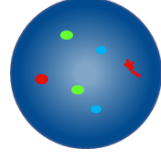
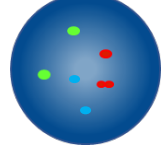
Prøvepreparatet skal ikke analyseres dersom:

- Signalene er for svake for analysering i enkle filtre. For å kunne brukes i analyse skal signalene være klare, distinkte og enkle å evaluere
- Det er mange sammenklumpede/overlappende celler som forstyrrer analysen
- >50 % av cellene ikke er hybridisert

- Det er et overskudd av fluorescerende partikler mellom celler og/eller en fluorescerende tåke som interfererer med signalene – på optimale prøvepreparater er bakgrunnen jevn og mørk eller svart
- Grensen til cellekjerne ikke kan skjelnes eller ikke er intakt

### Retningslinjer for analyse

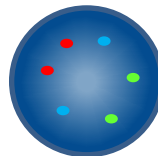
- To analytikere skal analysere og tolke hver prøve. Ved eventuell uoverensstemmelse skal det foretas en vurdering av en tredje analytiker
- Alle analytikere skal være tilstrekkelig kvalifisert i henhold til anerkjente nasjonale standarder.
- Hver analytiker skal uavhengig av hverandre gi score til 100 kjerner i hver prøve. Første analytiker bør starte analysen fra venstre side av prøven og andre analytiker fra høyre side.
- Begge analytikere skal dokumentere resultatene sine i separate dokumenter
- De skal bare analysere intakte kjerner og ikke overlappende eller sammenklumpede kjerner eller kjerner som er dekket av cytoplasmarester eller som har høy grad av autofluorescens
- Unngå områder med mye cytoplasmarester eller uspesifikk hybridisering
- Signalintensiteten kan variere, også innenfor en enkelt kerne. I slike tilfeller skal det brukes enkeltfiltre og/eller det fokale planet skal justeres
- Ved suboptimale forhold kan signalene bli diffuse. Dersom to signaler med samme farge er i kontakt med hverandre, eller avstanden mellom dem ikke er større enn to signalbredder, eller når en svak tråd sammenkobler de to signalene, skal det regnes som ett signal
- Ved tvil om hvorvidt en celle er analyserbar eller ikke, skal den ikke analyseres

Retningslinjer for analyse	
	Skal ikke telles – kjernene er for nære hverandre til at grensene kan bestemmes
	Overlappende kjerner skal ikke telles – alle områder av begge kjerner er ikke synlige
	Telles som to røde signaler, to blå signaler og to grønne signaler – ett av de to røde signalene er diffust
	Telles som to røde signaler, to blå signaler og to grønne signaler – mellomrommet i ett rødt signal er mindre enn to signalbredder

### Forventede resultater

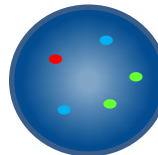
#### D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe

Forventet mønster av normale signaler

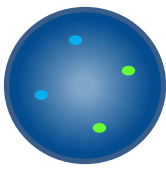


I en normal celle forventes to røde, to blå og to grønne signaler (2R, 2B, 2G).

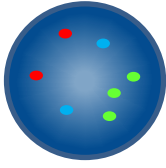
#### Forventet mønster av unormale signaler



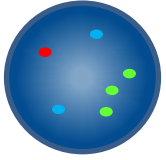
I en celle med en hemizygot deleksjon av D13S319-locus er det forventede signalmønsteret ett rødt, to blå og to grønne signaler (1R, 2B, 2G).



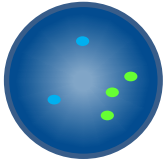
I en celle med en hemizygot deleksjon av D13S319-locus er det forventede signalmønsteret null røde, to blå og to grønne signaler (0R, 2B, 2G).



I en celle med trisomi 12 og normal D13S319-status er det forventede signalmønsteret to røde, to blå og tre grønne signaler (2R, 2B, 3G).



I en celle med trisomi 12 og hemizygot D13S319-deleksjon er det forventede signalmønsteret ett rødt, to blå og tre grønne signaler (1R, 2B, 3G).

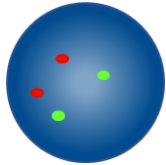


I en celle med trisomi 12 og homozygot D13S319-deleksjon er det forventede signalmønsteret null røde, to blå og tre grønne signaler (0R, 2B, 3G).

Andre signalmønstre er mulige i aneuploide/ubalanserte celleprøver.

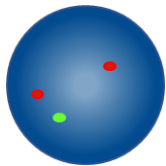
#### **P53/ATM Probe**

##### Forventet mønster av normale signaler

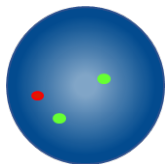


I en normal celle forventes to røde og to grønne signaler (2R, 2G).

##### Forventet mønster av unormale signaler



I en celle med en ATM-deleksjon er det forventede signalmønsteret to røde og ett grønt signal (2R, 1G).



I en celle med en P53-deleksjon er det forventede signalmønsteret ett rødt og to grønne signaler (1R, 2G).

Andre signalmønstre er mulige i aneuploide/ubalanserte celleprøver.

#### **Kjente kryssreaksjoner**

Den grønne D12Z3-proben kan vise krysshybridisering til 3c, 6c, 7c og 10c.

#### **Melding av bivirkninger**

Dersom du mener at dette utstyret har en feilfunksjon eller svekket ytelse som kan ha bidratt til en bivirkning (f.eks. forsinket eller feil diagnose, forsinket eller uhensiktsmessig behandling), må dette rapporteres umiddelbart til produsenten (e-post: [vigilance@ogt.com](mailto:vigilance@ogt.com)).

Bivirkningen skal om mulig også rapporteres til de ansvarlige myndigheter i ditt land. Det finnes en liste over kontaktpunkter på: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

#### **Spesifikke analysekarakteristika**

##### **Analytisk spesifisitet**

Analytisk spesifisitet er prosentandelen signaler som viser hybridisering til korrekt locus og ingen annen lokasjon. Den analytiske spesifisiteten ble bestemt ved analysing av totalt 200 mål-loci. Den analytiske spesifisiteten ble beregnet som antall FISH-signaler som hybridiserte til korrekt locus, dividert med totalt antall hybridiserte FISH-signaler.

Tabell 1. Analytisk spesifisitet for CLL PROFILER Kit

Sett	Probe	Mål-locus	Antall signaler hybridisert til korrekt locus	Totalt antall hybridiserte signaler	Spesifisitet (%)
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	Rød D13S319	13q14.2	200	200	100
	Blå 13qter	13q34	200	200	100
	Grønn D12Z3	12p11.1-q11.1	200	200	100
P53/ATM Probe	Rødt P53	17p13	200	200	100
	Grønn ATM	11q22.3	200	200	100

##### **Analytisk sensitivitet**

Analytisk sensitivitet er prosentandelen interfase-celler som kan gis en score og som har det forventede mønsteret av normale signaler. Analytisk sensitivitet ble bestemt ved analysing av interfase-celler på tvers av forskjellige normale prøver. Sensitiviteten ble beregnet som prosentandelen celler som kan gis en score, og som har det forventede signalmønsteret (med 95 % konfidensintervall).

Tabell 2. Analytisk sensitivitet for CLL PROFILER Kit

Sett	Antall celler med forventede signalmønstre	Antall celler med signaler som kan gis en score	Sensitivitet (%)	95 % konfidensintervall
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	467	500	93,4	2,6
P53/ATM Probe	479	500	95,8	1,7

#### **Karakterisering av normale cut-off-verdier**

I forbindelse med FISH-prober er den normale cut-off-verdien den maksimale prosentandelen interfase-celler som kan gis en score og som har et spesifikt mønster av unormale signaler, der en prøve betraktes som normal for det signalmønsteret.

Den normale cut-off-verdien ble bestemt ved bruk av prøver fra normale og positive pasienter. For hver prøve ble signalmønsteret til 100 celler registrert. Youden-indeksen ble beregnet for å finne terskelverdien der Sensitivitet + Spesifisitet-1 er maksimert.

Tabell 3. Karakterisering av normale cut-off-verdier for CLL PROFILER Kit

Sett	Omgruppering	Unormalt signalmønster	Youden-indeks	Normal cut-off (%)
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	D13S319 hemizygot deleksjon	1R, 2B, 2G	0,96	6
	Trisomi 12	2R, 2B, 3G	0,99	4
P53/ATM Probe	P53-deleksjon	1R, 2G	0,99	8
	ATM-deleksjon	2R, 1G	0,99	8

Laboratorier må verifisere cut-off-verdier ved bruk av egne data<sup>15,16</sup>.

#### **Nøyaktighet og reproduserbarhet**

Nøyaktighet er et mål på den naturlige variasjonen for en test som blir gjentatt flere ganger under de samme forholdene. Nøyaktigheten ble vurdert ved bruk av prøver med prober fra med samme lot-nummer som ble testet på samme prøve, under de samme forholdene og på samme dato.

Reproduserbarhet er et mål på variabiliteten til en test og er bestemt med hensyn til variabilitet fra prøve til prøve, dag til dag og batch til batch. Reproduserbarhet

dag-til-dag ble bestemt ved analysering av de samme prøvene på tre forskjellige dager. Reproduerbarhet batch-til-batch ble bestemt ved analysering av de samme prøvene på én dag, men ved bruk av probe med tre forskjellige lot-numre. Reproduerbarhet prøve-til-prøve ble bestemt ved analysering av tre replikater av en prøve på én dag. For hver prøve ble signalmønstre for 100 interfase-celler registrert, og prosentandelen celler med forventet signalmønster ble beregnet.

Reproduerbarhet og nøyaktighet ble beregnet som standardavviket (STDEV) mellom replikater for hver variabel og totalt gjennomsnittlig STDEV.

Tabell 4. Reproduerbarhet og nøyaktighet for CLL *PROFILER* Kit

Variabel	Standardavvik (STDEV)	
	D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	P53/ATM Probe
Nøyaktighet	1,28	1,37
Prøve-til-prøve	1,30	1,60
Dag-til-dag	4,12	2,27
Batch-til-batch	2,04	1,77
Totalt avvik	3,30	1,98

#### Klinisk ytelse

Den kliniske ytelsen ble bestemt for et representativt utvalg fra populasjonen som produktet er tiltenkt for. For hver prøve ble signalmønstret til  $\geq 100$  interfase-celler registrert. Det ble avgjort om signaler var normale/unnormale ved å sammenligne prosentandelen av celler med det spesifikke mønstret av unormale signaler, med cut-off-verdien for normal. Resultatene ble deretter sammenlignet med prøvens kjente status.

Resultatene for de kliniske dataene ble analysert for å generere verdier for sensitivitet, spesifisitet og cut-off ved bruk av en endimensjonal tilnærming.

Tabell 5. Klinisk ytelse for CLL *PROFILER* Kit

Omgruppering	Klinisk sensitivitet (sann positiv rate, TPR)	Klinisk spesifisitet (sann negativ rate, TNR)	Falsk positiv rate (FPR) = 1 – Spesifisitet
<i>D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe</i>			
D13S319-delesjon	96,6%	99,5%	0,5%
Trisomi 12	100%	100,0%	0%
<i>P53/ATM Probe</i>			
P53-delesjon	100%	100%	0%
ATM-delesjon	100%	100%	0%

#### Ytterligere informasjon

Ytterligere produktinformasjon kan fås ved å kontakte CytoCELL Technical Support Department.

Tlf.: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.cytoCELL.com

#### Referanser

- 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.

#### Forklaring av symboler

REF	no: Katalognummer
IVD	no: <i>In vitro</i> -diagnostisk medisinsk utstyr
LOT	no: Batchkode
	no: Les bruksanvisningen
	no: Tilvirker
	no: Brukes innen-dato
	no: Temperaturgrense
	no: Oppbevares beskyttet mot sollys
	no: Innholdet rekker til <n> tester
CONT	no: Innhold

#### Patenter og varemerker

Aquarius og CytoCELL er registrerte varemerker som tilhører CytoCELL Ltd.

#### CytoCELL Ltd.

Oxford Gene Technology,  
418 Cambridge Science Park,  
Milton Road,  
Cambridge, CB4 0PZ, Storbritannia  
Tlf.: +44(0)1223 294048  
Faks: +44(0)1223 294986  
E-post: probes@cytoCELL.com  
Nettside: www.cytoCELL.com

