



A Sysmex Group Company



Kasutusjuhend

REF: LPH 087-S / LPH 087

CLL Plus Screening Panel



AINULT ERIALASEKS KASUTAMISEKS



www.cytocell.com

Lisateave ja muud keeled on saadaval aadressil www.ogt.com

Piirangud

Seade on loodud tuvastama genoomilisi kadusid/lisasid sondikomplekti punase ja rohelise klooniga seotud piirkonnas, mis sisaldab 13q14.3, *ATM*, *P53 (TP53)* ja *MYB* piirkondi ja 12. kromosoomi tsentromeeri. Piirkondadest väljapoole jäävaid genoomilisi kadusid ja lisasid või piirkonna osalisi kadusid ja lisasid ei pruugita selle tootega tuvastada.

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

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

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

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

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

Kasutusotstarve

CLL Plus Screening Panel on kvalitatiivne, mitteautomaatne, fluorestsents *in situ* hübriidisaatsiooni (FISH) uuring, mida kasutatakse 11. kromosoomi 11q22.3 piirkonna, 17. kromosoomi 17p13.1 piirkonna või 13. kromosoomi 13q14.2–q14.3 piirkonna kromosomaalsete deletsioonide ja/või 12. kromosoomi tsentromeeri piirkonna lisade ja/või 6. kromosoomi asukohas 6q23.3 MYB piirkonna deletsioonide tuvastamiseks Carnoy lahuses (3:1 metanool/atseethape) fikseeritud hematoloogiliselt tuletatud rakususpensioonides, mis pärinevad kinnitatud või kahtlustatud kroonilise lümfotsütaarse leukeemiaga (CLL) patsientidelt.

Näidustused

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

Analüüsi põhimõte

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

Sondi teave

Kroonilise lümfotsütaarse leukeemia (CLL) hematoloogiliste sondide ja alfa-satelliidi sondi valik.

Alpha Satellite 12 Plus for CLL

12. trisoomia on rekurrentne kõrvalekalle CLL-ga ja seda esineb 20% juhtudest ning sageli avaldub see kordumatu tsütogeneetilise aberratsioonina (40–60% 12. trisoomia juhtudest)². 12. trisoomiaga patsiendid on klassifikatsiooni järgi madal riskiga ilma muude geneetiliste kahjustuteta³. Toode on saadaval ka 5 (LPH 069-S) ja 10 (LPH 069) analüüsikomplekti suuruses ja on optimeeritud üleöö hübriidiseerimiseks.

13q14.3

13q14 mõjutavad deletsioonid on kõige sagedasemad CLL-i struktuuralsed geneetilised aberratsioonid^{3,4,5}. On leitud, et piirkonnas on heterosügootne deletsioon 30–60% ja homosügootne deletsiooni 10–20% KLL-ga patsientides⁶. 13q14 deletsioonidega patsiendid on klassifikatsiooni järgi väga madal riskiga ilma muude geneetiliste kahjustuteta³.

P53 (TP53) (17p13.1)

TP53 (*tuumorivalk p53*) geen asukohas 17p13.1 on üks olulisemaid tuumorsuppressorgeene. See toimib tugeva transkriptsioonifaktorina, millel on põhiline roll geneetilise stabiilsuse säilitamisel. TP53 kadu on leitud 10% CLL-ga patsientidel ja seda peetakse halvima prognoosi markeriks^{3,7}.

ATM (11q22.3)

ATM (*ATM-i seriini/treoniini kinaas*) geen asukohas 11q22.3 on oluline kontrollgeen, mis on seotud rakukahjustuse kontrollimisega, ja selle funktsioon on hinnata raku DNA kahjustuse taset ja üritada kahjustusi parandada, fosforüüldes põhisubstraate, mis osalevad DNA kahjustuse signaalirajas⁹. ATM-i kadu on leitud 18% CLL-ga patsientidel ja seda peetakse CLL-i halva prognoosi markeriks⁹.

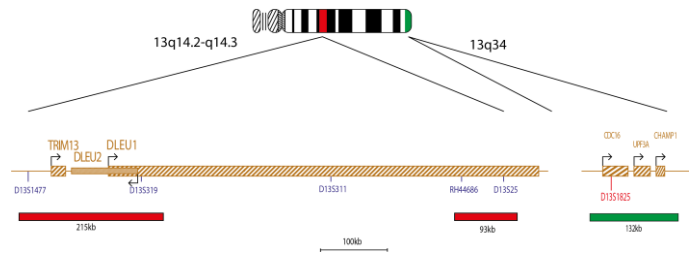
MYB (6q23.3)

Kromosoomi 6q deletsioonid on CLL-i puhul rekurrentsed. MYB (*MYB protoonkogeen, transkriptsioonifaktor*) geen on ülioluline hematopoetiliste rakkude proliferatsioonil ja diferentseerumisel^{10,11}. See asub ribas 6q23.3 ja on 6q deletsiooni marker.

Sondi spetsifikatsioon

Sond 13q14.3 deletsiooni sond

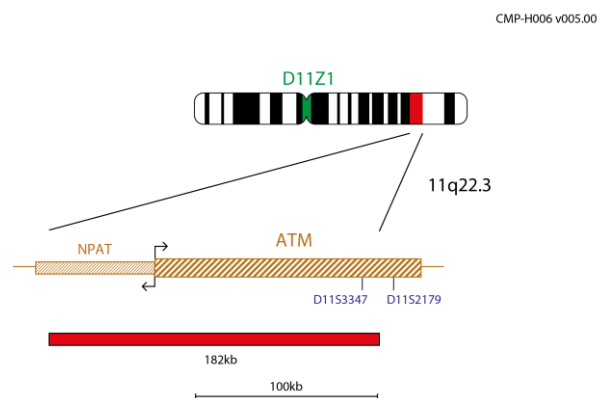
13q14.2–q14.3, punane
13qter, 13q34, roheline



Punasega märgistatud 13q14.2–14.3 sondid katavad *D13S319* ja *D13S25* markereid. Rohelisega märgistatud 13qter subtelomeeri spetsiifiline sond (kloon 163C9) võimaldab tuvastada 13. kromosoomi ja toimib kontrollsondina.

ATM-i deletsiooni sond

ATM, 11q22.3, punane
D11Z1, 11p11.1–q11.1, roheline



ATM sond 182 kb, märgistatud punasega ja katab NPAT geeni telomeerset otsa ja ATM geeni tsentromeerset otsa vahetult markerist *D11S3347* kaugemale. Sondi segu sisaldab ka rohelisega märgistatud 11. tsentromeeri (*D11Z1*) kontrollsondi.

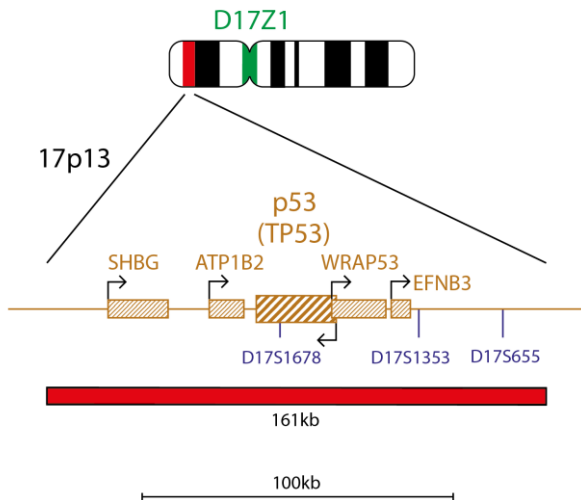


Sond Alpha-Satellite 12 Plus Probe on punasega märgistatud korduva järjestuse sond, mis tuvastab tsentromeerse korduva järjestuse D12Z3.

P53 (TP53) Deletion Probe

P53, 17p13, punane
D17Z1, 17p11.1-q11.1, roheline

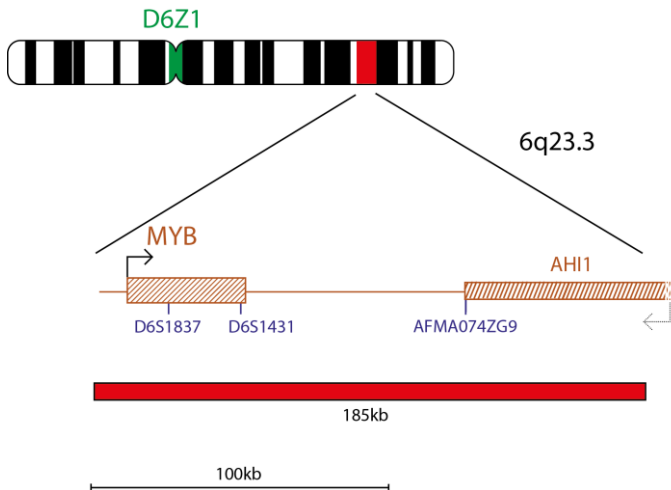
CMP-H039 V007.00



p53 (TP53) sond on punasega märgistatud 161 kb ja see katab kogu p53 (TP53) geeni ja piirnevaid piirkondi. Sondisegu sisaldab ka rohelisega märgistatud 17. tsentromeeri (D17Z1) kontrollsondi.

MYB-i deletsiooni sond

MYB, 6q23.3, punane
D6Z1, 6p11.1-q11.1, roheline



MYB-i sondi segu sisaldab kogu MYB-i geeni ja AHI1 geeni tsentromeerset osa hõlmavat geeni suhtes telomeerset piirkonna punasega märgistatud 185 kb sondi. Sondisegu sisaldab ka rohelisega märgistatud 6. tsentromeeri (D6Z1) kontrollsondi.

Tarnitavad materjalid

Sondid: 50 µl viali kohta (5 analüüsi) või 100 µl viali kohta (10 analüüsi)
Sondid tarnitakse hübriidiseerimislahusega eelsegatuna (formamiid; dekstraansulfaat; naatriumsitraadi soolalahus (saline-sodium citrate, SSC)) ja on valmis kasutamiseks.

Vastandvärv 150 µl viali kohta (15 analüüsi)

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

Hoiatused ja ettevaatusabinõud

- In vitro diagnostiliseks kasutamiseks. Ainult erialaseks kasutamiseks.
- DNA sondide ja DAPI vastandvärvi käsitsemisel kandke kindaid.

- Sondi segud sisaldavad formamiidi, mis on teratogeenne; ärge hingake sisse auru ning vältige kontakti nahaga. Käsitsege ettevaatlikult; kasutage kindaid ja laborikittlit.
- DAPI on potentsiaalne kartsinogeen. Käsitsege ettevaatlikult; kasutage kindaid ja laborikittlit.
- Vabaneege kõigist ohtlikest jäätmetest oma asutuse ohtlike jäätmete käitlemise eeskirjade kohaselt.
- Kasutajad peavad olema suutelised eristama punast, sinist ja rohelist värvi
- Esitatud protokollid ja reaktiivide järgimata jätmise võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.
- Sondi ei tohiks lahjendada ega segada teiste sondidega.
- Sondi 10µl kasutamata jätmise protokollid denatureerimisees etapis võib mõjutada analüüsi toimivust ja põhjustada valepositiivseid/valenegatiivseid tulemusi.

Säilitamine ja käsitsemine

Komplekti Aquarius® tuleks säilitada külmutatuna temperatuurivahemikus -25...-15 °C kuni kehtivusaja lõpuni, mis on esitatud toote etiketil. Sondi ja vastandvärvi vialidele tuleb säilitada pimedas.



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

Seadmed ja materjalid mis on vajalikud, kuid mida ei tarnita

Kasutada tuleb kalibreeritud seadmeid.

- Kuumutusplaat (täisplaadi ja täpse temperatuuriregulaatoriga kuni 80 °C)
- Kalibreeritud erineva mahuga mikropipetid ja otsikud vahemikus 1–200 µl
- Vesivann, täpse temperatuuriregulaatoriga 37 °C ja 72 °C juures
- Mikrotsentrifuugi katsutid (0,5 ml)
- Fuorestsentsmikroskoop (vt fuorestsentsmikroskoobi soovitude lõiku)
- Faasikontrastmikroskoop
- Läbipaistvast plastist, keraamilised või kuumakindlast klaasist Coplini anumad
- Pintsetid
- Kalibreeritud pH-meeter (või pH indikaatorribad vahemikus pH 6,5–8,0)
- Niiskuskamber
- Fuorestsentsmikroskoobi immersioonõli
- Tsentrifuug
- Mikroskoobi alusklasisid
- 24x24 mm katteklasisid
- Taimer
- 37 °C inkubaator
- Katteklaasi liim
- Vortex-segisti
- Gradueeritud silindrid
- Magnetsegisti
- Kalibreeritud termomeeter

Valikulised seadmed, mida ei tarnita

- Tsütogeneetiline kuivatuskamber

Vajalikud reaktiivid, mida ei tarnita

- 20-kordne naatriumsitraadi soolalahus (SSC)
- 100%-line etanool
- Tween-20
- 1M naatriumhüdroksiid (NaOH)
- 1M vesinikkloriid (HCl)
- Destilleeritud vesi

Fuorestsentsmikroskoobi soovitus

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

Fluorofoor	Eksitatsioon _{max} [nm]	Emissioon _{max} [nm]
Roheline	495	521
Punane	596	615

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

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

Proovi ettevalmistamine

Komplekt on loodud kasutamiseks hematoloogiliselt tuletatud rakususpensioonidega, mis on fikseeritud Carnoy lahuses (3:1 metanool/atseetahape) ja ette valmistatud vastavalt labori või asutuse eeskirjadele. Valmistage ette õhu käes kuivatatud mikroskoobi alusklasisid vastavalt tsütogeneetika standardprotseduuridele. AGT Tsütogeneetika laborijuhend

sisaldab soovitusi proovi kogumise, kultuuri istutamise, kogumise ja slaidi tegemise kohta¹².

Lahuse ettevalmistamine

Etanooli lahused

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

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

2x SSC lahus

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

0,4 x SSC lahus

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

2x SSC, 0,05% Tween-20 lahus

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

FISH-i protokoll

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

Slaidi ettevalmistamine

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

Enne denaturatsiooni

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

Denaturatsioon

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

Hübridisatsioon

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

Hübridisatsioonijärgsed pesud

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

Valmis slaidide stabiilsus

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

Protseduuri soovitus

1. Slaidide keetmine või aegumine võib fluorestsentssignaali nõrgendada.
2. Cytocell Ltd poolt toodetud või soovitatud reaktiivide asemel muude reaktiivide kasutamine võib ebasoodsalt mõjutada hübridiseerimistingimusi
3. Kasutage lahuste, vesivannide ja inkubaatorite temperatuuri mõõtmisel kalibreeritud termomeetrit, sest need temperatuurid on toote optimaalseks toimimiseks kriitilise tähtsusega.
4. Pesukontsentratsioonid, pH ja temperatuurid on olulised, kuna vähene rangus võib põhjustada sondi ebaspetsiifilist sidumist ja liiga suur rangus võib põhjustada signaali puudumist

5. Mittetäielik denatureerimine võib põhjustada signaali puudumist ja üleliigne denatureerimine võib samuti põhjustada ebaspetsiifilist seondumist
6. Üleliigne hübridiseerimine võib põhjustada täiendavaid või ootamatuid signaale
7. Kasutajad peaksid enne analüüsi kasutamist diagnostilisel eesmärgil protokollil oma proovidega optimeerima
8. Suboptimaalsed tingimused võivad põhjustada ebaspetsiifilist seondumist, mida võidakse ekslikult sondi signaalina tõlgendada

Tulemuste tõlgendamine

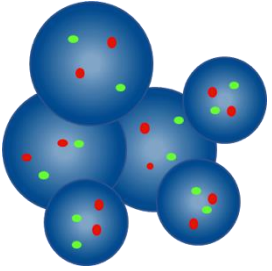
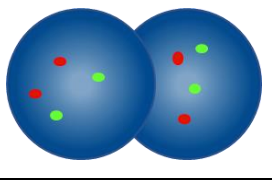
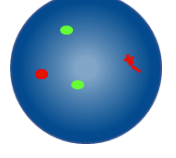
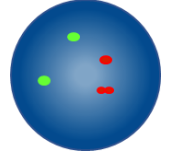
Slaidi kvaliteedi hindamine

Slaidi ei tohiks analüüsida, kui

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

Analüüsi eeskirjad

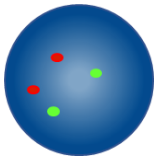
- Igat proovi peaks analüüsima ja tõlgendama kaks analüütikut. Kõik lahknemused tuleks lahendada kolmanda analüütiku hinnanguga
- Analüütikud peaksid olema riiklikult tunnustatud standardite kohase väljaõppega.
- Iga analüütik peaks hindama eraldi 100 tuuma iga proovi kohta. Esimene analüütik peaks alustama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

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

Eeldatavad tulemused

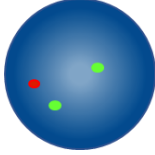
Sond 13q14.3 deletsiooni sond

Eeldatav normaalne signaalimuster

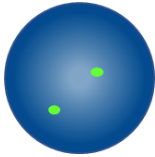


Normaalse raku eeldatav tulemus on kaks punast ja kaks rohelist signaali (2P, 2R).

Eeldatavad ebanormaalsed signaalimustrid



Hemisügootse 13q14.3 deletsiooniga rakus on eeldatav signaalimuster üks punane ja kaks rohelist signaali (1P, 2R).



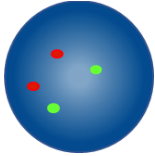
Homosügootse deletsiooniga rakus on eeldatav signaalimuster puuduv punane ja kaks rohelist signaali (0P, 2R).

13q kustutusi CLL-is tunnustatakse heterogeensetena; väikse kustutusega regioonis 13q võib selle sondikomplektiga kaasnedu väike jääksignaali.

Aneuploidsete/tasakaalustamata proovides võivad esineda teised signaalimustrid.

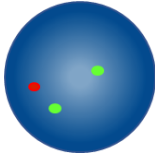
ATM-i deletsiooni sond

Eeldatav normaalne signaalimuster



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

Eeldatav ebanormaalne signaalimuster

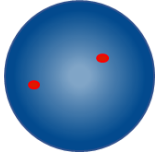


ATM-i deletsiooniga rakus on eeldatav signaalimuster üks punane ja kaks rohelist signaali (1P, 2R).

Aneuploidsete/tasakaalustamata proovides võivad esineda teised signaalimustrid.

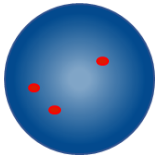
Alpha Satellite 12 Plus for CLL

Eeldatav normaalne signaalimuster



Normaalse raku eeldatav tulemus on kaks punast signaali (2P).

Eeldatav ebanormaalne signaalimuster

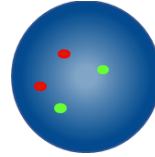


12. trisoomiaga rakus on eeldatav signaalimuster kolm punast signaali (3P).

Aneuploidsete/tasakaalustamata proovides võivad esineda teised signaalimustrid.

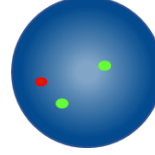
Sond P53 (TP53) deletsiooni sond

Eeldatav normaalne signaalimuster



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

Eeldatav ebanormaalne signaalimuster

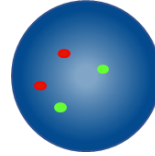


P53 deletsiooniga rakus on eeldatav signaalimuster üks punane ja kaks rohelist signaali (1P, 2R).

Aneuploidsete/tasakaalustamata proovides võivad esineda teised signaalimustrid.

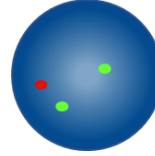
MYB-i deletsiooni sond

Eeldatav normaalne signaalimuster



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

Eeldatav ebanormaalne signaalimuster



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

Aneuploidsete/tasakaalustamata proovides võivad esineda teised signaalimustrid.

Teadaolev ristreaktiivsus

Sond	Teadaolev ristreaktiivsus
Sond 13q14.3 Deletion Probe	Roheline 13qter sond võib näidata ristiühendatavust 19. kromosoomi tsentromeeri ja muude kromosoomide p-õlgade suhtes.
Sond ATM Deletion Probe	Roheline D11Z1 sond võib näidata kuni 4 ristiühendatavust signaali Xc ja 17c.
Sond Alpha Satellite 12 Plus for CLL	Sond võib näidata ristiühendatavust 3c, 6c, 7c ja 10c suhtes.
Sond P53 Deletion Probe	Roheline D17Z1 sond võib näidata ristiühendatavust 11. kromosoomi ja X-i tsentromeetri suhtes.
Sond MYB Deletion Probe	Teadaolev ristreaktiivsus puudub.

Kõrvalnähtudest teatamine

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

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

Spetsiifilised toimivuskarakteristikud

Analüütiline spetsiifilisus

Analüütiline spetsiifilisus on vaid õige lookusega hübriidseeritud signaalide protsentarv. Analüütiline spetsiifilisus saavutati kokku 200 sihtmärk-lookuse analüüsimisel. Analüütiline spetsiifilisus arvatati, jagades õige lookusega hübriidseeritud FISH-i signaalide arvu kogu hübriidseeritud FISH-i signaali arvuga.

Tabel 1. CLL *Plus* Screening Panel analüütiline spetsiifilisus

Komplekt	Sond	Sihtmärklõukus	Õige lookusega hübridiseeritud signaalide arv	Hübridiseeritud signaalide koguarv	Spetsiifilisus (%)
Sond 13q14.3 Deletion Probe	Punane 13q14.3	13q14.3	200	200	100
	Roheline 13qter, 13q34	13qter, 13q34	200	200	100
Sond ATM Deletion Probe	Punane ATM	11q22.3	200	200	100
	Roheline D11Z1	11q11.1–q11.1	200	200	100
Sond Alpha Satellite 12 <i>Plus</i> for CLL	D12Z3 punane	12p11.1–q11.1	200	200	100
Sond P53 Deletion Probe	Punane P53	17p13.1	200	200	100
	Roheline D17Z1	17p11.1–q11.1	200	200	100
Sond MYB Deletion Probe	Punane MYB	6q23	200	200	100
	Roheline D6Z1	6p11.1–q11.1	200	200	100

Analüütiline tundlikkus

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

Tabel 2. CLL *Plus* Screening Panel analüütiline tundlikkus

Komplekt	Eeldatava signaalimustriga rakkude arv	Hinnatava signaaliga rakkude arv	Tundlikkus (%)	95% usaldusvahemik
Sond 13q14.3 Deletion Probe	481	500	96,2	1,6
Sond ATM Deletion Probe	482	500	96,4	1,0
Sond Alpha Satellite 12 <i>Plus</i> for CLL	487	500	97,4	1,0
Sond P53 Deletion Probe	471	500	94,2	2,7
Sond MYB Deletion Probe	479	500	95,8	1,7

Normaalse väljaarvamise piirväärtuste kirjeldus

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

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

Tabel 3. CLL *Plus* Screening Panel normaalse väljaarvamise piirväärtuste kirjeldus

Komplekt	Ebanormaalne signaalimuster	Youdeni koefitsient	Normaalne väljaarvamise piir (%)
Sond 13q14.3 Deletion Probe	1P, 2R või 0P, 2R	0,95	7
Sond ATM Deletion Probe	1P, 2R	0,99	9
Sond Alpha Satellite 12 <i>Plus</i> for CLL	3P	0,99	3
Sond P53 Deletion Probe	1P, 2R	0,90	10
Sond MYB Deletion Probe	1P, 2R	0,97	8

Laborid peavad oma andmete põhjal väljaarvamise piiri kinnitama^{13, 14}.

Täpsus ja reprodutseeritavus

Täpsus on analüüsi loomulik varieeruvus korduvalt, samades tingimustes läbiviimisel. Seda hinnati, analüüsides sama partii- ja numbriga sondi kordusanalüüsi samal proovil, samades tingimustes, samal päeval.

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

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

Tabel 4. CLL *Plus* Screening Panel reprodutseeritavus ja täpsus

Muutuja	Standardhälve (SH)				
	Sond 13q14.3 Deletion Probe	Sond ATM Deletion Probe	Sond Alpha Satellite 12 <i>Plus</i> for CLL	Sond P53 Deletion Probe	Sond MYB Deletion Probe
Täpsus	0,72	0,38	0,72	2,63	1,09
Proov-prooviga	0,58	0,38	0,89	2,30	1,19
Päev-päevaga	0,96	0,58	0,51	2,39	1,20
Partii-partiiga	1,40	1,27	1,27	1,68	0,90
Hälve	1,03	1,01	1,15	2,16	1,06

Kliiniline toimivus

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

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

Tabel 5. CLL *Plus* Screening Panel kliiniline toimivus

Sond	Kliiniline tundlikkus (tõeselt positiivsete määr) (true positive rate, TPR)	Kliiniline spetsiifilisus (tõeselt negatiivsete määr) (true negative rate, TNR)	Valepositiivsete määr (false positive rate, FPR) = 1 – spetsiifilisus
Sond 13q14.3 Deletion Probe	96,3%	99,1%	0,9%
Sond ATM Deletion Probe	100%	99,2%	0,8%
Sond Alpha Satellite 12 <i>Plus</i> for CLL	100%	100%	0%
Sond P53 Deletion Probe	92,5%	97,1%	2,9%
Sond MYB Deletion Probe	97,8%	99,6%	0,4%

Lisateave

Lisateavet saate kontakteerudes ettevõtte CytoCell tehnilise toe osakonnaga.

Tel: +44 (0)1223 294048










E-mail: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

Viited

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.

Sümbolite seletus

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

Patendid ja kaubamärgid

CytoCell on Cytocell Ltd registreeritud kaubamärk.



Cytocell Ltd.

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