



A Sysmex Group Company



Brugsanvisning

REF: LPH 087-S / LPH 087

CLL Plus Screening Panel



KUN TIL ERHVERVSMÆSSIG BRUG



www.cytocell.com

Yderligere information og andre sprog findes på www.ogt.com

Begrænsninger

Dette produkt er designet til at detektere genomiske gevinster eller tab, der er større end de regioner, der er dækket af de røde kloner i dette probesæt, som inkluderer 13q14.3-, *ATM*-, *P53 (TP53)*- og *MYB*-regionerne samt centromeriske regioner på kromosom 12. Genomiske tab og gevinster uden for denne region eller delvise tab og gevinster inde i disse regioner kan muligvis ikke detekteres med dette produkt. Testen er ikke beregnet til: brug som det eneste diagnostiske værktøj, prænatal test, populationsbaseret screening, test i nærheden af patienter eller selvtestning. Produktet er udelukkende beregnet til brug af faguddannet laboratoriepersonale; alle resultater skal fortolkes af tilstrækkeligt kvalificeret personale, og der skal tages hensyn til andre relevante testresultater.

Dette produkt er ikke valideret til brug til andre prøvetyper eller sygdomsformer ud over dem, der er specificeret under anvendelsesområdet.

Rapportering og fortolkning af FISH-resultater skal være i overensstemmelse med professionel standardpraksis og bør tage hensyn til andre kliniske og diagnostiske informationer. Dette kit er beregnet til brug som supplement til andre diagnostiske laboratoriestests, og en behandling bør ikke indledes udelukkende på grundlag af FISH-resultatet.

Hvis protokollen ikke overholdes, kan det have indflydelse på funktionsevnen og føre til falsk positive/negative resultater.

Dette kit er ikke valideret til formål ud over, hvad der angives under anvendelsesområde.

Anvendelsesområde

CLL Plus Screening Panel en kvalitativ, ikke-automatiseret FISH-test (fluorescens *in situ* hybridisering), der anvendes til at detektere kromosomale deletioner i 11q22.3-regionen på kromosom 11, 17p13.1-regionen på kromosom 17 eller 13q14.2-q14.3-regionen på kromosom 13 og/eller gevinster i det centromeriske område på kromosom 12 og/eller deletioner, der involverer *MYB*-regionen på kromosom 6 ved 6q.23.3, ved brug af hæmatologisk-deriverede cellesuspensioner, der er fikseret i Carnoys opløsning (3:1 methanol/eddikesyre), fra patienter med kronisk lymfatisk leukæmi (CLL).

Indikationer

Dette produkt er designet som supplement til andre kliniske og histopatologiske tests i anerkendte diagnostiske og kliniske plejeforløb, hvor viden om status af *P53 (TP53)*, *ATM*-deletion eller *D13S319*-deletion og/eller gevinst i centromerstatus på kromosom 12 er vigtig for den kliniske håndtering.

Testens principper

Fluorescens *in situ* hybridisering (FISH) er en teknik, der gør det muligt at detektere DNA-sekvenser på metafasekromosomer eller interfasekerner i fikserede cytogenetiske prøver. Teknikken gør brug af DNA-prøver, som hybridiserer hele kromosomer eller enkelte unikke sekvenser, og er et stærkt supplement til cytogenetisk analyse med G-banding-teknik. Denne teknik kan nu anvendes som et essentielt investigativt værktøj i forbindelse med prænatal analyse, hæmatologiske analyser og kromosomanalyser af solide tumorer. Mål-DNA'et er, efter fiksering og denaturering, klar til hybridisering til en lignende denatureret, fluorescens-mærket DNA-probe med en komplementærsekvens. Efter hybridisering fjernes den ubundne og ikke-specifikt bundne DNA-probe, og DNA'et kontrastfarves med henblik på visualisering. Et fluorescensmikroskop gør det derefter muligt at visualisere den hybridiserede probe på mål-materialet.

Probe-information

En selektion af hæmatologiske prøver og alfa-satellit-prober til kronisk lymfatisk leukæmi (CLL).

Alpha Satellite 12 Plus for CLL

Trisomi 12 er en tilbagevendende anomali ved CLL, som ses i 20 % af tilfældene¹ og ofte fremstår som den unikke cytogenetiske aberration (40-60 % af tilfældene med trisomi 12)². Patienter med trisomi 12 klassificeres til lav risiko, hvis der ikke er andre genetiske læsioner³. Dette produkt fås også i størrelser med 5 (LPH 069-S) og 10 (LPH 069) testkits og er blevet optimeret til hybridisering natten over.

13q14.3

Deletioner, der vedrører 13q14, er de hyppigste strukturelle genetiske aberrationer ved CLL^{3,4,5}. Denne region deleteres heterozygotisk hos 30-60 % og homozygotisk hos 10-20 % af patienterne med CLL⁶. Patienter med 13q14-deletioner klassificeres til at have meget lav risiko, hvis der ikke er andre genetiske læsioner³.

P53 (TP53) (17p13.1)

TP53-genet (*tumor protein p53*) ved 17p13.1 er et af de vigtigste tumorsuppressorer; det agerer som en potent transkriptionsfaktor med en fundamental rolle i opretholdelsen af genetisk stabilitet. Tab af *TP53* rapporteres hos 10 % af patienterne med CLL og anses for at være den markør med dårligst prognose^{3,7}.

ATM (11q22.3)

ATM-genet (*ATM serine/threonine kinase*) ved 11q22.3 er et vigtigt checkpoint-gen, som er involveret i håndteringen af celledskade; dets funktion er at vurdere niveauet af DNA-skade i cellen og forsøge på at reparere den ved fosforylering af nøglesubstrater, der er involveret i DNA-skadens responssignalvej⁸. Tab af *ATM* rapporteres hos 18 % af patienterne med CLL og anses for at være en dårlig prognostisk markør ved CLL⁹.

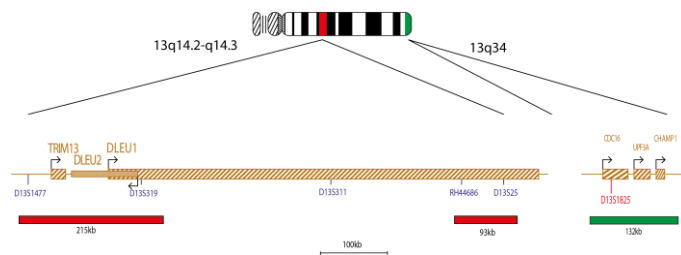
MYB (6q23.3)

Deletioner af kromosom 6q er tilbagevendende ved CLL. *MYB*-genet (*MYB proto-oncogene, transcription factor*) er essentielt ved hæmatopoietisk celleproliferation og -differentiation^{10,11}. Det er lokaliseret på bånd 6q23.3 og leveres som markør for 6q-deletion.

Probe-specifikation

13q14.3 Deletion Probe

13q14.2-q14.3, rød
13qter, 13q34, grøn

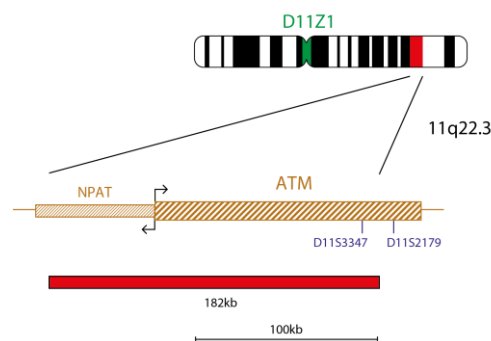


13q14.2-q14.3-proberne, som er mærket med rødt, dækker D13S319- og D13S25-mærkerne. Den 13qter subtelerom-specifikke probe (klon 163C9), som er mærket med grønt, muliggør identifikation af kromosom 13 og fungerer som en kontrolprobe.

ATM Deletion Probe

ATM, 11q22.3, rød
D11Z1, 11p11.1-q11.1, grøn

CMP-H006 v005.00



ATM-proben er 182kb, der er mærket med rødt og dækker den telomeriske ende af *NPAT*-genet og den centromeriske ende af *ATM*-genet til lige efter D11S3347-mærkeren. Probe-blandingen indeholder ligeledes en kontrolprobe til centromer 11 (D11Z1), som er mærket med grønt.

Alpha Satellite 12 Plus for CLL

D12Z3, 12p11.1-q11.1, rød

D12Z3



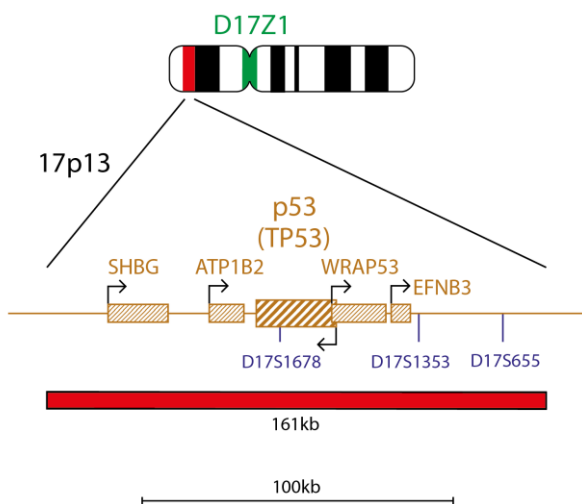
Alpha-Satellite 12 Plus Probe er en gentagelsessekvens-probe, der er mærket med rødt og genkender den centromere gentagelsessekvens D12Z3.

P53 (TP53) Deletion Probe

P53, 17p13, rød

D17Z1, 17p11.1-q11.1, grøn

CMP-H039 V007.00

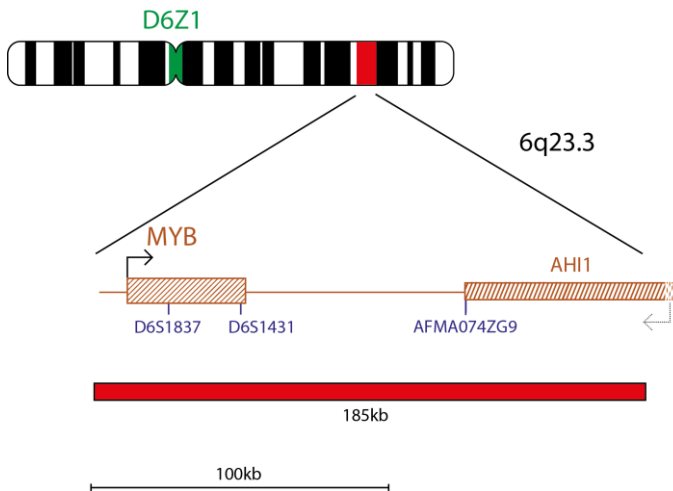


p53 (TP53)-proben er 161 kb, der er mærket med rødt og dækker hele p53 (TP53) -genet og dets flankerende regioner. Probe-blandingen indeholder ligeledes en kontrolprobe til centromer 17 (D17Z1), som er mærket med grønt.

MYB Deletion Probe

MYB, 6q23.3, rød

D6Z1, 6p11.1-q11.1, grøn



MYB-probe-blandingen består af en 185 kb-probe, der er mærket med rødt, og som dækker hele MYB-genet og en region, der er telomerisk til det gen, som inkluderer en centromerisk del af AH1-genet. Denne probe-blanding indeholder ligeledes en kontrolprobe til centromer 6 (D6Z1), som er mærket med grønt.

Medleveret materiale

Prober: 50 µl pr. hætteglas (5 tests) eller 100 µl pr. hætteglas (10 tests)

Proberne leveres i en færdigblandet hybridiserings-opløsning (formamid; dextransulfat; salin-natriumcitrat (SSC)) og er klar til brug.

Kontrastfarvning: 150 µl pr. hætteglas (15 tests)

Kontrastfarvningen er DAPI-antifade-opløsning (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Advarsler og forsigtighedsregler

1. Til brug til *in vitro*-diagnostik. Må kun anvendes af faguddannet personale.

2. Bær sikkerhedshandsker ved håndtering af DNA-prober og DAPI-kontrastfarvning.
3. Probe-blandinger indeholder formamid, som er teratogent: undgå hudkontakt og at indånde dampe. Håndtér med omtanke; bær handsker og laboratoriekittel.
4. DAPI er et potentielt karcinogen. Håndtér med omtanke; bær handsker og laboratoriekittel.
5. Bortskaf alle farlige materialer i overensstemmelse med institutionens vejledninger om bortskaffelse af farligt materiale.
6. Brugere skal kunne skelne mellem farverne rød, blå og grøn.
7. Hvis den beskrevne protokol og de beskrevne reagenser ikke overholdes, kan det have indflydelse på funktionsevnen og føre til falsk positive/negative resultater.
8. Proben må ikke fortyndes eller blandes med andre prober.
9. Hvis der ikke anvendes 10 µl af proben under præ-denatureringen, som beskrevet i protokollen, kan det have indflydelse på funktionsevnen og føre til falsk positive/negative resultater.

Opbevaring og håndtering

Kittet skal opbevares mellem -25 °C og -15 °C i en fryser indtil den udløbsdag, der er anført på kittets etiket. Proben og hætteglas med kontrastfarve skal opbevares mørkt.



Proben forbliver stabil under fryse-optøningscyklusser i forbindelse med normal brug (hvor en cyklus omfatter probens udtagning fra og genindsætning i fryseren) og er fotostabil i op til 48 timer efter at være blevet eksponeret for vedvarende lys. Man skal bestræbe sig på at begrænse lyspåvirkning og temperaturforandringer.

Nødvendigt udstyr og materialer, som ikke medleveres

Der skal anvendes kalibreret udstyr:

1. Varmeplade (med en fast plade og nøjagtig temperaturkontrol op til 80 °C)
2. Kalibrerede mikropipetter med variabel volumen og spidser fra 1 µl til 200 µl
3. Vandbad med nøjagtig temperaturkontrol ved 37 °C og 72 °C
4. Mikrocentrifugerør (0,5 ml)
5. Fluorescensmikroskop (jv. anbefalingerne i kapitlet om fluorescensmikroskopi)
6. Fasekontrast-mikroskop
7. Rene plastik, keramiske eller varmeresistente Coplin-glas.
8. Tænger
9. Kalibreret pH-Meter (eller pH-indikatorstrips, der kan måle pH 6,5-8,0)
10. Befugtningsbeholder
11. Immersionsolie til fluorescensmikroskoplinser
12. Bordcentrifuge
13. Mikroskop-objektglas
14. Dækglass på 24x24 mm
15. Timer
16. Inkubator på 37 °C
17. Gummiopløsning (til forsegling af objektglas)
18. Vortex-blander
19. Måleglas
20. Magnetomrører
21. Kalibreret termometer

Optionalt udstyr, der ikke medleveres

1. Cytogenetisk tørrekammer

Nødvendige reagenser, der ikke medleveres

1. 20x saltvand-natriumcitrat-(SSC)-opløsning
2. 100 % ethanol
3. Tween-20
4. 1M natriumhydroxid (NaOH)
5. 1M saltsyre (HCl)
6. Renset vand

Anbefalinger til fluorescensmikroskopi

Der bør anvendes en 100-Watt kviksløvlampe eller tilsvarende og olie-immersions-apochromat-objektiver, plan, 60/63 eller 100x for at opnå optimal visualisering. De fluoroforer, der benyttes i denne probe, vil excitere og udsende lys ved følgende bølgelængder:

Fluorofor	Excitation _{maks.} [nm]	Emission _{maks.} [nm]
Grøn	495	521
Rød	596	615

Sørg for, at mikroskopet har passende excitations- og emissionsfiltre, som dækker de ovenfor nævnte bølgelængder. Benyt et tredobbeltd båndpasfilter DAPI/grøn, spektrum/rød eller et dobbelt båndpasfilter grønt spektrum/rød spektrum for at opnå optimal simultan visualisering af grønne og røde fluoroforer.

Efterprøv før brug, at fluorescensmikroskopet virker korrekt. Benyt immersionsolie, der er beregnet til fluorescensmikroskopi og formuleret til lav automatisk fluorescens. Undgå at blande DAPI-antifade med mikroskopi-immersionsolie, da det vil sløre signalerne. Følg fremstillernes anbefaling angående lampens levetid og filtrens alder.

Prøveklargøring

Kittet er designet til brug på hæmatologisk-deriverede celleduspensioner, der er fikseret i Carnoys opløsning (3:1 methanol/eddikesyre), som er klargjort i henhold til laboratoriets eller institutionens vejledninger. Præparér lufttørrede prøver på objektglas i henhold til cytogenetiske standardprocedurer. AGT *Cytogenetics*

Laboratory Manual indeholder anbefalinger angående prøveindsamling, dyrkning, høst og præparering af objektglas¹².

Klargøring af opløsning

Ethanolopløsninger

Fortynd 100 % ethanol med rensset vand ved at anvende følgende blandingsforhold, og bland omhyggeligt:

- 70 % ethanol - 7 dele 100 % ethanol til 3 dele rensset vand
- 85% ethanol - 8,5 dele 100 % ethanol til 1,5 dele rensset vand

Opløsningerne kan opbevares i op til 6 måneder ved rumtemperatur i en lufttæt beholder.

2xSSC-opløsning

Fortynd 1 del 20xSSC-opløsning med 9 dele rensset vand, og bland omhyggeligt. Efterprøv pH-værdien, og justér til pH 7,0 ved at bruge NaOH eller HCl efter behov. Opløsningen kan opbevares i op til 4 uger ved rumtemperatur i en lufttæt beholder.

0.4xSSC-opløsning

Fortynd 1 del 20xSSC-opløsning med 49 dele rensset vand, og bland omhyggeligt. Efterprøv pH-værdien, og justér til pH 7,0 ved at bruge NaOH eller HCl efter behov. Opløsningen kan opbevares i op til 4 uger ved rumtemperatur i en lufttæt beholder.

2xSSC; 0,05 % Tween-20-opløsning

Fortynd 1 del 20xSSC-opløsning med 9 dele rensset vand. Tilsæt 5 µl Tween-20 pr. 10 ml, og bland omhyggeligt. Efterprøv pH-værdien, og justér til pH 7,0 ved at bruge NaOH eller HCl efter behov. Opløsningen kan opbevares i op til 4 uger ved rumtemperatur i en lufttæt beholder.

FISH-Protokol

(Bemærk: Probens og kontrastfarvningens eksponering for laboratorielys skal hele tiden begrænses så meget som muligt).

Forberedelse af objektglas

1. Dryp celleprøven på et objektglas. Lad det tørre. (Option, hvis der bruges et cytogenetisk tørrekabinet: Celleprøverne dryppes på objektglasset i et cytogenetisk tørrekabinet. Tørrekammeret bør anvendes ved cirka 25 °C og 50 % luftfugtighed for at få optimale celleprøver. Hvis det ikke er et cytogenetisk tørrekabinet til rådighed, kan der alternativt anvendes et stinkskab).
2. Nedsæk objektglasset i 2xSSC i 2 minutter ved rumtemperatur (RT) uden omrystning.
3. Dehydrér i ethanol i stigende koncentrationer (70 %, 85 % og 100 %), hver i 2 minutter ved RT.
4. Lad det tørre.

Præ-denaturering

5. Tag proben ud af fryseren, og lad den opnå RT. Centrifuger kort rørene inden brug.
6. Sørg for, at probeopløsningen er ensartet blandet med en pipette.
7. Udtag 10 µl af proben pr. test, og transferer til et mikrocentrifugerør. Sæt hurtigt det resterende probemateriale tilbage i fryseren.
8. Sæt proben og prøveobjektglasset til opvarmning på en varmeplade ved 37 °C (+/- 1 °C) i 5 minutter.
9. Dryp 10 µl af probeblandingen på celleprøven, og dæk forsigtigt med et dækglass. Forsegel med gummiopløsning, og lad det tørre fuldstændigt.

Denaturering

10. Denaturér prøve og probe samtidigt ved at varme objektglasset på en varmeplade ved 75 °C (+/- 1 °C) i 2 minutter.

Hybridisering

11. Anbring objektglasset i en fugtig, lystæt beholder ved 37 °C (+/- 1 °C) natten over.

Vask efter hybridisering

12. Tag DAPI ud af fryseren, og lad det opnå RT.
13. Fjern omhyggeligt dækglasset og alle spor af gummiopløsningen.
14. Nedsæk objektglasset i 0,4xSSC (pH 7,0) ved 72 °C (+/- 1 °C) i 2 minutter uden omrystning.
15. Lad objektglasset tørre, og nedsæk det i 2xSSC, 0,05 % Tween-20 ved RT (pH 7,0) i 30 sekunder uden omrystning.
16. Lad objektglasset tørre, og tilsæt 10 µl DAPI-antifade på hver prøve.
17. Dæk med et dækglass, fjern alle eventuelle bobler, og lad farven udvikle sig i mørke i 10 minutter.
18. Undersøg med et fluorescensmikroskop. (Jf. anbefalingerne i kapitlet om fluorescensmikroskopi.)

Stabiliteten i de færdige objektglas

Færdige objektglas kan analyseres i op til 1 måned, hvis de opbevares mørkt ved/eller under RT.

Anbefalinger til proceduren

1. Det kan nedsætte signalflorescensen, hvis objektglassene får for meget varme eller er gamle.
2. Hybridiseringsbetingelserne kan påvirkes negativt, hvis der bruges andre reagenser end dem, der anbefales eller leveres af Cytocell Ltd.
3. Der skal anvendes et kalibreret termometer til at måle temperaturerne i opløsninger, vandbade og inkubatorer, da disse temperaturer er vigtige for at opnå bedst mulige resultater.
4. Stringens ved vaskekonzentrationerne, pH og temperaturerne er vigtig, da for lav stringens kan føre til ikke-specifik binding af proben, og for høj stringens kan føre til tab af signaler.

5. Ikke-komplet denaturering kan føre til tab af signaler, og for høj denaturering kan også føre til ikke-specifik binding.
6. Overhybridisering kan føre til yderligere eller uforventede signaler.
7. Brugere bør optimere protokollen til egne prøver, før testen bruges til diagnostiske formål.
8. Suboptimale betingelser kan føre til ikke-specifik binding, som kan mistolkes som et probesignal.

Fortolkning af resultater

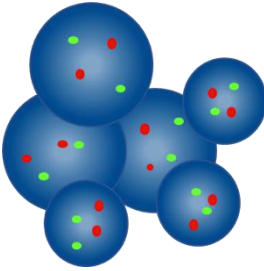
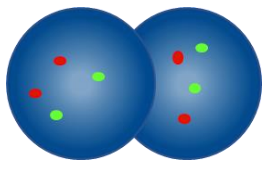
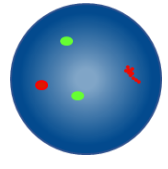
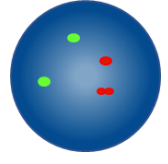
Vurdering af objektglaskvaliteten

Objektglasset bør ikke analyseres, hvis:

- signalerne er for svage til, at de enkelte filtre kan analyseres - for at fortsætte med en analyse skal signalerne være lyse, klare og nemme at vurdere.
- der er et højt antal af klumpende/overlappende celler, som slører analysen.
- >50 % af cellerne ikke er hybridiseret.
- der er for mange fluorescenspartikler mellem cellerne og/eller en fluorescerende dis, der forstyrrer signalerne - optimale objektglas har en enten mørk eller sort og ren baggrund.
- cellekernernes omrids ikke kan skelnes og ikke er intakte.

Analysevejledninger

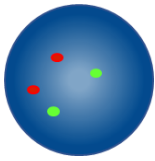
- Der skal altid være to brugere til at analysere og fortolke hver prøve. Enhver diskrepans skal afklares ved en vurdering fra en tredje bruger
- Hver bruger skal have passende faglige kvalifikationer i overensstemmelse med anerkendte nationale standarder.
- Hver bruger bør uafhængigt bedømme 100 kerner for hver prøve. Den ene bruger starter analysen fra venstre side af objektglasset, og den anden bruger starter fra højre side.
- Brugerne skal dokumentere deres resultater skriftligt hver for sig.
- Der skal kun analyseres intakte kerner, ingen overlappende eller klumpende kerner, der er dækket af cytoplasmisk debris eller har en høj grad af autofluorescens.
- Undgå områder med overskud af cytoplasmisk debris eller ikke-specifik hybridisering.
- Signalintensiteten kan variere, selv for den enkelte kerne. I sådanne tilfælde anvendes enkeltfiltre og/eller justering af det fokale plan.
- Ved suboptimale betingelser kan signalerne virke diffuse. Hvis to signaler med samme farve berører hinanden, eller afstanden mellem dem ikke er større end bredden på to signaler, eller hvis der er en svag streng, der forbinder de to signaler, tælles de som ét signal.
- Hvis man er i tvivl, om en celle kan analyseres eller ej, så analyseres den ikke.

Analysevejledninger	
	Tæl ikke - cellekernerne er for tæt på hinanden til, at der kan bestemmes grænser
	Tæl ikke cellekerner, der overlapper hinanden - det er ikke alle områder af de to cellekerner, der er synlige
	Tæl som to røde signaler og to grønne signaler - et af de to røde signaler er diffust
	Tæl som to røde signaler og to grønne signaler - hullet i et rødt signal er mindre end to signalers bredde

Forventede resultater

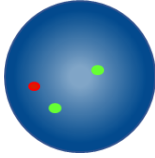
13q14.3 Deletion Probe

Forventet normalt signalmønster

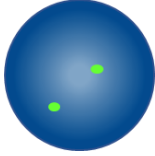


I en normal celle forventes der to røde og to grønne signaler (2R, 2G).

Forventede abnorme signalmønstre



I en celle med en hemizygot deletion af 13q14.3 vil det forventede signalmønster være et rødt signal og to grønne signaler (1R, 2G).



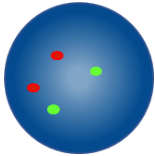
I en celle med en homozygot deletion vil det forventede signalmønster være intet rødt signal og to grønne signaler (0R, 2G).

13q-deletioner ved CLL genkendes som heterogene. Små deletioner inde i 13q-regionen kan resultere i et lille restsignal med dette probesæt.

Andre signalmønstre er mulige i aneuploide/ubalancerede prøver.

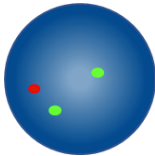
AMT Deletion Probe

Forventet normalt signalmønster



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

Forventet abnormt signalmønster

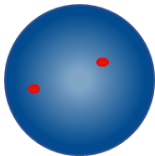


I en celle med en ATM-deletion vil det forventede signalmønster være et rødt signal og to grønne signaler (1R, 2G).

Andre signalmønstre er mulige i aneuploide/ubalancerede prøver.

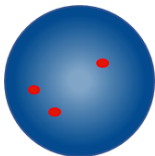
Alpha Satellite 12 Plus for CLL

Forventet normalt signalmønster



I en normal celle forventes der to røde signaler (2R).

Forventet abnormt signalmønster

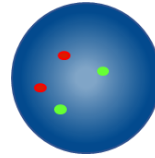


I en celle med trisomi 12 vil det forventede signalmønster være tre røde signaler (3R).

Andre signalmønstre er mulige i aneuploide/ubalancerede prøver.

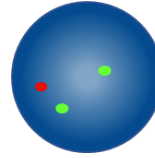
P53 (TP53) Deletion Probe

Forventet normalt signalmønster



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

Forventet abnormt signalmønster

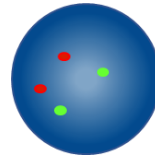


I en celle med en P53-deletion vil det forventede signalmønster være et rødt signal og to grønne signaler (1R, 2G).

Andre signalmønstre er mulige i aneuploide/ubalancerede prøver.

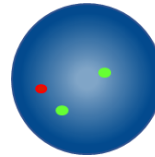
MYB Deletion Probe

Forventet normalt signalmønster



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

Forventet abnormt signalmønster



I en celle med en MYB-deletion vil det forventede signalmønster være et rødt signal og to grønne signaler (1R, 2G).

Andre signalmønstre er mulige i aneuploide/ubalancerede prøver.

Kendt krydsreaktion

Probe	Kendt krydsreaktion
13q14.3 Deletion Probe	Den grønne 13qter-probe kan vise krydshybridisering til centromeren på kromosom 19 og til p-armene på andre kromosomer.
AMT Deletion Probe	Den grønne D11Z1-probe kan vise op til 4 krydshybridiserings signaler til Xc og 17c.
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	Proben kan vise krydshybridisering til 3c, 6c, 7c og 10c.
P53 Deletion Probe	Den grønne D17Z1-probe kan vise krydshybridisering til centromererne på kromosomerne 11 og X.
MYB Deletion Probe	Ingen kendt kryds-hybridisering

Indberetning af utilsigtede hændelser

Hvis du mener, at dette udstyr ikke har virket korrekt eller er blevet forringet i dets ydelseskaraktistika, hvilket kan have bidraget til en utilsigtet hændelse (for eksempel forsinket eller falsk diagnose, forsinket eller u hensigtsmæssig behandling), skal fremstilleren omgående informeres (**e-mail**: vigilance@ogt.com).

Hvis relevant, skal hændelsen ligeledes indberettes til den nationale ansvarlige myndighed. En liste med vigilance-kontaktsteder kan findes på: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Særlige ydelseskaraktistika

Analytisk specificitet

Analytisk specificitet er procentdelen af signaler, som kun hybridiserer til det korrekte locus og ingen anden lokalitet. Den analytiske specificitet blev etableret ved analyse af i alt 200 mål-loci. Den analytiske specificitet blev beregnet som antallet af FISH-signaler, som hybridiserer til det rette locus, delt med det samlede antal af hybridiserede FISH-signaler.

Tabel 1. Analytisk specificitet for CLL *Plus* Screening Panel

Kit	Probe	Mål-locus	Antal af signaler, der er hybridiseret til det rette locus	Samlet antal af signaler, der er hybridiseret	Specificitet (%)
13q14.3 Deletion Probe	Rød 13q14.3	13q14.3	200	200	100
	Grøn 13qter	13qter, 13q34	200	200	100
AMT Deletion Probe	Rød ATM	11q22.3	200	200	100
	Grøn D11Z1	11q11.1-q11.1	200	200	100
Alpha Satellite 12 <i>Plus</i> for CLL	D12Z3 rød	12p11.1-q11.1	200	200	100
P53 Deletion Probe	Rød P53	17p13.1	200	200	100
	Grøn D17Z1	17p11.1-q11.1	200	200	100
MYB Deletion Probe	Rød MYB	6q23	200	200	100
	Grøn D6Z1	6p11.1-q11.1	200	200	100

Analytisk sensitivitet

Analytisk sensitivitet er procentdelen af de interfaseceller, der kan tælles med det forventede normale signalmønster. Den analytiske sensitivitet blev etableret ved at analysere interfaseceller på tværs af forskellige normale prøver. Sensitiviteten blev beregnet som procentdelen af talte celler med det forventede signalmønster (med et konfidensinterval på 95 %).

Tabel 2. Analytisk sensitivitet for CLL *Plus* Screening Panel

Kit	Antal celler med forventede signalmønstre	Antal celler med signaler, der kan tælles	Sensitivitet (%)	95 % konfidensinterval
13q14.3 Deletion Probe	481	500	96,2	1,6
AMT Deletion Probe	482	500	96,4	1,0
Alpha Satellite 12 <i>Plus</i> for CLL	487	500	97,4	1,0
P53 Deletion Probe	471	500	94,2	2,7
MYB Deletion Probe	479	500	95,8	1,7

Karakterisering af normale cut-off-værdier

Den normale cut-off-værdi i forbindelse med FISH-prober er den maksimale procentdel af interfaseceller, der kan tælles med et specifikt abnormt signalmønster, hvorved en prøve anses for at være normal for dette signalmønster.

Cut-off-værdien blev fastslået ved brug af prøver fra normale og positive patienter. For hver prøve blev der registreret signalmønstre for 100 celler. Youden-indekset blev beregnet for at finde tærskelværdien, hvor sensitivitet + specificitet-1 er maksimeret.

Tabel 3. Karakterisering af normale cut-off-værdier for CLL *Plus* Screening Panel

Kit	Abnormt signalmønster	Youden-indeks	Normal cut-off (%)
13q14.3 Deletion Probe	1R, 2G eller 0R, 2G	0,95	7
AMT Deletion Probe	1R, 2G	0,99	9
Alpha Satellite 12 <i>Plus</i> for CLL	3R	0,99	3
P53 Deletion Probe	1R, 2G	0,90	10
MYB Deletion Probe	1R, 2G	0,97	8

Laboratorier skal verificere cut-off-værdier ved at bruge deres egne data^{13,14}.

Præcision og reproducerbarhed

Præcision er et mål for den naturlige variation i en test, når den gentages adskillige gange under samme betingelser. Dette blev vurderet ved at analysere gentagelser af det samme lot-nummer af prober, der var testet på samme prøve, under de samme betingelser og på den samme dag.

Reproducerbarhed er et mål for variabiliteten af en test og er blevet fastslået i forhold til prøve-til-prøve-, dag-til-dag- og batch-til-batch-variabilitet. Dag-til-dag-reproducerbarhed blev vurderet ved at analysere de samme prøver på tre forskellige dage. Batch-til-batch-reproducerbarhed blev vurderet ved at analysere de samme prøver med tre forskellige lot-numre på en dag. Prøve-til-prøve-reproducerbarhed blev vurderet ved at analysere tre replikater af en prøve på en dag. For hver prøve blev signalmønstrene for 100 interfaseceller registreret, og procentdelen af celler med det forventede signalmønster blev beregnet.

Reproducerbarhed og præcision blev beregnet som standardafvigelsen (STDEV, Standard Deviation) mellem replikater for hver variabel og samlet middel-STDEV.

Tabel 4. Reproducerbarhed og præcision af CLL *Plus* Screening Panel

Variabel	Standardafvigelse (STDEV, Standard Deviation)				
	13q14.3 Deletion Probe	AMT Deletion Probe	Alpha Satellite 12 <i>Plus</i> for CLL	P53 Deletion Probe	MYB Deletion Probe
Præcision	0,72	0,38	0,72	2,63	1,09
Prøve-til-prøve	0,58	0,38	0,89	2,30	1,19
Dag-til-dag	0,96	0,58	0,51	2,39	1,20
Batch-til-batch	1,40	1,27	1,27	1,68	0,90
Samlet afvigelse	1,03	1,01	1,15	2,16	1,06

Klinisk ydeevne

Den kliniske ydeevne blev fastslået på en repræsentativ prøve af den påtænkte population for produktet. For hver prøve blev der registreret et signalmønster for ≥ 100 interfaseceller. Bestemmelsen af normal/abnorm blev taget ved at sammenligne procentdelen af celler med det specifikke abnorme mønster med den normale cut-off-værdi. Resultaterne blev derefter sammenlignet med den kendte status for prøven.

Resultaterne af de kliniske data blev analyseret for at producere sensitivitet, specificitet og cut-off-værdier med en en-dimensional fremgangsmåde.

Tabel 5. Klinisk ydeevne for CLL *Plus* Screening Panel

Probe	Klinisk sensitivitet (sand positiv rate, TPR [True Positive rate])	Klinisk specificitet (sand negativ rate, TNR [True Negative rate])	Falsk positiv rate (FPR, False Positive rate) = 1 - Specificitet
13q14.3 Deletion Probe	96,3 %	99,1%	0,9%
AMT Deletion Probe	100%	99,2%	0,8%
Alpha Satellite 12 <i>Plus</i> for CLL	100%	100%	0%
P53 Deletion Probe	92,5%	97,1%	2,9%
MYB Deletion Probe	97,8%	99,6%	0,4%

Yderligere information

Kontakt CytoCell Technical Support Department, hvis du ønsker yderligere produktinformationer.

T: +44 (0)1223 294048










E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

Referencer

- Swerdlow et al., (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
- Puiggros et al., Biomed Res Int 2014;1:1-13
- Rossi et al., Blood 2013;121(8):1403-1412
- Juliusson G et al., N Eng J Med 1990;323:720-4
- Kasar et al., Nature Communications 2015;6:1-12
- Hammarsund M et al., FEBS Letters 2004;556:75-80
- Baliakas P, et al., Leukemia. 2014;(April):1-8
- Stankovic et al., Blood 2004;103(1):291-300
- Dohner et al., N Eng J Med 2000;343:1910-1916
- Clappier et al., Blood 2007;110(4):1251-1261
- Stilgenbauer et al., Leukemia, 1999;13:1331-1334
- Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) The *AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. Genet Med. 2011;13(7):667-675.
- Wiktor AE, Dyke DLV, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16-23.

Symbolvejledning

REF	da: Katalognummer
	da: Medicinsk udstyr til <i>in vitro</i> -diagnostik
	da: Batch-kode
	da: Se brugsanvisningen
	da: Fremstiller
	da: Sidste anvendelsesdato
	da: Temperaturgrænse
	da: Holdes væk fra sollys
	da: Indeholder tilstrækkeligt til <n> tests
	da: Indhold

Patenter og varemærker

CytoCell er et registreret varemærke, der tilhørende CytoCell Ltd.

**Cytocell Ltd.**

Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, UK
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E: probes@cytoCell.com
W: www.ogt.com