



A Sysmex Group Company



Käyttöohje

REF: LPH 087-S / LPH 087

CLL Plus Screening Panel



VAIN AMMATTIKÄYTTÖÖN



www.cytocell.com

Lisätietoja ja muita kieliä saatavilla osoitteesta www.ogt.com

Rajoitukset

Laite on suunniteltu havaitsemaan genomien puutteita ja lisäyksiä alueilla, jotka ovat suurempia kuin tämän koetinsarjan punaisten ja vihreiden kloonien sitomat alueet, joihin sisältyvät 13q14.3-, *ATM*-, *P53 (TP53)*- ja *MYB*-alueet ja kromosomin 12 sentromeeri. Tämä tuote ei ehkä havaitse kyseisten alueiden ulkopuolisia genomien lisäyksiä tai puutteita tai osittaisia lisääntymistä tai puuttumista.

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

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

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

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

Tätä sarjaa ei ole validoitu mainitusta aiotusta käyttötarkoituksesta poikkeavaan käyttöön.

Aiottu käyttötarkoitus

CLL Plus Screening Panel on kvalitatiivinen, ei-automatisoitu FISH (fluorescence in situ hybridisation) -testi, jota käytetään kromosomien deleetioiden havaitsemiseen kromosomin 11 alueella 11q22.3, kromosomin 17 alueella 17p13.1 tai kromosomin 13 alueella 13q14.2-q14.3 ja/tai kromosomin 12 sentromeerialueen lisääntymisten ja/tai deleetioiden havaitsemiseen, joihin liittyy kromosomin 6 MYB-alue paikassa 6q23.3 Carnoy'n liuokseen (3:1 metanoli/etikkahappo) fiksoiduille, hematologisesti johdetuille solususpensioille potilailta, joilla on krooninen lymfaattinen leukemia (CLL).

Käyttöaiheet

Tämä tuote on suunniteltu käytettäväksi muiden kliinisten ja histopatologisten testien lisäksi vakiintuneissa diagnostiikan ja kliinisen hoidon hoitopoluissa, joissa tieto *P53 (TP53)*-, *ATM*-deleetion tai *D13S319*-deleetion tilasta ja/tai kromosomin 12 sentromeerin lisääntymisestä olisi tärkeää kliiniselle hoidolle.

Testin periaatteet

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

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

Koettimen tiedot

Valikoima hematologisia koettimia ja alfa-satelliittikoetin krooniselle lymfaattiselle leukemialle (CLL).

Alpha Satellite 12 Plus for CLL

12-trisomia on usein tavattu poikkeavuus CLL-potilailla, ja sitä tavataan 20 prosentissa tapauksista¹. Se esiintyy usein ainoana sytogeneettisenä poikkeavuutena (40–60 prosentissa 12-trisomian tapauksista)². Potilaiden, joilla on 12-trisomia, riski luokitellaan vähäiseksi, ellei muita geneettisiä leesioita ole³. Tästä tuotteesta on saatavana myös testisarjakoot 5 (LPH 069-S) ja 10 (LPH 069), ja se on optimoitu hybridisaatioon ylös.

13q14.3

Alueeseen 13q14 vaikuttavat deleetiot ovat yleisin rakenteellinen geneettinen poikkeama CLL-leukemiassa^{3,4,5}. Alueen todetaan olevan heterotsygotisesti deleetoinutun 30–60 prosentilla ja homotsygotisesti deleetoinutun 10–20 prosentilla CLL-potilaista⁶. Potilaat, joilla on 13q14-deleetioita, on luokiteltu hyvin pienen riskin potilaiksi, ellei heillä ole muita geneettisiä vaurioita³.

P53 (TP53) (17p13.1)

TP53-geeni (*tuumoriproteiini p53*) paikassa 17p13.1 on yksi tärkeimpiä tuumorisuppressorigenejä; se toimii vahvana transkriptiotehtävänä ja sillä on merkittävä tehtävä perimän vakauden ylläpitäjänä. TP53:n puuttumista on raportoitu 10 prosentilla CLL-potilaista, ja sitä pidetään huonoimman ennusteen markerina^{3,7}.

ATM (11q22.3)

ATM (*ATM-seriini/treoniinikinaasi*) -geeni paikassa 11q22.3 on tärkeä kontrollipistegeeni, joka on mukana soluvaurioiden hallinnassa. Sen tehtävä on arvioida solun DNA-vaurion tasoa ja yrittää sen korjausta DNA-vaurion korjausreittiin kuuluvien tärkeimpien substraattien fosforylaatiolla⁸. ATM:n puuttumista on raportoitu 18 prosentilla CLL-potilaista, ja sitä pidetään kyseisen sairauden huono ennusteen markerina⁹.

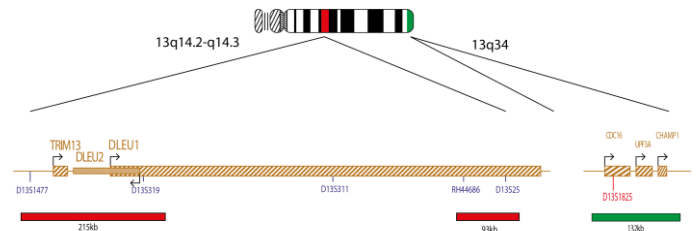
MYB (6q23.3)

Kromosomin 6q deleetioita esiintyy usein CLL-potilailla. MYB (*MYB-protonkogeeni, transkriptiotehtäjä*) -geeni on olennainen hematopoeettisessa solujen proliferaatiossa ja erilaistumisessa^{10,11}. Se paikantuu raitaan 6q23.3 ja toimii 6q-deleetion markerina.

Koettimen tekniset tiedot

13q14.3 Deletion Probe -koetin

13q14.2-q14.3, punainen
13qter, 13q34, vihreä

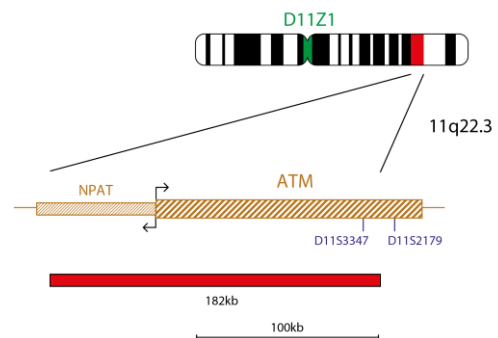


13q14.2-q14.3-koettimet, jotka on leimattu punaisella, kattavat *D13S319*- ja *D13S25*-markkerit. Erityisesti 13qter-subtelomeerikohtainen koetin (klooni 163C9), joka on leimattu vihreällä, mahdollistaa kromosomin 13 tunnistamisen ja toimii kontrollikoettimena.

ATM Deletion Probe -koetin

ATM, 11q22.3, punainen
D11Z1, 11p11.1-q11.1, vihreä

CMP-H006 v005.00



ATM-koetin on 182kb, leimattu punaisella, ja se kattaa NPAT-geenin telomeerisen puolen ja ATM-geenin sentromeerisen puolen juuri *D11S3347*-markkerin yli. Koetinsekvenssillä on myös vihreällä leimattu kontrollikoetin 11 sentromeerille (*D11Z1*).

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

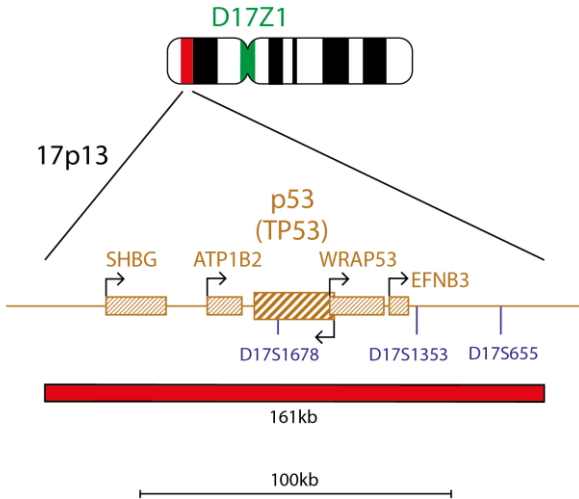


Alpha-Satellite 12 Plus -koetin on punaisella leimattu toistosekvenssikoetin, joka tunnistaa sentromeerin toistosekvenssin D12Z3.

P53 (TP53) Deletion Probe -koetin

P53, 17p13, punainen
D17Z1, 17p11.1-q11.1, vihreä

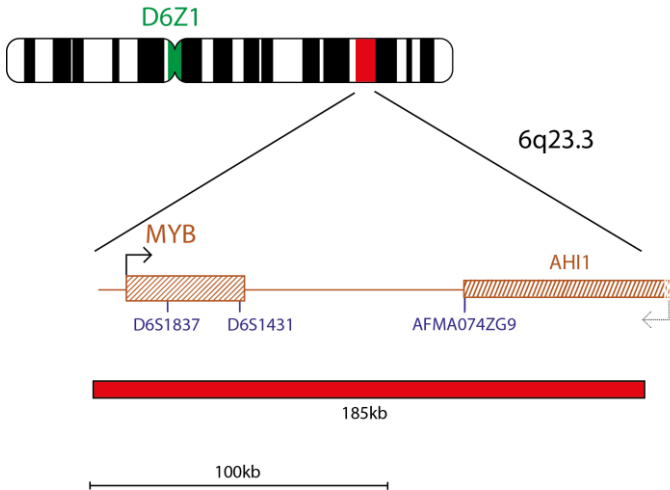
CMP-H039 V007.00



p53 (TP53)-koetin on punaisella leimattu 161 kb:n koetin, joka kattaa koko p53 (TP53) -geenin ja sen viereiset alueet. Koetinseksessä on myös vihreällä leimattu kontrollikoetin 17-sentromeerille (D17Z1).

MYB Deletion Probe -koetin

MYB, 6q23.3, punainen
D6Z1, 6p11.1-q11.1, vihreä



MYB-koetinseksessä on punaisella leimattu 185 kb:n koetin, joka kattaa koko MYB-geenin sekä geenin telomeerisen alueen, johon sisältyy AHI1-geenin sentromeerinen osa. Koetinseksessä on myös vihreällä leimattu kontrollikoetin 6 sentromeerille (D6Z1).

Toimitettavat materiaalit

Koettimet: 50 µl pulloa kohti (5 testiä) tai 100 µl pulloa kohti (10 testiä)
Koettimet toimitetaan ennalta sekoitettuna hybridisaatioliuokseen (formamidi, dekstraanisulfaatti, suolaliuos-natriumsitraatti (SSC)), ja ne ovat valmiita käytettäväksi.

Vastaväri: 150 µl pulloa kohti (15 testiä)

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

Varoitukset ja varoitoimet

- Tarkoitettu *in vitro* -diagnostiikkakäyttöön. Vain ammattikäyttöön.
- Käytä käsitteitä käsitellessäsi DNA-koettimia ja DAPI-vastaväriä.

- Anturiseokset sisältävät formamidiä, joka on teratogeeni: älä hengitä höyryjä sisään tai päästä ainetta kosketuksiin ihon kanssa. Käsiteltävä varoen: käytä käsitteitä ja laboratoriotakkia.
- DAPI on potentiaalinen karsinogeeni. Käsiteltävä varoen: käytä käsitteitä ja laboratoriotakkia.
- Hävitä kaikki vaaralliset materiaalit laitoksesi vaarallisten jätteiden hävittämistä koskevien ohjeiden mukaan.
- Käyttäjien on pystyttävä erottamaan toisistaan punainen, sininen ja vihreä
- Mikäli hahmoteltua protokollaa ei noudateta ja sen mukaisia reagensseja ei käytetä, se saattaa vaikuttaa suorituskykyyn ja johtaa virheellisiin positiivisiin/negatiivisiin tuloksiin.
- Koetinta ei saa laimentaa tai sekoittaa muiden anturien kanssa.
- Mikäli 10 µl:n koetinta ei käytetä protokollan esidenaturaatiovaiheessa, se saattaa vaikuttaa suorituskykyyn ja johtaa virheellisiin positiivisiin/negatiivisiin tuloksiin.

Säilytys ja käsittely

Sarjaa on säilytettävä pakastimessa -25 °C ... -15 °C:n lämpötilassa sarjan etiketissä ilmoitettuun eräpäivään saakka Koetinta ja vastaväripulloja on säilytettävä pimeässä.



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

Laitteisto ja materiaalit Tarvittavat mutta pakkaukseen sisältyvät

Kalibroituja laitteistoja on käytettävä:

- Lämpölevy (kiinteällä levyllä ja tarkalla lämpötilan hallinnalla 80 °C:n lämpötilaan saakka)
- Kalibroidut tilavuudeltaan vaihtelevat mikropipetit ja kärjet, 1–200 µl
- Vesikylpy tarkalla lämpötilan hallinnalla 37 °C:n ja 72 °C:n lämpötilassa
- Mikrosentrifugiletkut (0,5 ml)
- Flooresenssimikroskoopi (katso Flooresenssimikroskooppisuositus-osio)
- Vaihekontrastimikroskoopi
- Coplin-purkit puhdasta muovia, keramiikkaa tai lämmönkestävää lasia
- Pihdit
- Kalibroitu pH-mittari (tai pH-indikaattoriliuskat, joilla voidaan mitata 6,5–8,0:n pH-arvo)
- Kostutettu säiliö
- Flooresenssiluokan mikroskooppilinsin immersioöljy
- Työpöytäsentrifugi
- Mikroskooppiobjektilasi
- 24 x24 mm:n peitelasit
- Ajastin
- 37 °C:n inkubaattori
- Kumiliuosliima
- Pyörresekoitin
- Mittasylinterit
- Magneettinen sekoitin
- Kalibroitu lämpömittari

Valinnainen laitteisto, ei sisälly pakkaukseen

- Sytogeneettinen kuivauskammio

Tarvittavat reagenssit, jotka eivät sisälly pakkaukseen

- 20x suolaliuos-natriumsitraattiliuos (SSC)
- 100 % etanolia
- Tween-20
- 1M natriumhydroksidi (NaOH)
- 1M suolahappo (HCl)
- Akkuvesi

Flooresenssimikroskooppisuositus

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

Loisteaine	Viritysmaks [nm]	Emissiomaks [nm]
Vihreä	495	521
Punainen	596	615

Varmista, että mikroskooppiin on sovitettu asianmukaiset viritys- ja emissiosuodattimet, jotka kattavat yllä luetellut aallonpituudet. Käytä DAPI/vihreän spektrin/punaisen spektrin kolmoiskaistanpäästösuodatinta tai vihreän spektrin/punaisen spektrin kaksoiskaistanpäästösuodatinta vihreän ja punaisen loisteaineen optimaaliseen samanaikaiseen visualisointiin.

Tarkista flooresenssimikroskoopi ennen käyttöä varmistaaksesi, että se toimii asianmukaisesti. Käytä immersioöljyä, joka soveltuu flooresenssimikroskoopille ja jonka koostumus on tarkoitettu alhaiselle automaattiselle flooresenssille. Vältä häipymistä ehkäisevän DAPIn sekoittamista mikroskoopin immersioöljyn kanssa, sillä se hämää signaaleita. Noudata valmistajien suosituksia lampun käyttöiän ja suodatinten iän suhteen.

Näytteen valmistelu

Sarja on suunniteltu käytettäväksi hematologisesti johdettuihin solususpensioihin, jotka on fiksatoitu Carnoyn liuosfiksatiiviin (3:1 metanoli/etikkahappo), jotka on valmisteltu laboratorion tai laitoksen suuntaviivojen mukaisesti. Valmistele ilmakuivatut näytteet mikroskoopin objektiivilaseille sytogeneettisten vakioitomenpiteiden mukaisesti. AGT-sytogeneetikkalaboratorion opaskirja sisältää suosituksia näytteen keräämisestä, viijelystä, poiminnasta ja objektiivilasiin valmistelusta¹².

Liuksen valmistus

Etanoli-liuokset

Laimenna 100 % etanoli akkuviedellä seuraavissa suhteissa ja sekoita huolellisesti:

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

Säilytä liuosta enintään 6 kuukautta huoneenlämpötilassa ilmatiiviissä säiliössä.

2 x SSC-liuos

Laimenna 1 osa 20 x SSC-liuosta 9 osaan akkuvettä ja sekoita huolellisesti. Tarkista pH ja säädä pH-arvoon 7,0 käyttäen natriumhydroksidia tai vetykloridia tarpeen mukaan. Säilytä liuosta enintään 4 viikkoa huoneenlämpötilassa ilmatiiviissä säiliössä.

0,4 x SSC-liuos

Laimenna 1 osa 20 x SSC-liuosta 49 osaan akkuvettä ja sekoita huolellisesti. Tarkista pH ja säädä pH-arvoon 7,0 käyttäen natriumhydroksidia tai vetykloridia tarpeen mukaan. Säilytä liuosta enintään 4 viikkoa huoneenlämpötilassa ilmatiiviissä säiliössä.

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

Laimenna 1 osa 20 x SSC-liuosta 9 osaan akkuvettä. Lisää 5 µl Tween-20-liuosta 10 ml kohti ja sekoita huolellisesti. Tarkista pH ja säädä pH-arvoon 7,0 käyttäen natriumhydroksidia tai vetykloridia tarpeen mukaan. Säilytä liuosta enintään 4 viikkoa huoneenlämpötilassa ilmatiiviissä säiliössä.

FISH-protokolla

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

Objektiivilasin valmistelu

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

Esidenaturaatio

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

Denaturaatio

10. Denaturoi näyte ja koetin samanaikaisesti kuumentamalla objektiivilasia lämpölevyllä 2 minuutin ajan 75 °C:n (+/- 1 °C) lämpötilaan.

Hybridisaatio

11. Laita objektiivilasi yöksi kosteaan valonkestävään säiliöön 37 °C:n (+/- 1 °C) lämpötilaan.

Hybridisaation jälkeiset pesut

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

Valmiiden objektiivilasiin vakaus

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

Toimenpidesuosituksukset

1. Objektiivilasiin sintraaminen tai ikäännyttäminen saattaa heikentää signaalien fluoresenssia

2. Muiden kuin CytoCELL Ltd -yhtiön toimittamien tai suosittelemien reagenssien käyttö saattaa vaikuttaa haitallisesti hybridisaatio-olosuhteisiin.
3. Käytä liuosten, vesikyppyjen ja inkubaattorien lämpötilojen mittaukseen kalibroituja lämpömittareita, sillä nämä lämpötilat ovat ratkaisevan tärkeitä tuotteen optimaalisen suorituskyvyn kannalta.
4. Pesupitoisuudet, pH-arvo ja lämpötilat ovat tärkeitä, sillä liiallinen löyhyyttä saattaa johtaa koettimen epäspesifiseen sitoutumiseen ja liiallinen ankaruus signaalien puuttumiseen.
5. Epätäydellinen denaturaatio saattaa johtaa signaalien puuttumiseen ja liiallinen denaturaatio saattaa myös johtaa epäspesifiseen sitoutumiseen.
6. Liiallinen hybridisaatio saattaa johtaa ylimääräisiin tai odottamattomiin signaaleihin.
7. Käyttäjien on optimoitava omien näytteidensä protokolla ennen testin käyttöä.
8. Suboptimaaliset olosuhteet saattavat johtaa epäspesifiseen sitoutumiseen, jotka saatetaan tulkita koetinsignaaleiksi.

Tulosten tulkitseminen

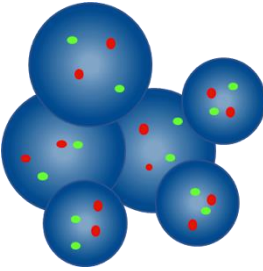
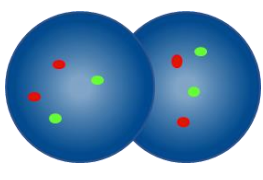
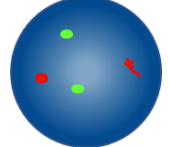
Objektiivilasin laadun arviointi

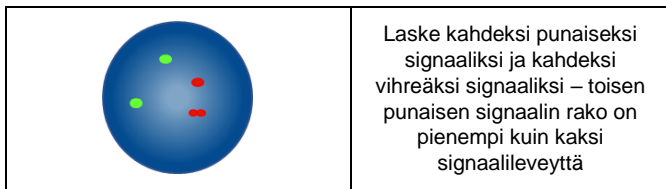
Objektiivilasia ei tarvitse analysoida, jos:

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

Analysointiohjeet

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

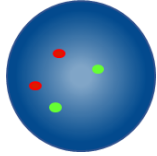
Analysointiohjeet	
	Älä laske – tumat ovat liian lähekkäin, jotta rajoja voisi määrittää
	Älä laske päällekkäisiä tumia – kummankin tuman kaikki alueet eivät ole näkyvissä
	Laske kahdeksi punaiseksi signaaliksi ja kahdeksi vihreäksi signaaliksi – toinen kahdesta punaisesta signaalista on hajanainen



Odotettavissa olevat tulokset

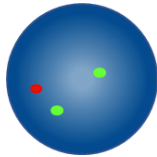
13q14.3 Deletion Probe -koetin

Odotettavissa oleva normaali signaalikuvio

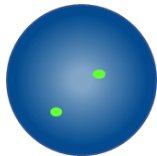


Tavallisessa solussa on odotettavissa kaksi punaista ja kaksi vihreää signaalia (2P, 2V).

Odotettavissa olevat epänormaalit signaalikuviot



Solussa, jossa on 13q14.3:n hemitsygoottinen deleetio, odotettavissa oleva signaalikuvio on yksi punainen ja kaksi vihreää signaalia (1P, 2V).



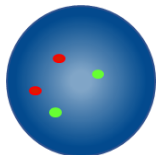
Solussa, jossa on homotsygoottinen deleetio, odotettavissa oleva signaalikuvio on nolla punaista ja kaksi vihreää signaalia (0P, 2V).

13q-deleetiot KLL-tapauksissa on tunnistettu heterogeenisiksi; pieni deleetio 13q-alueella voi aiheuttaa heikon jäännösignaalin tässä koetinsarjassa.

Muut signaalikuviot ovat mahdollisia aneuploidisissa / epätasapainoisissa näytteissä.

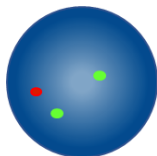
ATM Deletion Probe -koetin

Odotettavissa oleva normaali signaalikuvio



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

Odotettavissa oleva epänormaali signaalikuvio

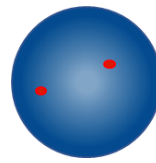


Solussa, jossa on ATM-deleetio, odotettavissa oleva signaalikuvio on yksi punainen ja kaksi vihreää signaalia (1P, 2V).

Muut signaalikuviot ovat mahdollisia aneuploidisissa / epätasapainoisissa näytteissä.

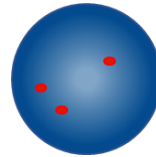
Alpha Satellite 12 Plus for CLL

Odotettavissa oleva normaali signaalikuvio



Tavallisessa solussa on odotettavissa kaksi punaista signaalia (2P).

Odotettavissa oleva epänormaali signaalikuvio

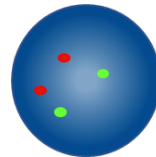


Jos solussa on 12-trisomia, odotettavissa oleva signaalikuvio on kolme punaista signaalia (3P).

Muut signaalikuviot ovat mahdollisia aneuploidisissa / epätasapainoisissa näytteissä.

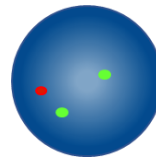
P53 (TP53) Deletion Probe -koetin

Odotettavissa oleva normaali signaalikuvio



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

Odotettavissa oleva epänormaali signaalikuvio

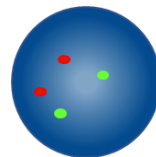


Jos solussa on P53-deleetio, odotettavissa oleva signaalikuvio on yksi punainen ja kaksi vihreää signaalia (1P, 2V).

Muut signaalikuviot ovat mahdollisia aneuploidisissa / epätasapainoisissa näytteissä.

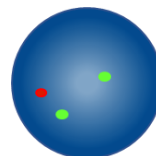
MYB Deletion Probe -koetin

Odotettavissa oleva normaali signaalikuvio



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

Odotettavissa oleva epänormaali signaalikuvio



Solussa, jossa on MYB-deleetio, odotettavissa oleva signaalikuvio on yksi punainen ja kaksi vihreää signaalia (1P, 2V).

Muut signaalikuviot ovat mahdollisia aneuploidisissa / epätasapainoisissa näytteissä.

Tunnettu ristireaktiivisuus

Koetin	Tunnettu ristireaktiivisuus
13q14.3 Deletion Probe -koetin	Vihreä 13qter-koetin voi näyttää ristihybridisaatiota kromosomin 19 sentromeerille ja muiden kromosomien p-haaroille.
ATM Deletion Probe -koetin	Vihreä D11Z1-koetin voi osoittaa enintään 4 ristihybridisaatiota signaalia Xc:lle ja 17c:lle.
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	Koetin voi ilmaista ristihybridisaatiota 3c:lle, 6c:lle, 7c:lle ja 10c:lle.
P53 Deletion Probe -koetin	Vihreä D17Z1-koetin voi näyttää ristihybridisaatiota kromosomien 11 ja X sentromeereille.
MYB Deletion Probe -koetin	Ei tunnettua ristihybridisaatiota

Haittatapahtumista raportointi

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

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

Erityiset suorituskykyominaisuudet

Analyttinen spesifisyys

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

Taulukko 1. CLL Plus Screening Panel analyttinen spesifisyys

Kit	Koetin	Kohdelokus	Oikeaan lokukseen hybridisoituneiden signaalien määrä	Kaikkien hybridisoituneiden signaalien kokonaismäärä	Spesifisyys (%)
13q14.3 Deletion Probe -koetin	Punainen 13q14.3	13q14.3	200	200	100
	Vihreä 13qter	13qter, 13q34	200	200	100
ATM Deletion Probe -koetin	Punainen ATM	11q22.3	200	200	100
	Vihreä D11Z1	11q11.1-q11.1	200	200	100
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	D12Z3 punainen	12p11.1-q11.1	200	200	100
P53 Deletion Probe -koetin	Punainen P53	17p13.1	200	200	100
	Vihreä D17Z1	17p11.1-q11.1	200	200	100
MYB Deletion Probe -koetin	Punainen MYB	6q23	200	200	100
	Vihreä D6Z1	6p11.1-q11.1	200	200	100

Analyttinen herkkyys

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

Taulukko 2. CLL Plus Screening Panel analyttinen herkkyys

Kit	Sellaisten solujen määrä, joilla on odotettavissa olevat signaalikuviot	Sellaisten solujen määrä, joilla on tulosten laskennassa käytettävät signaalit	Herkkyys (%)	95 %:n luottamusväli
13q14.3 Deletion Probe -koetin	481	500	96,2	1,6
ATM Deletion Probe -koetin	482	500	96,4	1,0
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	487	500	97,4	1,0
P53 Deletion Probe -koetin	471	500	94,2	2,7
MYB Deletion Probe -koetin	479	500	95,8	1,7

Normaalien raja-arvojen luokittelu

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

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

Taulukko 3. CLL Plus Screening Panel normaali raja-arvojen luokittelu

Kit	Epänormaali signaalikuviot	Youden-indeksi	Normaali raja-arvo (%)
13q14.3 Deletion Probe -koetin	1P, 2V tai 0P, 2V	0,95	7
ATM Deletion Probe -koetin	1P, 2V	0,99	9
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	3P	0,99	3
P53 Deletion Probe -koetin	1P, 2V	0,90	10
MYB Deletion Probe -koetin	1P, 2V	0,97	8

Laboratorioiden on tarkistettava raja-arvot käyttäen omia tietojaan^{13, 14}.

Tarkkuus ja uusittavuus

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

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

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

Taulukko 4. CLL Plus Screening Panel uusittavuus ja tarkkuus

Muuttuja	Vakioepävarmuus (STDEV)				
	13q14.3 Deletion Probe -koetin	ATM Deletion Probe -koetin	Alpha Satellite 12 Plus for CLL	P53 Deletion Probe -koetin	MYB Deletion Probe -koetin
Tarkkuus	0,72	0,38	0,72	2,63	1,09
Näytteestä toiseen	0,58	0,38	0,89	2,30	1,19
Päivästä toiseen	0,96	0,58	0,51	2,39	1,20
Erästä toiseen	1,40	1,27	1,27	1,68	0,90
Kokonaisepävarmuus	1,03	1,01	1,15	2,16	1,06

Kliininen suorituskyky

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

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

Koetin	Kliininen herkkyys (oikea positiivinen aste, TPR)	Kliininen spesifisyys (oikea negatiivinen aste, TNR)	Väärä positiivinen aste (FPR) = 1 – spesifisyys
13q14.3 Deletion Probe -koetin	96,3 %	99,1%	0,9%
ATM Deletion Probe -koetin	100%	99,2%	0,8%
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	100%	100%	0%
P53 Deletion Probe -koetin	92,5%	97,1%	2,9%
MYB Deletion Probe -koetin	97,8%	99,6%	0,4%

Lisätietoja

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

Puh.: +44 (0)1223 294048









Sähköposti: techsupport@cytoCELL.com

Verkkosivut: www.ogt.com

Viitteet

1. 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.

Symboliopas

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

Patentit ja tavaramerkit

CytoCell on CytoCELL Ltd.:n rekisteröity tavaramerkki.

**CytoCELL Ltd.**

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