



A Sysmex Group Company



## Instrukcja użytkownika

REF: LPH 067-S / LPH 067

## CLL PROFILER Kit



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO



www.cytocell.com

Dalsze informacje oraz dokumenty w innych językach są dostępne pod adresem [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

### Ograniczenia

Ten wyrób jest przeznaczony do wykrywania ubytków genomowych większych niż region, do którego wiążą się czerwone i zielone klony zawarte w tym zestawie sond, a który obejmuje regiony genów P53 (TP53), ATM i D13S319, lub naddatków genomowych większych niż region obejmowany przez niebieski klon zawarty w tym zestawie sond, a który obejmuje centromer chromosomu 12. Produkt ten może nie umożliwić wykrycia naddatków/ubytków genomowych, do których doszło poza tymi regionami, lub częściowych naddatków/ubytków, do których doszło w tym regionie. Ten test nie jest przeznaczony do użytku jako samodzielny test diagnostyczny, do badań prenatalnych, populacyjnych badań przesiewowych, badań przyłożkowych ani do samotestowania. Ten produkt jest przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego w laboratorium; wszystkie wyniki powinny być interpretowane przez personel posiadający odpowiednie kwalifikacje, z uwzględnieniem innych istotnych wyników testów.

Ten produkt nie został zatwierdzony do stosowania dla typów próbek lub chorób innych niż określone w części dotyczącej przeznaczenia.

Raportowanie i interpretacja wyników metody FISH powinny być zgodne z profesjonalnymi standardami praktyki i dokonywane z uwzględnieniem innych informacji klinicznych i diagnostycznych. Zestaw ten należy traktować jako uzupełnienie innych diagnostycznych testów laboratoryjnych. Z tego względu nie należy inicjować żadnych działań terapeutycznych wyłącznie na podstawie wyniku uzyskanego metodą FISH.

Nieprzestrzeganie protokołu może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.

Ten zestaw nie został zatwierdzony do stosowania w celach innych niż określone w części dotyczącej przeznaczenia.

### Przeznaczenie

Produkt CytoCell CLL PROFILER Kit to jakościowy, niezautomatyzowany test wykonywany metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (Fluorescence In Situ Hybridisation, FISH) przeznaczony do detekcji chromosomowych delecji w regionie 11q22.3 zlokalizowanym na chromosomie 11., w regionie 17p13.1 zlokalizowanym na chromosomie 17. lub w regionie 13q14.2-q14.3 zlokalizowanym na chromosomie 13. i/lub naddatków regionu centromerowego zlokalizowanego na chromosomie 12. w utrwalonych w roztworze Carnoy (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1) zawiesinach komórek pochodzenia hematologicznego pobranych od pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową (Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL).

### Wskazania

Ten produkt zaprojektowano jako produkt uzupełniający inne testy kliniczne i histopatologiczne wykonywane w ramach przyjętych ścieżek diagnostycznych i opieki klinicznej, w przypadku których wiedza o statusie delecji genu *P53* (TP53), *ATM* lub delecji genu D13S319 i/lub naddatku centromeru chromosomu 12. w istotny sposób wpływałaby na postępowanie kliniczne.

### Zasady działania testu

Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (Fluorescence In Situ Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują do całych chromosomów lub pojedynczych unikalnych sekwencji, i

stanowi istotne uzupełnienie cytogenetycznej analizy prążków G. Technika ta może być obecnie wykorzystywana jako kluczowe narzędzie diagnostyczne w chromosomalnych analizach prenatalnych, hematologicznych i guzów litych. Docelowa sekwencja DNA, po utrwaleniu i denaturacji, staje się dostępna do przyłączenia do zdenaturowanej w podobny sposób, fluorescencyjnie wyznakowanej sondy DNA o sekwencji komplementarnej. Po hybrydyzacji niezwiązane i nieswoiście związane sondy DNA są usuwane, a DNA jest barwiony kontrastowo w celu jego uwidocznienia. Sondy zhybrydowane do materiału docelowego można obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym.

### Informacje o sondzie

Produkt CytoCell CLL PROFILER Kit jest przeznaczony do wykrywania delecji genu TP53, ATM i D13S319 oraz naddatków sekwencji centromerowych chromosomu 12. w próbkach krwi obwodowej lub szpiku kostnego pobranych od pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową (CLL).

### P53(TP53)/ATM Probe Combination

Gen TP53 (*tumor protein p53*) zlokalizowany w regionie 17p13.1 to jeden z najważniejszych genów supresorowych nowotworów. Białko kodowane przez ten gen działa jako silny czynnik transkrypcyjny, który odgrywa kluczową rolę w zapewnianiu stabilności genetycznej. Utrata genu TP53 jest zgłaszana u 10% pacjentów z CLL i uznawana jest za marker powiązany z najgorszym rokowaniem tej choroby<sup>1,2</sup>.

Gen ATM (*ATM serine/threonine kinase*) zlokalizowany w regionie 11q22.3 koduje ważne białko stanowiące punkt kontrolny, które jest zaangażowane w zarządzanie uszkodzeniami komórki; jego funkcją jest ocena poziomu uszkodzeń DNA w komórce i próba ich naprawy poprzez fosforylację kluczowych substratów zaangażowanych w szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA<sup>3</sup>. Utrata genu ATM jest zgłaszana u 18% pacjentów z CLL i uznawana jest za marker powiązany ze złym rokowaniem tej choroby<sup>4</sup>.

Analiza interakcji genów ATM/TP53 w CLL potwierdziła, że geny TP53 i ATM odgrywają ważną rolę w proliferacji raka limfoidalnego<sup>5</sup>. Wykazano, że gen ATM nasila fosforylację białka kodowanego przez gen TP53, jeżeli uszkodzenia są tak duże, że komórka wymaga zniszczenia na drodze apoptozy (w której pośredniczy białko kodowane przez gen TP53). Delecja genu ATM powoduje zanik tej aktywności stanowiącej punkt kontrolny, a co za tym idzie nie dochodzi do aktywacji białka kodowanego przez gen TP53. W związku z tym, pomimo obecności białka kodowanego przez gen TP53, nie są podejmowane próby naprawy uszkodzeń ani inicjacji apoptozy uszkodzonych komórek. W przypadku braku genu ATM uszkodzone komórki mogą dalej ulegać proliferacji<sup>5</sup>.

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

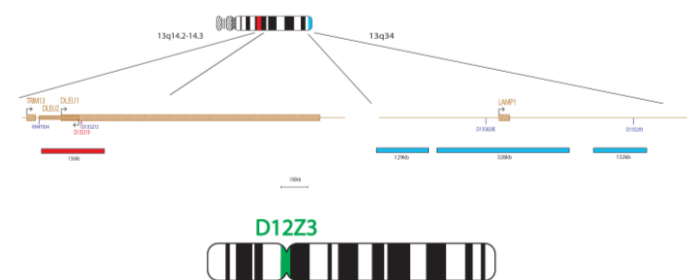
Delecje obejmujące region 13q14 są również strukturalnymi aberracjami genetycznymi najczęściej występującymi w przewlekłej białaczce limfocytowej (CLL)<sup>6,7,8</sup>. Zaobserwowano, że region ten ulega heterozygotycznej delecji u 30–60% pacjentów z CLL i homozygotycznej delecji u 10–20% pacjentów z CLL<sup>9</sup>. Wykazano, że wskaźnik przeżycia jest zbliżony w obu tych grupach<sup>10</sup>. Pacjenci z delecją regionu 13q14 są zaliczani do grupy niskiego ryzyka, o ile nie mają żadnych innych zmian genetycznych<sup>1</sup>.

Dwa geny niekodujące RNA, gen DLEU1 (*deleted in lymphocytic leukemia 1*) i gen DLEU2 (*deleted in lymphocytic leukemia 2*), oraz marker genetyczny D13S319 obejmują patogenny region krytyczny 13q14.11. Gen DLEU1 jest uważany za kandydata na gen supresorowy nowotworu najprawdopodobniej związany z CLL, zlokalizowany w regionie 13q14<sup>12</sup>. Trisomia chromosomu 12. jest powtarzającą się nieprawidłowością stwierdzaną w CLL, obserwowaną w 20% przypadków tej choroby<sup>13</sup>, która często występuje jako unikalna aberracja cytogenetyczna (40–60% przypadków z trisomią chromosomu 12.)<sup>7</sup>. Pacjenci z trisomią chromosomu 12. są zaliczani do grupy niskiego ryzyka o ile nie mają żadnych innych zmian genetycznych<sup>1</sup>.

### Specyfikacja sondy

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

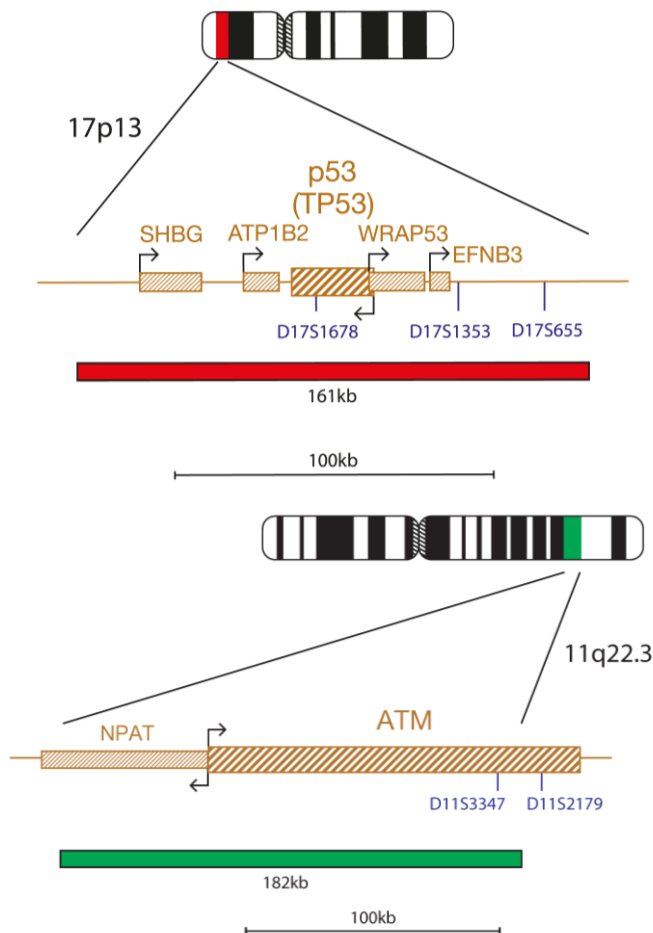
D13S319, 13q14.2, kolor czerwony  
13qter, 13q34, kolor niebieski  
D12Z3, 12p11.1-q11.1, kolor zielony



Sonda alfa-satelitarna dla chromosomu 12. to sonda zawierająca sekwencje powtórzone, wyznakowana zielonym fluoroforem, która rozpoznaje centromeryczną sekwencję powtórzoną D12Z3. Sonda D13S319, wyznakowana czerwonym fluoroforem obejmuje region o długości 156 kb, w którym znajduje się cały gen DLEU1 i większość sekwencji genu DLEU2 oraz markery D13S319, D13S272 i RH47934. Sonda swoista względem subteleru 13qter, wyznakowana niebieskim fluoroforem, umożliwia identyfikację chromosomu 13. i pełni funkcję sondy kontrolnej.

### P53 (TP53)/ATM

P53, 17p13.1, kolor czerwony  
ATM, 11q22.3, kolor zielony



Sonda P53 o długości 161 kz jest wyznakowana czerwonym fluoroforem i obejmuje cały gen P53 (TP53) i regiony flankujące. Sonda ATM o długości 182 kz jest wyznakowana zielonym fluoroforem i obejmuje telomeryczny koniec genu NPAT i centromeryczny koniec genu ATM za markerem D11S3347.

### Dostarczone materiały

**D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe:**  
50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)

### P53 (TP53)/ATM Probe:

50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)

Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydazyjnym (formamid; siarczan dekstranu; roztwór soli fizjologicznej i cytrynianu sodu (SSC)) i są gotowe do użycia.

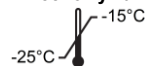
### Barwnik kontrastowy: 150 µl na fiolkę (15 testów)

Barwnikiem kontrastowym jest odczynnik DAPI antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol)).

### Ostrzeżenia i środki ostrożności

1. Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego.
2. Podczas pracy z sondami DNA i barwnikiem kontrastowym DAPI należy nosić rękawiczki.
3. Mieszaniny sond zawierają formamid, który wykazuje działanie teratogenne; nie wdychać oparów i nie dopuszczać do kontaktu ze skórą. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny.
4. DAPI jest potencjalnym czynnikiem rakotwórczym. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny.
5. Wszystkie materiały stwarzające zagrożenie należy wyrzucić zgodnie z wytycznymi placówki dotyczącymi usuwania odpadów stwarzających zagrożenie.
6. Operatorzy muszą być w stanie rozróżnić czerwony, niebieski i zielony kolor.
7. Nieprzestrzeganie wskazanego protokołu oraz nieużywanie właściwych odczynników może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.
8. Nie należy rozcieńczać sondy ani mieszać jej z innymi sondami.
9. Niezastosowanie 10 µl sondy podczas fazy denaturacji wstępnej wykonywanej w ramach protokołu może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.

### Przechowywanie i postępowanie z produktem



Zestaw należy przechowywać w zamrażarce w temperaturze od -25°C do -15°C do daty ważności wskazanej na etykiecie zestawu. Fiolki z sondami i barwnikiem kontrastowym należy przechowywać w ciemności.



Sonda zachowuje stabilność przez wszystkie cykle zamrażania i rozmrażania wykonywane podczas standardowego użytkowania produktu (jeden cykl jest definiowany jako wyjęcie sondy z zamrażarki i ponowne umieszczenie jej w zamrażarce) i zachowuje fotostabilność przez maksymalnie 48 godzin ciągłej ekspozycji na światło. Należy dołożyć wszelkich starań, aby ograniczyć ekspozycję produktów na światło i zmiany temperatury.

### Sprzęt i materiały wymagane, ale niedostarczane

Należy używać następującego skalibrowanego sprzętu:

1. Płyta grzewcza (ze stabilną płytą i możliwością dokładnej kontroli temperatury do 80°C)
2. Skalibrowane mikropipety i końcówki umożliwiające przenoszenie różnych objętości cieczy w zakresie 1–200 µl
3. Łaźnia wodna z możliwością dokładnej kontroli temperatury na poziomie 37°C i 72°C
4. Probówki mikrowirówkowe (0,5 ml)
5. Mikroskop fluorescencyjny (patrz część „Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego”)
6. Mikroskop z kontrastem fazowym
7. Czyste barwiacze Coplina z tworzywa sztucznego, ceramiki lub szkła żaroodpornego
8. Szczypczyki
9. Skalibrowany pH-metr (lub papierki wskaźnikowe pH umożliwiające pomiar pH w zakresie 6,5–8,0)
10. Pojemnik zapewniający dużą wilgotność powietrza
11. Olejek imersyjny odpowiedni do obiektów mikroskopowych klasy fluorescencyjnej
12. Wirówka laboratoryjna
13. Szkiełka mikroskopowe
14. Szkiełka nakrywkowe o wymiarach 24x24 mm
15. Stoper
16. Inkubator nastawiony na temperaturę 37°C
17. Klej kauczukowy
18. Wytrząsarka
19. Cylindry miarowe
20. Mieszadło magnetyczne
21. Skalibrowany termometr

### Opcjonalny sprzęt niedostarczany

1. Komora do suszenia próbek do badań cytogenetycznych

### Odczynniki wymagane, ale niedostarczane

1. Roztwór soli fizjologicznej i cytrynianu sodu (SSC), 20x
2. Etanol, 100%
3. Tween-20
4. Wodorotlenek sodu (NaOH), 1 M
5. Kwas solny (HCl), 1 M
6. Woda oczyszczona

### Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego

W celu optymalnej wizualizacji sondy zalecane jest używanie 100-watowej lampy rtęciowej lub równoważnej lampy i obiektywów planapochromatycznych umożliwiających stosowanie olejku imersyjnego przy powiększeniu 60/63x lub 100x. Fluorofory użyte w tym zestawie sond charakteryzują się następującymi długościami fal wzbudzenia i emisji:

Fluorofor	Wzbudzenie <sub>maks.</sub> [nm]	Emisja <sub>maks.</sub> [nm]
Błękitny	418	467
Zielony	495	521
Czerwony	596	615

Należy upewnić się, że w mikroskopie zamontowane są odpowiednie filtry wzbudzenia i emisji, które obejmują wymienione powyżej długości fal. Do jednoczesnej obserwacji zielonych i czerwonych fluoroforów optymalnie nadaje się potrójny filtr pasmowo-przepustowy dla barwnika DAPI/widma zielonego/widma czerwonego lub podwójny filtr pasmowo-przepustowy dla widma zielonego/widma czerwonego. Do obserwacji widma błękitnego optymalnie nadaje się pojedynczy filtr pasmowo-przepustowy dla widma błękitnego, a do równoczesnej wizualizacji fluoroforów zielonych, czerwonych i błękitnych optymalnie nadaje się potrójny filtr pasmowo-przepustowy dla widma czerwonego/zielonego/błękitnego.

Przed użyciem mikroskopu fluorescencyjnego należy sprawdzić, czy działa on prawidłowo. Należy stosować olejek imersyjny odpowiedni do mikroskopii fluorescencyjnej o składzie odpowiednim do niskiej autofluorescencji. Należy unikać mieszania barwnika DAPI antifade z mikroskopowym olejkiem imersyjnym, ponieważ spowoduje to zaciemnienie sygnałów. Należy przestrzegać zaleceń wytwórcy dotyczących okresu żywotności lampy i wieku filtrów.

### Przygotowanie próbek

Zestaw zaprojektowano do użytku na komórkach krwi obwodowej lub szpiku kostnego utrwalonych w roztworze Carnoy'a (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1). Komórki należy przygotować zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w laboratorium lub placówce. Należy przygotować próbki suszone na powietrzu na

szkiełkach mikroskopowych zgodnie ze standardowymi procedurami cytogenetycznymi. Podręcznik AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* zawiera zalecenia dotyczące pobierania próbek, prowadzenia hodowli komórek, zbierania komórek z hodowli oraz przygotowywania preparatów<sup>14</sup>.

#### Przygotowanie roztworów

##### Roztwory etanolu

Rozcieńczyć 100-procentowy etanol wodą oczyszczoną w określonych poniżej proporcjach i dokładnie wymieszać:

- 70-procentowy etanol — dodać 7 części 100-procentowego etanolu do 3 części wody oczyszczonej
- 85-procentowy etanol — dodać 8,5 części 100-procentowego etanolu do 1,5 części wody oczyszczonej

Przechowywać roztwory przez maksymalnie 6 miesięcy w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

##### 2x stężony roztwór SSC

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 9 częściami wody oczyszczonej; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

##### 0,4x stężony roztwór SSC

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 49 częściami wody oczyszczonej; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

##### 2x stężony roztwór SSC ze środkiem Tween-20 w stężeniu 0,05%

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 9 częściami wody oczyszczonej. Dodać 5 µl środka Tween-20 na 10 ml roztworu; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

##### Protokół FISH

(Uwaga: Należy możliwie ograniczyć ekspozycję sondy i barwnika kontrastowego na światło w laboratorium).

#### Przygotowanie szkiełek

1. Wkropić próbkę komórek na szkiełko mikroskopowe. Pozostawić do wyschnięcia. (Opcjonalnie, w przypadku korzystania z komory do suszenia próbek do badań cytogenetycznych: próbki należy nanieść przy użyciu komory do suszenia próbek do badań cytogenetycznych. Komora powinna mieć temperaturę około 25°C i zapewniać wilgotność 50%, aby umożliwić optymalne naniesienie próbki komórek. Jeśli komora do suszenia próbek do badań cytogenetycznych nie jest dostępna, należy pozostawić próbki pod wyciągiem).
2. Zanurzyć szkiełko w 2x stężonym roztworze SSC w temperaturze pokojowej na 2 minuty; nie wstrząsać.
3. Odwodnić próbkę, korzystając z szeregu alkoholowego (etanol w stężeniu 70%, 85% i 100%); zanurzać szkiełko w każdym roztworze alkoholu na 2 minuty w temperaturze pokojowej.
4. Pozostawić do wyschnięcia.

#### Denaturacja wstępna

5. Wyjąć roztwór sond z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej. Przed użyciem roztworu należy krótko odwirować probówkę.
6. Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
7. Pobrać 10 µl roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość do probówki mikrowirówkowej. Bezwzględnie włożyć pozostały roztwór sond z powrotem do zamrażarki.
8. Umieścić roztwór sond i szkiełko z próbką na płycie grzewczej o temperaturze 37°C (+/-1°C) na 5 minut w celu ich wstępnego ogrzania.
9. Wkropić 10 µl mieszaniny sond na próbkę komórek i ostrożnie nanieść szkiełko nakrywkowe. Zakleić szkiełko klejem kauczukowym i poczekać na jego całkowite wyschnięcie.

#### Denaturacja

10. Denaturować jednocześnie próbkę i mieszaninę sond, ogrzewając szkiełko na płycie grzewczej o temperaturze 75°C (+/-1°C) przez 2 minuty.

#### Hybrydyzacja

11. Umieścić szkiełko w wilgotnym, światłoszczelnym pojemniku w temperaturze 37°C (+/-1°C) na noc.

#### Płukania po hybrydyzacji

12. Wyjąć barwnik DAPI z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej.
13. Ostrożnie zdjąć szkiełko nakrywkowe i usunąć wszelkie pozostałości kleju.
14. Zanurzyć szkiełko w 0,4x stężonym roztworze SSC (pH 7,0) w temperaturze 72°C (+/-1°C) na 2 minuty; nie wstrząsać.
15. Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie zanurzyć je w 2x stężonym roztworze SSC ze środkiem Tween-20 w stężeniu 0,05% (pH 7,0) w temperaturze pokojowej na 30 sekund; nie wstrząsać.
16. Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie nanieść 10 µl barwnika DAPI antyfade na każdą próbkę.
17. Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić rozwój barw.
18. Obejrzeć pod mikroskopem fluorescencyjnym (patrz **Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego**).

#### Stabilność wykonanych preparatów

Preparaty poddane procedurze nadają się do analizy przez maksymalnie 1 miesiąc, o ile są przechowywane w ciemności w temperaturze pokojowej lub niższej.

#### Zalecenia dotyczące procedury

1. Wypiekanie lub postarzanie preparatów może zmniejszyć fluorescencję sygnału.
2. Stosowanie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę Cytocell Ltd może mieć negatywny wpływ na warunki hybrydyzacji.
3. Do pomiaru temperatury roztworów, łaźni wodnych i inkubatorów należy używać skalibrowanego termometru, ponieważ temperatury te są kluczowe dla optymalnego działania produktu.
4. Stężenia, wartości pH i temperatury roztworów wykorzystywanych do płukania są istotne, gdyż mało surowe warunki mogą doprowadzić do nieswoistego wiązania sondy, a zbyt surowe warunki mogą spowodować brak sygnału.
5. Niecałkowita denaturacja może spowodować brak sygnału, a nadmierna denaturacja może również doprowadzić do nieswoistego wiązania.
6. Nadmierna hybrydyzacja może spowodować otrzymanie dodatkowych lub nieoczekiwanych sygnałów.
7. Przed użyciem testu do celów diagnostycznych użytkownicy powinni zoptymalizować protokół dla własnych próbek.
8. Suboptymalne warunki mogą prowadzić do nieswoistego wiązania sond, które może zostać błędnie zinterpretowane jako sygnał sondy.

#### Interpretacja wyników

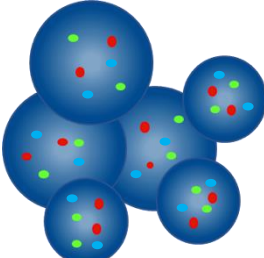
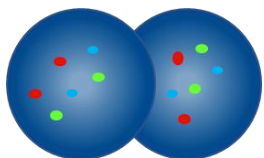
##### Ocena jakości preparatów

Preparatu nie należy oceniać w następujących przypadkach:

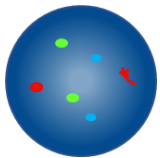
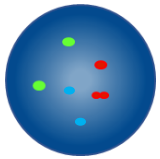
- Sygnały są zbyt słabe, aby można było analizować je w pojedynczych filtrach — do analizy można przystąpić jedynie, jeśli sygnały są jasne, wyraźne i łatwe do oceny.
- Widoczna jest duża liczba zlepionych/nakładających się na siebie komórek, co utrudnia analizę.
- W >50% komórek nie doszło do hybrydyzacji.
- Pomiędzy komórkami znajdują się liczne cząstki fluorescencyjne i/lub widoczne jest „zamglenie” fluorescencyjne, które zakłóca sygnały — w przypadku preparatów optymalnych do oceny tło powinno być ciemne lub czarne i klarowne.
- Nie można rozróżnić granic jądra komórkowego lub są one nieciągłe.

##### Wytyczne dotyczące analizy

- Każda próbka powinna być analizowana i interpretowana przez dwóch analityków. Wszelkie rozbieżności powinny zostać rozwiązane w wyniku oceny dokonanej przez trzeciego analityka.
- Każdy analityk powinien posiadać odpowiednie kwalifikacje zgodnie z normami krajowymi.
- Każdy analityk powinien dokonać niezależnej oceny 100 jąder dla każdej próbki. Pierwszy analityk powinien rozpocząć analizę od lewej strony preparatu, a drugi od prawej strony preparatu.
- Każdy analityk powinien zapisać własne wyniki w odrębnym arkuszu.
- Należy analizować wyłącznie nienaruszone jądra, nie wolno analizować jąder nakładających się na siebie, zlepionych, pokrytych resztkami cytoplazmy ani jąder wykazujących wysoki stopień autofluorescencji.
- Należy unikać obszarów, w których występuje nadmierna ilość resztek cytoplazmy lub nieswoista hybrydyzacja.
- Intensywność sygnału może się różnić nawet w obrębie jednego jądra. W takich przypadkach należy użyć filtrów pojedynczych i/lub wyregulować płaszczyznę ogniskowania.
- W warunkach suboptymalnych sygnały mogą wyglądać na rozlane. Jeśli dwa sygnały o tym samym kolorze stykają się ze sobą, odległość między nimi jest nie większa niż dwie szerokości sygnału lub istnieje cienkie pasmo łączące oba sygnały, należy zliczać je jako jeden sygnał.
- W przypadku wątpliwości, czy komórka nadaje się do analizy, nie należy jej analizować.

Wytyczne dotyczące analizy	
	Nie zliczać — jądra są za blisko siebie, aby można było określić ich granice
	Nie zliczać jąder nakładających się na siebie — nie są widoczne całe obszary obu jąder

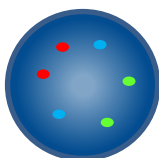


	Zliczyć jako dwa sygnały czerwone, dwa sygnały niebieskie i dwa sygnały zielone — jeden z dwóch sygnałów czerwonych jest rozlany
	Zliczyć jako dwa sygnały czerwone, dwa sygnały niebieskie i dwa sygnały zielone — przerwa widoczna w jednym sygnale czerwonym jest mniejsza niż dwie szerokości sygnału

#### Wyniki oczekiwane

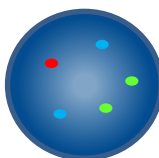
##### **D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe**

Oczekiwany wzorec sygnału wskazujący na stan prawidłowy

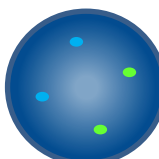


W komórce prawidłowej oczekiwane są dwa sygnały czerwone, dwa sygnały niebieskie i dwa sygnały zielone (2C, 2N, 2Z).

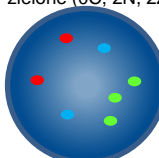
Oczekiwane wzorce sygnału wskazujące na stan nieprawidłowy



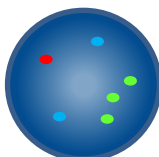
Oczekiwany wzorec sygnału w komórce z hemizygotyczną delecją locus D13S319 to jeden sygnał czerwony, dwa sygnały niebieskie i 2 sygnały zielone (1C, 2N, 2Z).



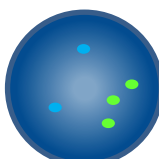
Oczekiwany wzorec sygnału w komórce z homozygotyczną delecją locus D13S319 to zero sygnałów czerwonych, dwa sygnały niebieskie i dwa sygnały zielone (0C, 2N, 2Z).



Oczekiwany wzorec sygnału w komórce z trisomią chromosomu 12. i prawidłowym statusem genu D13S319 to trzy sygnały czerwone, dwa sygnały niebieskie i trzy sygnały zielone (2C, 2N, 3Z).



Oczekiwany wzorec sygnału w komórce z trisomią chromosomu 12. i hemizygotyczną delecją genu D13S319 to trzy sygnały czerwone, dwa sygnały niebieskie i dwa sygnały zielone (1C, 2N, 2Z).

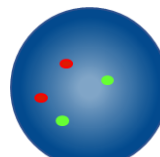


Oczekiwany wzorec sygnału w komórce z trisomią chromosomu 12. i homozygotyczną delecją genu D13S319 to trzy sygnały czerwone, dwa sygnały niebieskie i dwa sygnały zielone (1C, 2N, 2Z).

W przypadku próbek aneuploidalnych/z rearanżacją nie zrównoważoną mogą wystąpić inne wzorce sygnału.

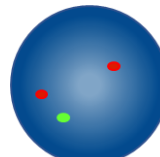
#### **P53/ATM Probe**

Oczekiwany wzorec sygnału wskazujący na stan prawidłowy

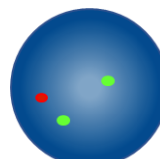


W komórce prawidłowej oczekiwane są dwa sygnały czerwone i dwa sygnały zielone (2C, 2Z).

Oczekiwane wzorce sygnału wskazujące na stan nieprawidłowy



Oczekiwany wzorec sygnału w komórce z delecją genu ATM to dwa sygnały czerwone i jeden sygnał zielony (2C, 1Z).



Oczekiwany wzorec sygnału w komórce z delecją genu P53 to jeden sygnał czerwony i dwa sygnały zielone (1C, 2Z).

W przypadku próbek aneuploidalnych/z rearanżacją nie zrównoważoną mogą wystąpić inne wzorce sygnału.

#### **Znana reaktywność krzyżowa**

Zielona sonda D12Z3 może wykazywać hybrydyzację krzyżową względem regionu 3c, 6c, 7c i 10c.

#### **Zgłaszanie zdarzeń niepożądanych**

W przypadku podejrzenia nieprawidłowego działania tego wyrobu lub pogorszenia jego właściwości użytkowych, które mogło przyczynić się do wystąpienia zdarzenia niepożądanego (np. opóźnienia diagnozy lub postawienia błędnej diagnozy, opóźnienia leczenia lub podjęcia niewłaściwego leczenia), należy bezzwłocznie zgłosić ten fakt wytwórcy (e-mail: [vigilance@ogt.com](mailto:vigilance@ogt.com)).

Jeśli ma to zastosowanie, zdarzenie należy zgłosić także właściwemu organowi krajowemu. Wykaz punktów kontaktowych ds. nadzoru nad produktami (ang. vigilance) jest dostępny na stronie: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

#### **Specyficzne parametry skuteczności**

##### **Swoistość analityczna**

Swoistość analityczna to odsetek sygnałów, które hybrydują do właściwego locus i nie hybrydują do żadnej innej lokalizacji. Swoistość analityczną ustalono poprzez analizę łącznie 200 loci docelowych. Swoistość analityczną obliczono jako liczbę sygnałów FISH zhybrydowanych do prawidłowego locus podzieloną przez całkowitą liczbę zhybrydowanych sygnałów FISH.

Tabela 1. Swoistość analityczna dla produktu CLL PROFILER Kit

Zestaw	Sonda	Locus docelowe	L. sygnałów zhybrydowanych do prawidłowego locus	Łączna liczba zhybrydowanych sygnałów	Swoistość (%)
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	D13S319, kolor czerwony	13q14.2	200	200	100
	13qter, kolor niebieski	13q34	200	200	100
	D12Z3, kolor zielony	12p11.1-q11.1	200	200	100
P53/ATM Probe	Czerwony P53	17p13	200	200	100
	ATM, kolor zielony	11q22.3	200	200	100

### Czułość analityczna

Czułość analityczna to odsetek komórek interfazowych nadających się do oceny z oczekiwanym wzorcem sygnału wskazującym na stan prawidłowy. Czułość analityczną ustalono poprzez analizę komórek interfazowych w różnych próbkach prawidłowych. Czułość obliczano jako odsetek komórek nadających się do oceny, w których zaobserwowano oczekiwany wzorzec sygnału (z 95-procentowym przedziałem ufności).

Tabela 2. Czułość analityczna dla produktu CLL PROFILER Kit

Zestaw	L. komórek z oczekiwanym wzorcem sygnału	L. komórek z sygnałami nadającymi się do oceny	Czułość (%)	95-procentowy przedział ufności
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	467	500	93,4	2,6
P53/ATM Probe	479	500	95,8	1,7

### Charakterystyka wartości odcięcia dla stanu prawidłowego

Wartość odcięcia dla stanu prawidłowego, określana w odniesieniu do sond FISH, to maksymalny odsetek komórek interfazowych nadających się do oceny, dla których obserwowany jest określony wzorzec sygnału charakterystyczny dla stanu nieprawidłowego, przy którym próbka jest uznawana za prawidłową pod względem tego wzorca sygnału.

Wartość odcięcia dla stanu prawidłowego ustalono przy użyciu próbek pobranych od pacjentów ze stanem prawidłowym i pacjentów dodatnich względem badanej rearanżacji. Dla każdej próbki zarejestrowano wzorzec sygnału dla 100 komórek. W celu określenia wartości progowej, dla której uzyskiwana jest maksymalna wartość czułość + swoistość-1, obliczono indeks Youdena.

Tabela 3. Charakterystyka wartości odcięcia dla stanu prawidłowego dla produktu CLL PROFILER Kit

Zestaw	Rearanżacja	Wzorzec sygnału wskazujący na stan nieprawidłowy	Indeks Youdena	Wartość odcięcia dla stanu prawidłowego (%)
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	Hemizygotyczna delecja genu D13S319	1C, 2N, 2Z	0,96	6
	Trisomia chromosomu 12.	2C, 2N, 3Z	0,99	4
P53/ATM Probe	Delecja genu P53	1C, 2Z	0,99	8
	Delecja genu ATM	2C, 1Z	0,99	8

Laboratoria muszą zweryfikować wartości odcięcia w oparciu o własne dane<sup>15,16</sup>.

### Precyzja i odtwarzalność

Precyzja to miara naturalnej zmienności wyników testu przy wielokrotnym powtarzaniu testu w tych samych warunkach. Miarę tę oceniono poprzez analizę powtórzeń wykonanych przy użyciu produktu zawierającego sondy o tym samym numerze serii, który wykorzystywano do badań jednej próbki, w niezmiennych warunkach, w ramach jednego dnia.

Odtwarzalność to miara zmienności testu, którą ustalono w kategoriach zmienności między próbkami, między dniami i między seriami. Odtwarzalność między dniami oceniano poprzez analizę tych samych próbek w trzech różnych dniach. Odtwarzalność między seriami oceniano poprzez analizę tych samych próbek w ramach jednego dnia przy użyciu produktu zawierającego sondy o trzech różnych numerach serii. Odtwarzalność między próbkami oceniono poprzez analizę trzech powtórzeń każdej próbki w ramach jednego dnia. Dla każdej próbki rejestrowano wzorce sygnału obserwowane w 100 komórkach interfazowych i obliczano odsetek komórek, w których zaobserwowano oczekiwany wzorzec sygnału.

Odtwarzalność i precyzję obliczono jako odchylenie standardowe (STDEV) między powtórzeniami dla każdej zmiennej i ogólne średnie STDEV.

Tabela 4. Odtwarzalność i precyzja dla produktu CLL PROFILER Kit

Zmienna	Odchylenie standardowe (STDEV)	
	D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	P53/ATM Probe
Precyzja	1,28	1,37
Między próbkami	1,30	1,60
Między dniami	4,12	2,27
Między seriami	2,04	1,77
Odchylenie ogółem	3,30	1,98

### Skuteczność kliniczna

Skuteczność kliniczną ustalono na reprezentatywnej próbce docelowej populacji pacjentów. Dla każdej próbki zarejestrowano wzorzec sygnału dla  $\geq 100$  komórek

interfazowych. Status prawidłowy/nieprawidłowy określano poprzez porównanie odsetka komórek z określonym wzorcem sygnału wskazujący na stan nieprawidłowy do wartości odcięcia dla stanu prawidłowego. Wyniki porównano następnie ze znanym statusem próbki.

Wyniki danych klinicznych poddano analizie w celu uzyskania wartości czułości, swoistości i wartości odcięcia, stosując podejście jednowymiarowe.

Tabela 5. Skuteczność kliniczna dla produktu CLL PROFILER Kit

Rearanżacja	Czułość kliniczna (odsetek wyników dodatnich (True Positive Rate, TPR))	Swoistość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie ujemnych (True Negative Rate, TNR))	Odsetek wyników fałszywie dodatnich (False Positive Rate, FPR) = 1 – swoistość
<i>D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe</i>			
D13S319 Deletion	96,6%	99,5%	0,5%
Trisomia chromosomu 12.	100%	100,0%	0%
<i>P53/ATM Probe</i>			
Delecja genu P53	100%	100%	0%
Delecja genu ATM	100%	100%	0%

### Dodatkowe informacje

W celu uzyskania dodatkowych informacji na temat produktu należy skontaktować się z działem wsparcia technicznego firmy CytoCell.

Tel.: +44 (0)1223 294048






E-mail: techsupport@cytoCELL.com



Strona WWW: www.ogt.com

### Piśmiennictwo

- Rossi D, *et al.*, Blood. 2013 Feb 21;121(8):1403-12
- Baliakas P, *et al.*, Leukemia. 2014;(April):1-8
- Stankovic *et al.*, Blood 2004;103(1):291-300
- Dohner *et al.*, N Eng J Med 2000;343:1910-1916
- Khanna *et al.*, Nature Genetics 1998;20(4):398-400
- Juliussen G *et al.*, N Eng J Med 1990;323:720-4
- Puiggros *et al.*, Biomed Res Int 2014;1:1-13
- Kasar *et al.*, Nature Communications 2015;6:1-12
- Hammarsund M *et al.*, FEBS Letters 2004;556:75-80
- Van Dyke DL *et al.*, Br J Haematology 2009;148:544-50
- Liu Y *et al.*, Oncogene 1997;15:2463-73
- Wolf S *et al.*, Hum Mol Genet 2001;10:1275-85
- Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
- Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. Genet Med. 2011;13(7):667-675.
- Wiktor AE, Dyke DLV, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16-23.

### Objaśnienie symboli

REF	pl: Numer katalogowy
IVD	pl: Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>
LOT	pl: Kod partii
	pl: Zajrzyj do instrukcji używania
	pl: Wytwórca
	pl: Użyj do daty
	pl: Dopuszczalna temperatura
	pl: Trzymać z dala od światła słonecznego

	<b>pl:</b> Zawartość wystarczająca do <n> testów
	<b>pl:</b> Zawartość

**Patenty i znaki towarowe**

CytoCell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy CytoCell Ltd.



**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  
Strona WWW: www.ogt.com