



A Sysmex Group Company



## Instrucțiuni de utilizare

REF: LPH 087-S / LPH 087

### CLL Plus Screening Panel



NUMAI PENTRU UTILIZARE PROFESIONALĂ



www.cytoCELL.com

Informații suplimentare și în alte limbi sunt disponibile pe [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

#### Limitări

Acest produs este conceput pentru a detecta delețiile, inserțiile sau rearanjamentele cu puncte de ruptură mai mari decât regiunile de care se atașează clonele roșii din acest set de sonde, care includ regiunile 13q14.3, *ATM*, *P53 (TP53)* și *MYB*, precum și regiunea centromerică a cromozomului 12. Este posibil ca delețiile și inserțiile unor fragmente din afara acestei regiuni sau inserțiile/delețiile parțiale în aceste regiuni să nu fie detectate cu acest produs.

Acest test nu este destinat pentru: utilizarea ca diagnosticare de sine stătătoare, testare prenatală, screening la nivel de populație, testare la locul de acordare a asistenței medicale sau autotestare. Acest produs este destinat numai pentru utilizare profesională de laborator; toate rezultatele trebuie interpretate de personal cu calificare adecvată, luând în considerare rezultatele relevante ale altor teste. Acest produs nu a fost validat pentru utilizare pe tipuri de probe sau tipuri de boli altele decât cele specificate în destinația de utilizare.

Raportarea și interpretarea rezultatelor FISH trebuie să fie concordante cu standardele de practică profesională și trebuie să ia în considerare alte informații clinice și diagnostice. Acest kit este destinat ca test complementar altor teste diagnostice de laborator, iar acțiunea terapeutică nu trebuie inițiată exclusiv pe baza rezultatului FISH.

Nerespectarea protocolului poate afecta performanța și poate duce la rezultate fals pozitive/negative.

Acest kit nu a fost validat pentru scopuri în afara destinației de utilizare specificate.

#### Destinația de utilizare

CLL Plus Screening Panel este un test calitativ, ne-automatizat de hibridizare fluorescentă *in situ* (FISH) utilizat pentru detecția delețiilor cromozomiale în regiunea 11q22.3 a cromozomului 11, regiunea 17p13.1 a cromozomului 17 sau regiunea 13q14.2-q14.3 a cromozomului 13 și/sau a inserțiilor în regiunea centromerică a cromozomului 12 și/sau a delețiilor la nivelul regiunii MYB a cromozomului 6 în locusul 6q23.3 în suspensii de celule de origine hematologică, fixate în soluție Carnoy (metanol/acid acetic 3:1), de la pacienți cu leucemie limfocitară cronică (LLC).

#### Indicații

Acest produs este conceput pentru a fi utilizat complementar la alte teste clinice și histopatologice în cadrul algoritmilor stabiliți de diagnostic și tratament în situațiile în care cunoașterea statutului privind deleția P53 (TP53), *ATM* sau D13S319 și/sau inserțiile în regiunea centromerică a cromozomului 12 poate fi importantă pentru alegerea strategiei de gestionare clinică.

#### Principiul testului

Hibridizarea fluorescentă *in situ* (FISH) este o tehnică care permite detecția secvențelor de ADN pe cromozomii în metafază sau nucleii în interfază din probe citogenetice fixate. Această tehnică presupune utilizarea sondelor de ADN care se hibridizează la cromozomi întregi sau la secvențe unice separate și servește ca un important test complementar analizei citogenetice cu bandare G. Această tehnică poate fi aplicată în prezent ca instrument de investigație esențial în cadrul analizei cromozomiale prenatale, hematologice și a tumorilor solide. ADN-ul țintă, după fixare și denaturare, este disponibil pentru aliniere la o sondă de ADN denaturată în mod similar și marcată fluorescent, care are o secvență complementară. După hibridizare, sonda de ADN nelegată și legată în mod nespecific este îndepărtată,

iar ADN-ul este contracolorat pentru vizualizare. După aceea, microscopia de fluorescență permite vizualizarea sondei hibridizate pe materialul țintă.

#### Informații privind sonda

O selecție de sonde hematologice și o sondă alfa-satelit pentru detecția leucemiei limfocitare cronice (LLC).

#### Sonda Alpha Satellite 12 Plus pentru LLC

Trisomia 12 este o anomalie recurentă în LLC, observată în 20% dintre cazuri,<sup>1</sup> adesea fiind singura aberație citogenetică (în 40-60% dintre cazurile de trisomie 12)<sup>2</sup>. În absența altor aberații genetice se consideră că pacienții cu trisomia 12 au un risc scăzut<sup>3</sup>. Acest produs este disponibil, de asemenea, în kituri de 5 (LPH 069-S) și 10 (LPH 069) teste și a fost optimizat pentru hibridizare peste noapte.

#### 13q14.3

Deleții din regiunea 13q14 sunt, de asemenea, cele mai frecvente aberații genetice structurale la pacienții cu LLC<sup>3,4,5</sup>. Deleția heterozigotă a acestei regiuni se detectează la 30-60%, iar deleția homozigotă — la 10-20% dintre pacienții cu LLC<sup>6</sup>. În absența altor aberații genetice, se consideră că pacienții cu deleții 13q14 au un risc foarte scăzut<sup>9</sup>.

#### P53 (TP53) (17p13.1)

Gena TP53 (*proteina tumorală p53*), localizată la nivelul 17p13.1, este una dintre cele mai importante gene de supresie tumorală; aceasta acționează ca un factor puternic de transcripție și joacă un rol fundamental în menținerea stabilității genetice. Deleția regiunii TP53 se observă la 10% dintre pacienții cu LLC și este considerată drept un marker al celui mai nefavorabil prognostic<sup>3,7</sup>.

#### ATM (11q22.3)

Gena ATM (*serin/treonin-kinaza ATM*), localizată la nivelul 11q22.3, este o importantă genă-punct de control, implicată în gestionarea deteriorării celulare; funcția ei este de a determina nivelul de deteriorare a ADN-ului în celulă și de a încerca repararea acestuia prin fosforilarea substratelor principale care participă în căile de răspuns la deteriorarea ADN-ului<sup>8</sup>. Delețiile la nivelul ATM se observă la 18% dintre pacienții cu LLC și sunt considerate drept un marker al unui prognostic nefavorabil al LLC<sup>9</sup>.

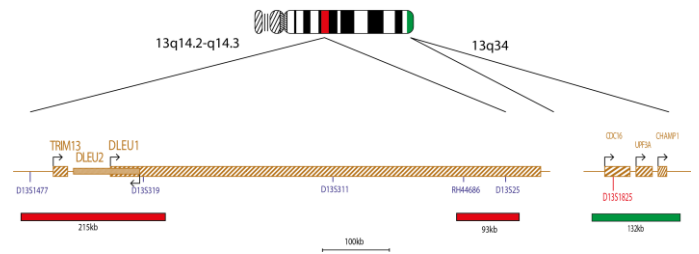
#### MYB (6q23.3)

Delețiile la nivelul 6q sunt recurente la pacienții cu LLC. Gena MYB (*proto-oncogene MYB, factor de transcripție*) este esențială pentru proliferarea și diferențierea celulelor hematopoietice<sup>10,11</sup>. Aceasta este localizată la nivelul benzii 6q23.3 și îndeplinește rolul de marker al deleției 6q.

#### Specificații privind sonda

##### Sonda 13q14.3 Deletion Probe

13q14.2-q14.3, roșu  
13qter, 13q34, verde

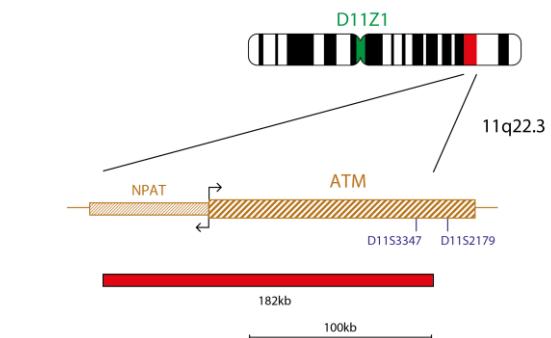


Sondele 13q14.2-q14.3, marcate cu roșu, se atașează de markerii D13S319 și D13S25. Sonda specifică subtelomerului 13qter (clona 163C9), marcată cu verde, permite identificarea cromozomului 13 și îndeplinește rolul de sondă de control.

##### Sonda ATM Deletion Probe

ATM, 11q22.3, roșu  
D11Z1, 11p11.1-q11.1, verde

CMP-H006 v005.00



Sonda ATM este marcată cu roșu și constă din 182kb, care se atașează la capătul telomeric al genei NPAT și capătul centromeric al genei ATM până la imediat după markerul D11S3347. Setul de sonde conține, de asemenea, o sondă de control pentru centromerul 11 (D11Z1), marcat cu verde.

### Sonda Alpha Satellite 12 Plus pentru LLC

D12Z3, 12p11.1-q11.1, roșu

**D12Z3**



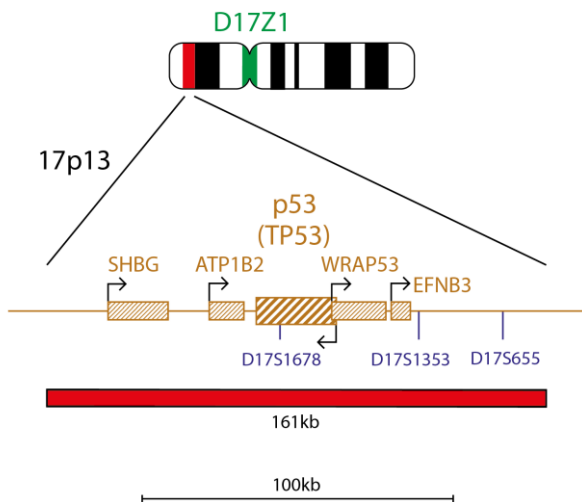
Sonda Alpha-Satellite 12 Plus Probe este de tip secvență de repetiție, marcată cu roșu, și recunoaște secvența de repetiție centromerică D12Z3.

### Sonda P53 (TP53) Deletion Probe

P53, 17p13, roșu

D17Z1, 17p11.1-q11.1, verde

CMP-H039 V007.00

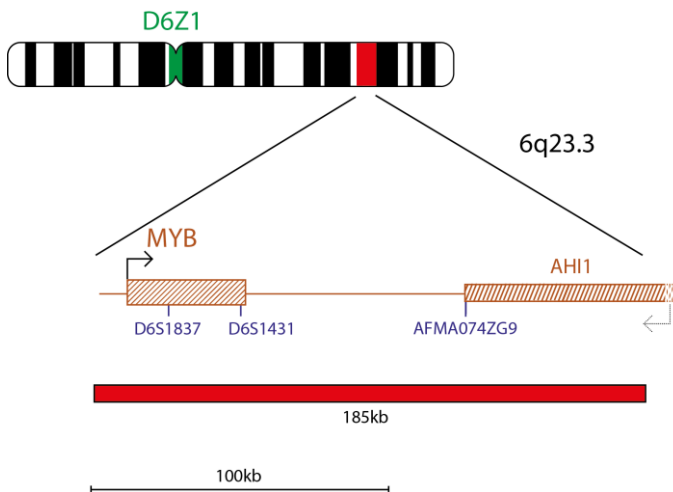


Sonda p53 (TP53) are o lungime de 161kb, este marcată cu roșu și se atașează la întreaga genă p53 (TP53) gene și regiunile de flancare. Setul de sonde conține, de asemenea, o sondă de control pentru centromerul 17 (D17Z1), marcată cu verde.

### Sonda MYB Deletion Probe

MYB, 6q23.3, roșu

D6Z1, 6p11.1-q11.1, verde



Setul de sonde MYB constă dintr-o sondă de 185kb, marcată cu roșu, care se atașează la întreaga genă MYB și o regiune localizată telomeric față de regiunea care include porțiunea centromerică a genei AHI1. Acest set de sonde conține, de asemenea, o sondă de control pentru centromerul 6 (D6Z1), marcată cu verde.

### Materiale furnizate

**Sonde:** 50 µl per flacon (5 teste) sau 100 µl per flacon (10 teste)

Sondele sunt furnizate pre-amestecate în soluție de hibridizare (formamidă; dextran sulfat; soluție salină — citrat de sodiu (SSC)) și sunt gata de utilizare.

**Contracolorant:** 150 µl per flacon (15 teste)

Contracolorantul este un agent anti-diminuare a colorării DAPI (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

### Atenționări și precauții

1. Pentru diagnosticare *in vitro*. Numai pentru utilizare profesională.
2. Purtați mănuși la manevrarea sondelor de ADN și a contracolorantului DAPI.

3. Amestecurile de sonde conțin formamidă, care este teratogen; nu inhalați vaporii și nu permiteți contactul cu pielea. Manevrați cu atenție; purtați mănuși și halat de laborator.
4. DAPI este potențial carcinogen. Manevrați cu atenție; purtați mănuși și halat de laborator.
5. Eliminați toate materialele periculoase în conformitate cu ghidurile instituției dumneavoastră privind eliminarea deșeurilor periculoase.
6. Operatorii trebuie să fie capabili să distingă culorile roșu, albastru și verde
7. Nerespectarea protocolului specificat, inclusiv a indicațiilor privind reactivii, poate afecta performanța și poate duce la rezultate fals pozitive/negative.
8. Sonda nu trebuie diluată sau amestecată cu alte sonde.
9. Neutilizarea a 10 µl de sondă la etapa de pre-denaturare a protocolului poate afecta performanța și poate duce la rezultate fals pozitive/negative.

### Păstrare și manevrare

Kitul trebuie păstrat la temperaturi cuprinse între -25 °C și -15 °C în congelator până la data de expirare, indicată pe eticheta kitului. Flacoanele cu sondă și contracolorant trebuie păstrate la întuneric.



Sonda rămâne stabilă pe întreaga durată a ciclurilor de congelare-decongelare, produse în timpul utilizării normale (un ciclu constituind scoaterea sondei din congelator și punerea ei la loc în congelator), și este fotostabilă timp de maximum 48 de ore după expunere la iluminare continuă. Trebuie depuse toate eforturile pentru a limita expunerea la lumină și modificările de temperatură.

### Echipe și materiale necesare, dar neincluse în setul de livrare

Trebuie utilizate echipamente calibrate:

1. Placă fierbinte (cu placă solidă și control precis al temperaturii până la 80 °C)
2. Micropipete cu volum variabil, calibrate și vârfuri, în intervalul 1 µl - 200 µl
3. Baie de apă cu control precis al temperaturii la 37 °C și 72 °C
4. Eprubete de microcentrifugă (0,5 ml)
5. Microscop de fluorescență (vă rugăm să consultați secțiunea Recomandare privind microscopul de fluorescență)
6. Microscop în contrast de fază
7. Vase Coplin din plastic, ceramică sau sticlă rezistentă la căldură, curate
8. Pensă
9. pH-metru calibrat (sau benzi indicatoare de pH capabile să măsoare valori ale pH-ului de 6,5 - 8,0)
10. Recipient umidificat
11. Ulei de imersie pentru lentile de microscop de grad de fluorescență
12. Centrifugă pentru banc de lucru
13. Lame de microscop
14. Lamele de 24x24 mm
15. Cronometru
16. Incubator la 37 °C
17. Adeziv din soluție de cauciuc
18. Mixer vortex
19. Cilindri gradati
20. Agitator magnetic
21. Termometru calibrat

### Echipe opționale, care nu sunt furnizate

1. Camera de uscare de citogenetică

### Reactivi necesari, dar care nu sunt furnizați

1. Soluție salină - citrat de sodiu (SSC - saline-sodium citrate) 20x
2. Etanol 100%
3. Tween-20
4. Hidroxid de sodiu (NaOH) 1M
5. Acid clorhidric (HCl) 1M
6. Apă purificată

### Recomandare privind microscopul de fluorescență

Utilizați o lampă cu mercur de 100 wați sau echivalent și obiective plane apocromate cu imersie în ulei de 60/63x sau 100x pentru vizualizare optimă. Fluoroforii utilizați în acest set de sonde vor fi excitați și vor emite la următoarele lungimi de undă:

Fluorofor	Excitația <sub>max</sub> [nm]	Emisia <sub>max</sub> [nm]
Verde	495	521
Roșu	596	615

Asigurați-vă de atașarea la microscop a unor filtre de excitație și emisie adecvate care acoperă lungimile de undă enumerate mai sus. Utilizați un filtru cu bandă de trecere triplă DAPI/spectru verde/spectru roșu sau un filtru cu bandă de trecere dublă spectru verde/spectru roșu pentru vizualizarea simultană optimă a fluoroforilor de culoare verde și roșie.

Verificați microscopul de fluorescență înainte de utilizare, pentru a vă asigura că acesta funcționează corect. Utilizați ulei de imersie potrivit pentru microscopia de fluorescență și formulat pentru autofluorescență redusă. Evitați amestecul agentului anti-diminuare a colorării DAPI cu uleiul de imersie pentru microscop, deoarece acest lucru ar estompa semnalele. Urmăriți recomandările producătorului cu privire la durata de viață a lămpii și vârsta filtrelor.

### Prepararea probelor

Kitul este conceput pentru utilizarea pe suspensii de celule de origine hematologică, fixate în soluție Carnoy (metanol/acid acetic 3:1), care sunt

preparate în conformitate cu ghidurile laboratorului sau instituției. Preparați probele uscate la aer pe lame de microscop în conformitate cu procedurile standard de citogenetică. *Manualul de laborator de analize citogenetice (Cytogenetics Laboratory Manual)* al AGT (Association of Genetic Technologists) conține recomandări pentru colectarea speciemenelor, cultura, recoltarea și crearea lamelor<sup>12</sup>.

#### Prepararea soluțiilor

##### Soluțiile de etanol

Diluati etanol 100% cu apă purificată prin utilizarea următoarelor proporții și amestecați temeinic:

- Etanol 70% - 7 părți etanol 100% la 3 părți apă purificată
- Etanol 85% - 8,5 părți etanol 100% la 1,5 părți apă purificată

Păstrați soluțiile timp de maximum 6 luni la temperatura camerei, într-un recipient ermetic.

##### Soluție SSC 2x

Diluati 1 parte soluție SSC 20x cu 9 părți apă purificată și amestecați temeinic. Verificați pH-ul și ajustați la pH de 7,0 prin utilizarea de NaOH sau HCl, după cum este necesar. Păstrați soluția timp de maximum 4 săptămâni la temperatura camerei într-un recipient ermetic.

##### Soluție SSC 0,4x

Diluati 1 parte soluție SSC 20x cu 49 părți apă purificată și amestecați temeinic. Verificați pH-ul și ajustați la pH de 7,0 prin utilizarea de NaOH sau HCl, după cum este necesar. Păstrați soluția timp de maximum 4 săptămâni la temperatura camerei într-un recipient ermetic.

##### Soluție SSC 2x, Tween-20 0,05%

Diluati 1 parte soluție SSC 20x cu 9 părți apă purificată. Adăugați 5 µl de Tween-20 per 10 ml și amestecați temeinic. Verificați pH-ul și ajustați la pH de 7,0 prin utilizarea de NaOH sau HCl, după cum este necesar. Păstrați soluția timp de maximum 4 săptămâni la temperatura camerei într-un recipient ermetic.

#### Protocolul FISH

(Notă: Asigurați-vă de faptul că expunerea sondei și a contracolorantului la luminile din laborator este limitată în toate momentele temporale.)

#### Prepararea lamei

1. Depuneți punctiform proba de celule pe o lamă de microscop din sticlă. Lăsați să se usuce. (**Opțional, dacă utilizați o cameră de uscare destinată analizelor citogenetice:** lamele trebuie plasate într-o cameră de uscare pentru analize citogenetice. Camera trebuie să funcționeze la aproximativ 25 °C și umiditate de 50% pentru depunerea punctiformă optimă a probei de celule. Dacă nu este disponibilă o cameră de uscare de citogenetică, utilizați ca alternativă o hotă.)
2. Imersați lama în SSC 2x timp de 2 minute la temperatura camerei (RT - room temperature), fără agitare.
3. Deshidrați în serii de etanol (70%, 85% și 100%), fiecare timp de 2 minute la RT.
4. Lăsați să se usuce.

#### Pre-denaturarea

5. Scoateți sonda din congelator și lăsați-o să se încălzească până la temperatura camerei. Centrifugați scurt eprubetele înainte de utilizare.
6. Asigurați-vă de faptul că soluția de sondă este amestecată uniform, cu o pipetă.
7. Îndepărtați 10 µl de sondă per test și transferați într-o eprubetă de microcentrifugă. Puneți rapid la loc în congelator sonda rămasă.
8. Plasați sonda și lama cu probă pentru preîncălzire pe o placă fierbinte de 37 °C (+/- 1 °C) timp de 5 minute.
9. Depuneți punctiform 10 µl de amestec de sondă pe proba de celule și aplicați cu atenție o lamelă. Sigilați cu adeziv din soluție de cauciuc și lăsați adezivul să se usuce complet.

#### Denaturarea

10. Denaturați simultan proba și sonda prin încălzirea lamei pe o placă fierbinte la 75 °C (+/- 1 °C) timp de 2 minute.

#### Hibridizarea

11. Plasați lama într-un recipient umed, impermeabil pentru lumină, la 37 °C (+/- 1 °C) și lăsați-o să stea peste noapte.

#### Spălările post-hibridizare

12. Scoateți DAPI din congelator și lăsați să se încălzească la RT.
13. Îndepărtați cu atenție lamela și toate urmele de adeziv.
14. Imersați lama în SSC 0,4x (pH 7,0) la 72 °C (+/- 1 °C) timp de 2 minute fără agitare.
15. Lăsați lama să se scurgă și imersați-o în SSC x2, Tween-20 0,05% la RT (pH 7,0) timp de 30 secunde fără agitare.
16. Lăsați lama să se scurgă și aplicați 10 µl de agent anti-diminuare a colorării DAPI pe fiecare probă.
17. Acoperiți cu o lamelă, îndepărtați orice eventuale bule și lăsați culoarea să se dezvolte la întuneric timp de 10 minute.
18. Vizualizați cu un microscop de fluorescență. (Consultați secțiunea **Recomandare privind microscopul de fluorescență.**)

#### Stabilitatea pe lame finite

Lamele finite rămân analizabile timp de maximum 1 lună dacă sunt păstrate la întuneric, la/sub RT.

#### Recomandări procedurale

1. Coacerea sau îmbătrânirea lamelor poate reduce semnalul de fluorescență
2. Condițiile de hibridizare pot fi influențate în mod negativ de utilizarea unor reactivi diferiți de cei furnizați sau recomandați de CytoceLL Ltd.
3. Utilizați un termometru calibrat pentru măsurarea temperaturilor soluțiilor, băilor de apă și incubatoarelor, deoarece aceste temperaturi sunt critice pentru performanța optimă a produsului.
4. Concentrațiile, pH-ul și temperaturile de spălare sunt importante, deoarece o strictețe redusă poate avea ca rezultat atașarea nespecifică a sondei, iar o strictețe prea mare poate avea ca rezultat lipsa de semnal
5. Denaturarea incompletă poate avea ca rezultat lipsa de semnal, iar denaturarea excesivă poate avea ca rezultat atașarea nespecifică
6. În urma hibridizării excesive se pot forma semnale suplimentare sau neașteptate
7. Înainte de utilizarea testului în scopuri diagnostice, utilizatorii trebuie să optimizeze protocolul pentru propriile lor probe
8. Condițiile suboptimale pot avea ca rezultat atașarea nespecifică, care poate fi interpretată eronat ca semnal al sondei

#### Interpretarea rezultatelor

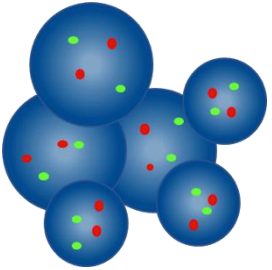
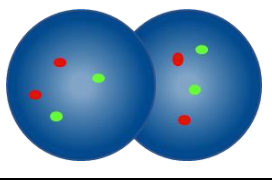
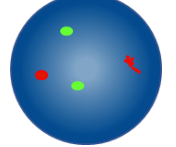
##### Evaluarea calității lamei

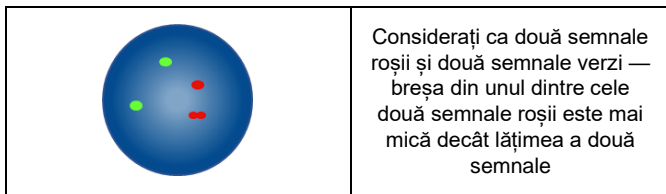
Lama nu trebuie analizată dacă:

- Semnalele sunt prea slabe pentru a fi analizate în filtre unice - pentru a continua analiza, semnalele trebuie să apară luminoase, distincte și ușor evaluabile
- Există un număr mare de celule agregate/suprapuse care obstrucționează analiza
- >50% dintre celule nu sunt hibridizate
- Există un exces de particule fluorescente între celule și/sau o ceață fluorescentă care interferează cu semnalele - în lamele optime, fundalul trebuie să apară întunecat sau negru și curat
- Marginile nucleilor celulelor nu pot fi distinse și nu sunt intacte

##### Linii directe privind analiza

- Fiecare probă trebuie analizată și interpretată de doi analiști. Orice discrepanță trebuie rezolvată prin evaluarea de către un al treilea analist
- Fiecare analist trebuie să fie calificat adecvat în conformitate cu standardele recunoscute la nivel național
- Fiecare analist trebuie să atribuie un scor în mod independent unui număr de 100 de nuclee pentru fiecare probă. Primul analist trebuie să înceapă analiza din partea stângă a lamei, iar cel de-al doilea analist, din partea dreaptă
- Fiecare analist trebuie să își documenteze rezultatele în fișe separate
- Analizați numai nucleele intacte, nu și pe cei suprapuși sau aglomerați sau nucleele acoperite de resturi citoplasmice sau cu un grad ridicat de autofluorescență
- Evitați zonele în care există un exces de resturi citoplasmice sau hibridizare nespecifică
- Intensitatea semnalului poate varia, chiar și în cazul unui singur nucleu. În astfel de cazuri, utilizați filtre unice și/sau ajustați planul focal
- În condiții suboptimale, semnalele pot apărea difuze. Dacă două semnale de aceeași culoare se ating unul pe celălalt, sau dacă distanța dintre ele nu este mai mare decât două lățimi de semnal, sau atunci când există un fir slab care conectează cele două semnale, considerați ca un singur semnal
- Dacă aveți orice dubii cu privire la caracterul analizabil al unei celule, nu o analizați

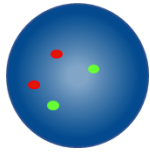
Linii directe privind analiza	
	Nu se analizează — nucleele se află prea aproape unele de celelalte pentru a le putea determina hotărâre
	Nucleele suprapuse nu se analizează — nu sunt vizibile toate zonele celor două nuclee
	Considerați ca două semnale roșii și două semnale verzi — unul dintre cele două semnale roșii este difuz



**Rezultate așteptate**

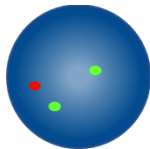
**Sonda 13q14.3 Deletion Probe**

Tiparul de semnale normal așteptat

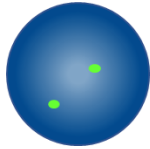


Într-o celulă normală se așteaptă detectarea a două semnale roșii și două semnale verzi (2R, 2V).

Modele de semnale anormale așteptate



Într-o celulă cu deleție hemizigotă a regiunii 13q14.3, modelul așteptat de semnale este: un semnal roșu și două verzi (1R, 2V).



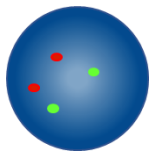
Într-o celulă cu deleție homozigotă, modelul așteptat de semnale este niciun semnal roșu și două semnale verzi (0R, 2V).

Delețiile 13q în LLC sunt recunoscute ca fiind eterogene; delețiile mici din cadrul regiunii 13q pot avea ca rezultat un mic semnal rezidual cu acest set de sonde.

Sunt posibile alte tipare de semnale în speciamele cu aneuploidie/necchilibrate.

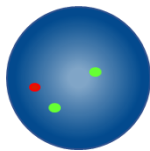
**Sonda ATM Deletion Probe**

Tiparul de semnale normal așteptat



Într-o celulă normală se așteaptă detectarea a două semnale roșii și două semnale verzi (2R, 2V).

Modelul de semnale anormale așteptat

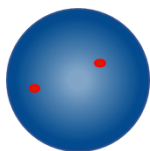


Într-o celulă cu o deleție ATM, modelul așteptat de semnale este: un semnal roșu și două semnale verzi (1R, 2V).

Sunt posibile alte tipare de semnale în speciamele cu aneuploidie/necchilibrate.

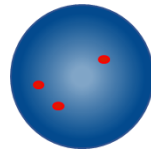
**Sonda Alpha Satellite 12 Plus pentru LLC**

Tiparul de semnale normal așteptat



Într-o celulă normală se așteaptă detectarea a două semnale roșii (2R).

Modelul de semnale anormale așteptat

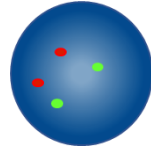


Într-o celulă cu trisomia 12, modelul așteptat de semnale este: trei semnale roșii (3R).

Sunt posibile alte tipare de semnale în speciamele cu aneuploidie/necchilibrate.

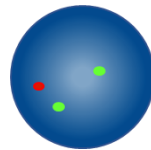
**Sonda P53 (TP53) Deletion Probe**

Tiparul de semnale normal așteptat



Într-o celulă normală se așteaptă detectarea a două semnale roșii și două semnale verzi (2R, 2V).

Modelul de semnale anormale așteptat

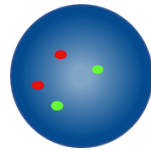


Într-o celulă cu o deleție P53, modelul așteptat de semnale este: un semnal roșu și două semnale verzi (1R, 2V).

Sunt posibile alte tipare de semnale în speciamele cu aneuploidie/necchilibrate.

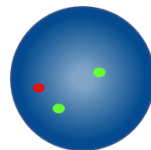
**Sonda MYB Deletion Probe**

Tiparul de semnale normal așteptat



Într-o celulă normală se așteaptă detectarea a două semnale roșii și două semnale verzi (2R, 2V).

Modelul de semnale anormale așteptat



Într-o celulă cu o deleție MYB, modelul așteptat de semnale este: un semnal roșu și două semnale verzi (1R, 2V).

Sunt posibile alte tipare de semnale în speciamele cu aneuploidie/necchilibrate.

**Reactivitate încrucișată cunoscută**

Sonda	Reactivitate încrucișată cunoscută
Sonda 13q14.3 Deletion Probe	Sonda verde 13qter poate demonstra hibridizare încrucișată cu centromerul cromozomului 19 și brațele p ale altor cromozomi.
Sonda ATM Deletion Probe	Sonda verde D11Z1 poate arăta până la 4 semnale de hibridizare încrucișată cu Xc și 17c.
Sonda Alpha Satellite 12 Plus pentru LLC	Sonda poate prezenta hibridizare încrucișată cu 3c, 6c, 7c și 10c.
Sonda P53 Deletion Probe	Sonda verde D17Z1 poate demonstra hibridizare încrucișată cu centromerii cromozomilor 11 și X.
Sonda MYB Deletion Probe	Nu este cunoscută nicio hibridizare încrucișată

**Raportarea evenimentelor adverse**

Dacă credeți că dispozitivul a funcționat necorespunzător sau a suferit o deteriorare a caracteristicilor de performanță, care este posibil să fi contribuit la producerea unui eveniment advers (de exemplu, diagnosticare întârziată sau eronată, tratament întârziat sau inadecvat), acest lucru trebuie raportat imediat producătorului (e-mail: [vigilance@ogt.com](mailto:vigilance@ogt.com)).

Dacă acest lucru este aplicabil, evenimentul trebuie raportat, de asemenea, autorității competente la nivel național. O listă de puncte de contact de vigență se găsește la: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

#### Caracteristici de performanță specifice

##### Specificitatea analitică

Specificitatea analitică este procentul de semnale care se hibridizează la locul corect și nu în altă locație. Specificitatea analitică a fost stabilită prin analizarea unui total de 200 locusuri țintă. Specificitatea analitică a fost calculată ca numărul de semnale FISH care se hibridizează la locul corect împărțit la numărul total de semnale FISH hibridizate.

Tabelul 1. Specificitatea analitică a CLL Plus Screening Panel

Kit	Sonda	Locusul țintă	Nr. de semnale hibridizate la locusul corect	Nr. total de semnale hibridizate	Specificitatea (%)
Sonda 13q14.3 Deletion Probe	Roșu 13q14.3	13q14.3	200	200	100
	Verde 13qter, 13q34	13qter, 13q34	200	200	100
Sonda ATM Deletion Probe	Roșu ATM	11q22.3	200	200	100
	Verde D11Z1	11q11.1-q11.1	200	200	100
Sonda Alpha Satellite 12 Plus pentru LLC	D12Z3 roșu	12p11.1-q11.1	200	200	100
Sonda P53 Deletion Probe	Roșu P53	17p13.1	200	200	100
	Verde D17Z1	17p11.1-q11.1	200	200	100
Sonda MYB Deletion Probe	Roșu MYB	6q23	200	200	100
	Verde D6Z1	6p11.1-q11.1	200	200	100

##### Sensibilitatea analitică

Sensibilitatea analitică este procentul de celule de interfază cărora li se poate atribui un scor cu tiparul de semnale normal așteptat. Sensibilitatea analitică a fost stabilită prin analizarea celulelor în interfază din diferite probe normale. Sensibilitatea a fost calculată ca procentul de celule cărora li se poate atribui un scor cu tiparul de semnale așteptat (cu un interval de încredere de 95%).

Tabelul 2. Sensibilitatea analitică a CLL Plus Screening Panel

Kit	Nr. de celule cu tipare de semnale așteptate	Nr. de celule cu semnale cărora li se poate atribui un scor	Sensibilitatea (%)	Interval de încredere de 95%
Sonda 13q14.3 Deletion Probe	481	500	96,2	1,6
Sonda ATM Deletion Probe	482	500	96,4	1,0
Sonda Alpha Satellite 12 Plus pentru LLC	487	500	97,4	1,0
Sonda P53 Deletion Probe	471	500	94,2	2,7
Sonda MYB Deletion Probe	479	500	95,8	1,7

##### Caracterizarea valorilor limită de normalitate

Valoarea limită de normalitate, în asociere cu sondele FISH, este procentul maxim de celule în interfază cărora li se poate atribui un scor cu un tipar de semnale anormal specific la care proba este considerată normală pentru tiparul de semnale respectiv.

Valoarea limită de normalitate a fost stabilită prin utilizarea de probe provenite de la pacienți normali și pozitivi. Pentru fiecare probă, au fost înregistrate tiparele de semnale ale 100 de celule. A fost calculat indicele Youden pentru a afla valoarea limită pentru care sensibilitatea + specificitatea-1 este maximizată.

Tabelul 3. Caracterizarea valorilor normale de referință ale CLL Plus Screening Panel

Kit	Tipar de semnale anormal	Indicele Youden	Limită de normalitate (%)
Sonda 13q14.3 Deletion Probe	1R, 2V sau 0R, 2V	0,95	7
Sonda ATM Deletion Probe	1R, 2V	0,99	9
Sonda Alpha Satellite 12 Plus pentru LLC	3R	0,99	3
Sonda P53 Deletion Probe	1R, 2V	0,90	10
Sonda MYB Deletion Probe	1R, 2V	0,97	8

Laboratoarele trebuie să verifice valorile de referință în baza propriilor date<sup>13, 14</sup>.

##### Precizia și reproductibilitatea

Precizia este un indicator al variației naturale a unui test atunci când este repetat de mai multe ori în aceleași condiții. Aceasta a fost evaluată prin analizarea unor repetări ale aceleiași serii de fabricație al sondei testate pe aceeași probă, în aceleași condiții, în aceeași zi.

Reproductibilitatea este un indicator al variabilității unui test și a fost stabilită în termeni de variabilitate între probe, între zile și între serii. Reproducibilitatea între zile a fost evaluată prin analizarea aceleiași probe în trei zile diferite. Reproducibilitatea între serii a fost evaluată prin analizarea aceleiași probe prin utilizarea a trei serii de fabricație diferite ale sondei într-o singură zi. Reproducibilitatea între probe a fost evaluată prin analizarea a trei replicare ale unei probe într-o singură zi. Pentru fiecare probă, au fost înregistrate tiparele de semnale ale 100 de celule în interfază și a fost calculat procentul de celule cu tiparul de semnale așteptat.

Reproductibilitatea și precizia au fost calculate ca deviație standard (STDEV - Standard Deviation) între replicare pentru fiecare variabilă și STDEV globală medie.

Tabelul 4. Reproducibilitatea și precizia CLL Plus Screening Panel

Variabilă	Deviația standard (STDEV - Standard Deviation)				
	Sonda 13q14.3 Deletion Probe	Sonda ATM Deletion Probe	Sonda Alpha Satellite 12 Plus pentru LLC	Sonda P53 Deletion Probe	Sonda MYB Deletion Probe
Precizia	0,72	0,38	0,72	2,63	1,09
Între probe	0,58	0,38	0,89	2,30	1,19
Între zile	0,96	0,58	0,51	2,39	1,20
Între serii	1,40	1,27	1,27	1,68	0,90
Deviația globală	1,03	1,01	1,15	2,16	1,06

##### Performanța clinică

Performanța clinică a fost stabilită pe o probă reprezentativă pentru populația destinată pentru produs. Pentru fiecare probă, au fost înregistrate tiparele de semnale ale ≥ 100 de celule în interfază. A fost efectuată o determinare de normalitate/anormalitate prin compararea procentului de celule cu tipar de semnale anormal specific cu valoarea limită de normalitate. Apoi, rezultatele au fost comparate cu situația cunoscută a probei.

Au fost analizate rezultatele datelor clinice cu scopul de a genera valori privind sensibilitatea, specificitatea și valori limită, prin utilizarea unei abordări unidimensionale.

Tabelul 5. Performanța clinică a CLL Plus Screening Panel

Sonda	Sensibilitate clinică (rata de rezultate adevărat pozitive - TPR, true positive rate)	Specificitate clinică (rata de rezultate adevărat negative - TNR, true negative rate)	Rata de rezultate fals pozitive (FPR, false positive rate) = 1 - specificitatea
Sonda 13q14.3 Deletion Probe	96,3%	99,1%	0,9%
Sonda ATM Deletion Probe	100%	99,2%	0,8%
Sonda Alpha Satellite 12 Plus pentru LLC	100%	100%	0%
Sonda P53 Deletion Probe	92,5%	97,1%	2,9%
Sonda MYB Deletion Probe	97,8%	99,6%	0,4%

##### Informații suplimentare

Pentru informații suplimentare referitoare la produs, vă rugăm să contactați departamentul de asistență tehnică CytoCell.

Tel: +44 (0)1223 294048

E-mail: techsupport@cytoCELL.com

Internet: www.ogt.com

#### Referințe

1. Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC,2017
2. Puiggros *et al.*, Biomed Res Int 2014;1-13
3. Rossi *et al.*, Blood 2013;121(8):1403-1412
4. Juliusson G *et al.*, N Eng J Med 1990;323:720-4
5. Kasar *et al.*, Nature Communications 2015;6:1-12
6. Hammarsund M *et al.*, FEBS Letters 2004;556:75-80
7. Baliakas P, *et al.*, Leukemia. 2014;(April):1-8
8. Stankovic *et al.*, Blood 2004;103(1):291-300
9. Dohner *et al.*, N Eng J Med 2000;343:1910-1916
10. Clappier *et al.*, Blood 2007;110(4):1251-1261
11. Stilgenbauer *et al.*, Leukemia,1999;13:1331-1334
12. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) The *AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
13. 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.
14. 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.

#### Ghidul simbolurilor

<b>REF</b>	<b>ro:</b> Număr de catalog
	<b>ro:</b> Dispozitiv medical pentru diagnostic <i>in vitro</i>
	<b>ro:</b> Seria de fabricație
	<b>ro:</b> Consultați instrucțiunile de utilizare
	<b>ro:</b> Producător
	<b>ro:</b> Data de expirare
	<b>ro:</b> Limită de temperatură
	<b>ro:</b> A se feri de lumina solară
	<b>ro:</b> Conține o cantitate suficientă pentru <n> teste
	<b>ro:</b> Conținut

#### Brevete și mărci comerciale

CytoCell este o marcă înregistrată a CytoCELL Ltd.



**CytoCELL Ltd.**  
Oxford Gene Technology,  
418 Cambridge Science Park,  
Milton Road,  
Cambridge, CB4 0PZ, Marea Britanie  
Tel: +44(0)1223 294048  
Fax: +44(0)1223 294986  
E-mail: probes@cytoCELL.com  
Internet: www.ogt.com