



A Sysmex Group Company



Lietošanas instrukcija

REF: LPH 087-S / LPH 087

CLL Plus Screening Panel



TIKAI PROFESIONĀLAM LIETOJUMAM



www.cytocell.com

Papildinformācija un informācija citās valodās ir pieejama vietnē
www.ogt.com

Ierobežojumi

Šī ierīce ir paredzēta genomisko zudumu un pieaugumu noteikšanai, kuru lielums pārsniedz reģionus, ko ietver sarkanie kloni šajā zonu komplektā, un kuros ietilpst reģioni 13q14.3, *ATM*, *P53 (TP53)* un *MYB*, kā arī 12. hromosomas centromēra reģioni. Izmantojot šo produktu, var netikt noteikti genomiskie zudumi un pieaugumi ārpus šiem reģioniem vai daļēji šo reģionu zudumi.

Šis tests nav paredzēts: izmantošanai autonoma diagnostikas līdzekļa statusā, prenatalāi testēšanai, konkrētu populāciju skrīningam, testēšanai ārpus laboratorijas un paštestēšanai. Šis produkts ir paredzēts tikai profesionālai lietošanai laboratorijās; visu rezultātu interpretēšana jāveic atbilstoši kvalificētiem darbiniekiem, ņemot vērā citu attiecināmo testu rezultātus.

Šis produkts nav apstiprināts lietošanai tādu tipu paraugiem vai slimbībām, kas nav norādīti informācijā par paredzēto lietojumu.

Ziņošana par luminiscētās in situ hibridizācijas rezultātiem un to interpretēšana ir jāveic atbilstoši profesionālajiem prakses standartiem un ir jāņem vērā cita klīniskā un diagnostikas informācija. Šis komplekts ir paredzēts kā citu diagnostisko laboratorijas testu palīg līdzeklis, un lēmumus par terapiju nedrīkst pieņemt, vadoties tikai pēc luminiscētās in situ hibridizācijas rezultātiem.

Neievērojot attiecīgo protokolu, var tikt ietekmēta veikspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi vai kļūdaini negatīvi rezultāti.

Šis komplekts nav apstiprināts izmantošanai nolūkiem, kas neatbilst norādītajam paredzētajam lietojumam.

Paredzētais lietojums

Skrīninga panelis CLL Plus Screening Panel ir kvalitatīvs, neautomatizēts luminiscētās in situ hibridizācijas (fluorescence in situ hybridisation — FISH) tests, kas paredzēts hromosomālo delēciju noteikšanai 11. hromosomas reģionā 11q22.3, 17. hromosomas reģionā 17p13.1 vai 13. hromosomas reģionā 13q14.2-q14.3, kā arī/vai 12. hromosomas centromēriskā reģiona pieauguma noteikšanai un/vai delēciju, kurās iesaistīts 6. hromosomas reģions atrašanās vietā 6q23.3, noteikšanai Karnuā šķīdumā (3:1 metanols/etiķskābe) fiksētās hematoloģiski iegūtās šūnu suspensijās no pacientiem, kuriem ir konstatēta hroniska limfocitiskā leikēmija (HLL).

Indikācijas

Šis produkts ir paredzēts kā citu klīnisko un histopatoloģisko testu papildinājums atzītās diagnostikas un klīniskās aprūpes metodēs, kad informācija par P53 (TP53) delēcijas, *ATM* delēcijas vai D13S319 delēcijas statusu un/vai 12. hromosomas centromēra pieauguma statusu ir svarīga klīniskajai pārvaldībai.

Testa principi

Luminiscētā in situ hibridizācija (fluorescence in situ hybridisation — FISH) ir metode, kas ļauj noteikt DNS sekvences metafāzu hromosomās vai interfāzes kodolos fiksētiem citoģenētiskiem paraugiem. Šajā metodē tiek izmantotas DNS zondes, kas hibridizējas ar veselām hromosomām vai atsevišķām unikālām sekvencēm un kalpo kā efektīvs G joslu citoģenētiskās analīzes palīg līdzeklis. Šo metodi tagad var lietot kā būtisku izmeklēšanas instrumentu prenatalajā, hematoloģiskajā un šķīdumu audzēju hromosomālajā analīzē. Mērķa DNS pēc fiksācijas un denaturēšanas ir pieejama hibridizācijai ar līdzīgi denaturētu, luminiscējoši marķētu DNS zondi, kurai ir papildu sekvence. Pēc hibridizācijas nesaisītā un nespecifiski saistītā DNA zonde tiek aizvākta un DNS tiek kontrastēta

vizualizācijai. Pēc tam, izmantojot luminiscences mikroskopiju, hibridizēto zondi var vizualizēt mērķa materiālā.

Informācija par zondi

Hematoloģiskās zondes un alfa satelītzonde izmantošanai hroniskas limfocitiskās leikēmijas (HLL) gadījumā.

Alpha Satellite 12 Plus for CLL

12. hromosomas trisomija ir anormalitāte ar tendenci atkārtoties, tā ir konstatējama 20% HLL gadījumu¹ un bieži ir novērojama kā unikāla citoģenētiska aberācija (40–60% gadījumu ar 12. hromosomas trisomiju)². Pacienti ar 12. hromosomas trisomiju tiek klasificēti kā piederoši pie zema riska grupas, ja nav nekādu citu ģenētisku bojājumu³. Šis produkts arī ir pieejams kā 5 (LPH 069-S) un 10 (LPH 069) testu komplekts un ir optimizēts hibridizācijai līdz nākamajai dienai.

13q14.3

Delēcijas, kas ietekmē 13q14, ir visbiežāk sastopamās strukturālās ģenētiskās aberācijas hroniskā limfocitiskajā leikēmijā (HLL)^{3,4,5}. 30–60% HLL pacientu ir konstatēta šī reģiona heterozigota delēcija, savukārt 10–20% HLL pacientu ir konstatēta šī reģiona homozigota delēcija⁶. Pacienti ar 13q14 delēcijām tiek klasificēti kā ļoti zema riska grupas pārstāvji, ja nav nekādu citu ģenētisku bojājumu⁹.

P53 (TP53) (17p13.1)

Gēns TP53 (*onkoproteīns p53*), kas atrodas 17p13.1, ir viens no svarīgākajiem antionkogēniem, kā arī spēcīgs iedarbības transkripcijas faktors, kuram ir būtiska loma ģenētiskās stabilitātes nodrošināšanā. TP53 zudums ir konstatējams 10% pacientu, kuri cieš no HLL, un tiek uzskatīts par visnelabvēlīgākās prognozes marķieri^{3,7}.

ATM (11q22.3)

ATM (*ATM serīna/treonīna kināzes*) gēns, kas atrodas 11q22.3, ir svarīgs kontrolpunkta gēns, kas iesaistīts šūnu bojājumu pārvaldībā; tā funkcijas ir DNA bojājumu šūnā līmeņa novērtēšana un mēģināšana tās izlabot, fosforilējot galvenos substrātus, kas iesaistīti reaģēšanas uz DNS bojājumiem ceļā⁸. ATM zudums ir konstatējams 18% pacientu, kuri cieš no HLL, un tiek uzskatīts par nelabvēlīgas prognozes marķieri hroniskā limfocitiskajā leikēmijā (HLL)⁹.

MYB (6q23.3)

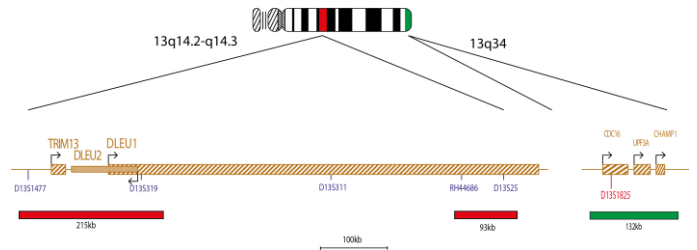
Hromosomas 6q delēcijas hroniskajā limfocitiskajā leikēmijā (HLL) notiek atkārtoti. Gēns MYB (*MYB protoonkogēns, transkripcijas faktors*) ir būtiski svarīgs hematopoētisko šūnu proliferācijā un diferenciācijā^{10,11}. Tas atrodas joslā 6q23.3 un ir 6q delēcijas marķieris.

Zondes specifikācija

Zonde 13q14.3 Deletion Probe

13q14.2-q14.3, sarkana

13qter, 13q34, zaļa

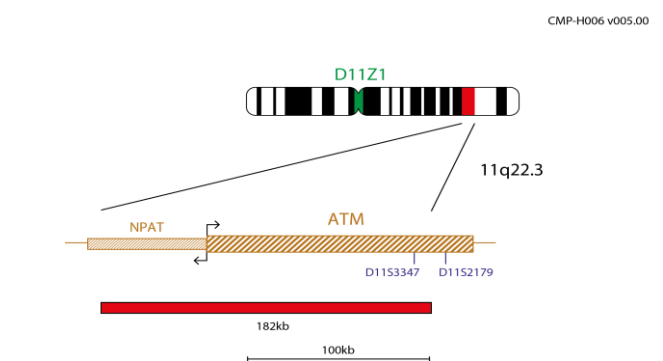


13q14.2-q14.3 zondes, marķētas sarkanā krāsā, nosedz marķierus D13S319 un D13S25. 13qter subteloģenētiskā specifiskā zonde (klons 163C9), kas marķēta zaļā krāsā, ļauj identificēt 13. hromosomu un darbojas kā kontrolzonde.

Zonde ATM Deletion Probe

ATM, 11q22.3, sarkana

D11Z1, 11p11.1-q11.1, zaļa



ATM zonde ir 182kb, marķēta sarkanā krāsā un nosedz NPAT gēna telomērisko galu un ATM gēna centromērisko galu līdz vietai tieši aiz D11S3347 marķiera. Zondes maisījumā ietilpst arī 11. centromēra (D11Z1) kontrolzonde, kas marķēta zaļā krāsā.

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

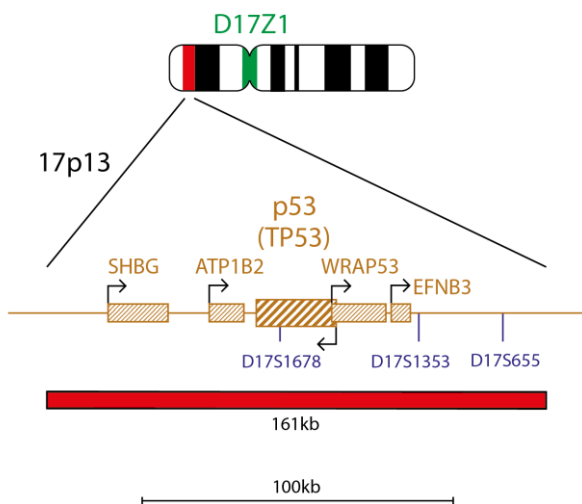


Zonde Alpha-Satellite 12 Plus Probe ir atkārtotas sekvenču zonde, marķēta sarkanā krāsā un atpazīst centromērisko atkārtoto sekvenču D12Z3.

Zonde P53 (TP53) Deletion Probe

P53, 17p13, sarkana
D17Z1, 17p11.1-q11.1, zaļa

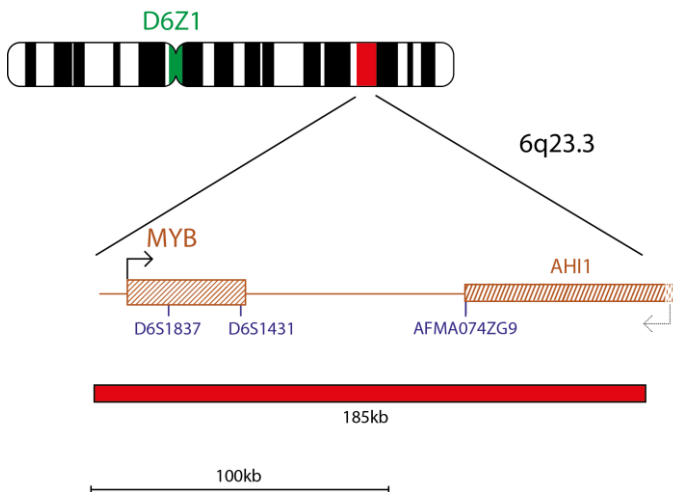
CMP-H039 V007.00



p53 (TP53) zonde ir 161kb zonde, marķēta sarkanā krāsā un nosedz visu p53 (TP53) gēnu un tam piegulošos reģionus. Zondes maisījumā ietilpst arī 17. centromēra (D17Z1) kontrolzonde, kas marķēta zaļā krāsā.

Zonde MYB Deletion Probe

MYB, 6q23.3, sarkana
D6Z1, 6p11.1-q11.1, zaļa



MYB zonžu maisījumā ietilpst 185kb zonde, marķēta sarkanā krāsā, kas nosedz visu MYB gēnu un reģionu telomēriski šim gēnam, kurā ietilpst AHI1 gēna centromēriskā daļa. Šajā zonžu maisījumā ietilpst arī 6. centromēra (D6Z1) kontrolzonde, kas marķēta zaļā krāsā.

Nodrošinātie materiāli

Zondes: 50 µl flakonā (5 testi) vai 100 µl flakonā (10 testi)
Zondes tiek nodrošinātas iepriekš sajauktā veidā hibridizācijas šķīdumā (formamīds; dekstrāna sulfāts; citrāta fizioloģiskais šķīdums (salīne-sodium citrate — SSC)) un ir gatavas lietošanai.

Kontrasta krāsviela: 150 µl flakonā (15 testi)

Kontrasta krāsviela ir DAPI luminiscences uzturēšanas šķīdums (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindols)).

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

1. Paredzēts lietošanai *in vitro* diagnostikā. Tikai profesionālai lietošanai.
2. Apejoties ar DNS zondēm un DAPI kontrasta krāsvielu, valkājiet cimdus.

3. Zondes maisījumos ietilpst formamīds, kas ir teratogēns, tādēļ nedrīkst pieļaut to izgarojumu ieelpošanu un nonākšanu saskarē ar ādu. Rīkojieties ar to piesardzīgi; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku.
4. DAPI ir potenciāli kancerogēna viela. Rīkojieties ar to piesardzīgi; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku.
5. Atbrīvojieties no visām bīstamajām vielām atbilstoši jūsu iestādē spēkā esošajam vadlīnijām attiecībā uz bīstamu atkritumu utilizāciju.
6. Operatoriem jāspēj atšķirt sarkano, zilo un zaļo krāsu.
7. Neievērojot norādīto protokolu un norādījumus par reaģentiem, var tikt ietekmēta veikspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi vai kļūdaini negatīvi rezultāti.
8. Zondi nedrīkst atšķaidīt vai veidot maisījumus ar citām zondēm.
9. Ja protokola priekšdenaturēšanas fāzes laikā netiek izmantoti 10 µl zondes, var tikt ietekmēta veikspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi vai kļūdaini negatīvi rezultāti.

Uzglabāšana un apiešanās



Komplekts ir jāglabā saldētavā, temperatūras diapazonā no -25 °C līdz -15 °C, līdz pat derīguma termiņa beigu datumam, kas norādīts uz komplekta marķējuma. Zondes un kontrasta krāsvielas flakoni ir jāuzglabā tumsā.



Zonde paliek stabila normālas lietošanas gaitā notiekošajos sasaldēšanas/atkausēšanas ciklos (vienu ciklu veido zondes izņemšana no saldētavas un ievietošana atpakaļ saldētavā) un ir fotostabila līdz pat 48 stundām pēc nonākšanas pastāvīgā apgaismojumā. Ir jāveic viss iespējamais, lai ierobežotu gaismas un temperatūras svārstību ietekmi.

Aprīkojums un materiāli, kas ir nepieciešami, bet nav iekļauti komplektācijā

Ir jāizmanto kalibrēts aprīkojums.

1. Sildierīce (ar cietu sildvirsmu un precīzu temperatūras regulēšanu līdz pat 80 °C)
2. Kalibrētas dažāda tilpuma mikropipetes un uzgaļi 1–200 µl diapazonā.
3. Ūdens vanna ar precīzu temperatūras regulēšanu — 37 °C un 72 °C
4. Mikrocentrifūgas mēģenes (0,5 ml)
5. Luminiscences mikroskops (sk. sadaļu Ieteikumi attiecībā uz luminiscences mikroskopu)
6. Fāžu kontrasta mikroskops
7. Trīs plastmasas, keramikas vai karstumizturīga stikla Koplina trauki
8. Pincete
9. Kalibrēta pH mērierīce (vai pH indikatora strēmeles, ar kurām var veikt mērījumus pH 6,5–8,0 diapazonā)
10. Kontainers ar mitru vidi
11. Luminiscencei atbilstoša mikroskopa objektīva iegremdēšanas eļļa
12. Galda centrifūga
13. Mikroskopa priekšmetstikliņi
14. 24x24 mm segstikliņi
15. Taimeris
16. 37 °C inkubators
17. Gumijas līme
18. Virpuļmaisītājs
19. Mērcilindri
20. Magnētiskais maisītājs
21. Kalibrēts termometrs

Papildaprīkojums, kas nav ietverts komplektācijā

1. Citoģenētiskā žāvēšanas kamera

Nepieciešamie reaģenti, kas nav ietverti komplektācijā

1. 20x citrāta fizioloģiskais šķīdums (salīne-sodium citrate — SSC)
2. 100% etanols
3. Tween-20
4. 1M nātrija hidroksīds (NaOH)
5. 1M sāļsskābe (HCl)
6. Attīrīts ūdens

Uz luminiscences mikroskopa attiecināmie ieteikumi

Lai nodrošinātu optimālu vizualizāciju, izmantojiet 100 W dzīvsudraba spuldzi vai ekvivalentu gaismas avotu un eļļā iegremdējamus 60/63x vai 100x objektīvus. Šajā zonžu komplektā izmantotie fluorofori tiks ierosināti un izstaros tālāk norādītā garuma viļņos.

Fluorofors	Ierosme maks. [nm]	Izstarošana maks. [nm]
Zaļš	495	521
Sarkans	596	615

Nodrošiniet, lai mikroskops būtu aprīkots ar iepriekš norādītajiem viļņu garumiem atbilstošiem ierosmes un izstarošanas filtriem. Lai nodrošinātu optimālu zaļo un sarkano fluoroforu vienlaicīgu vizualizāciju, izmantojiet trīsjoslu DAPI/zaļā spektra/sarkana spektra filtru vai divjoslu zaļā spektra/sarkana spektra filtru.

Pirms lietošanas pārbaudiet luminiscences mikroskopu, lai pārliecinātos, vai tas darbojas pareizi. Izmantojiet iegremdēšanas eļļu, kas piemērota luminiscences mikroskopijai un nodrošina zemu autoluminiscences līmeni. Izvairieties no DAPI luminiscences uzturēšanas šķīduma sajaukšanās ar mikroskopa iegremdēšanas eļļu, jo pretējā gadījumā radīsies signāla traucējumi. Rīkojieties atbilstoši ražotāja ieteikumiem attiecībā uz spuldzes un filtru kalpošanas ilgumu.

Paraugu sagatavošana

Šis komplekts ir paredzēts izmantošanai ar hematoloģiski iegūtām šūnu suspensijām, kas fiksētas Karnuā šķīdumā (3:1 metanols/etiķskābe) fiksatorā un ir

sagatavotas atbilstoši laboratorijā vai iestādē spēkā esošajām vadlīnijām. Sagatavojiet gaisā nožāvētus paraugus uz mikroskopa priekšmetstikliņiem atbilstoši standartā citoģenētiskajam procedūram. AGT *citoģenētiskas laboratorijas rokasgrāmata* ir ietverti ieteikumi par paraugu ņemšanu, kultūrēšanu, ievākšanu un priekšmetstikliņu sagatavošanu¹².

Šķīdumu sagatavošana

Etanola šķīdumi

Atšķaidiet 100% ar attīrītu ūdeni atbilstoši tālāk norādītajām proporcijām un rūpīgi samaisiet.

- 70% etanols — 7 daļas 100% etanola ar 3 daļām attīrīta ūdens
 - 85% etanols — 8,5 daļas 100% etanola ar 1,5 daļām attīrīta ūdens
- Glabājiet šķīdumus līdz pat 6 mēnešiem istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

2xSSC šķīdums

Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 9 daļām attīrīta ūdens un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 mēnešu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

0,4xSSC šķīdums

Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 49 daļām attīrīta ūdens un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 mēnešu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

2xSSC, 0,05% Tween-20 šķīdums

Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 9 daļām attīrīta ūdens. Pievienojiet 5 µl Tween-20 uz 10 ml un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 mēnešu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

Luminiscentās in situ hibridizācijas protokols

(Piezīme. Nodrošiniet, lai zonde un kontrasta krāsviela pēc iespējas mazāk tiktu pakļauta laboratorijas apgaismojuma iedarbībai.)

Priekšmetstikliņa sagatavošana

1. Novietojiet šūnu paraugu uz mikroskopa priekšmetstikliņa, kas izgatavots no stikla. Ļaujiet nožūt. (Pēc izvēles, ja tiek izmantota citoģenētiskā žāvēšanas kamera: priekšmetstikliņu sagatavošanai jāizmanto citoģenētiskā žāvēšanas kamera. Lai nodrošinātu optimālu šūnu parauga sagatavošanu, kamera jādarbina, iestatot aptuveni 25 °C temperatūru un 50% mitruma. Ja citoģenētiskā žāvēšanas kamera nav pieejama, kā alternatīvu var izmantot gāzu nosūcēju).
2. Iegremdējiet priekšmetstikliņu 2xSSC šķīdumā istabas temperatūrā uz 2 minūtēm, neveicot maisīšanu.
3. Veiciet dehidrēšanas etanolā sērijas (70%, 85% un 100%), katru 2 minūtes istabas temperatūrā.
4. Ļaujiet nožūt.

Priekšdenaturēšana

5. Izņemiet zondi no saldētavas un ļaujiet tai sasilt līdz istabas temperatūrai. Pirms mēģeņu lietošanas brīdī tās centrifugējiet.
6. Izmantojot pipeti, pārliecinieties, vai zondes šķīdums ir viendabīgi samaisīts.
7. Paņemiet 10 µl zondes šķīduma katram testam un pārnesiet to uz mikrocentrifūgas mēģeni. Atlikušo zondes šķīdumu nekavējoties ievietojiet atpakaļ saldētavā.
8. Novietojiet zondi un parauga priekšmetstikliņu uz sildierīces un veiciet priekšsildīšanu 37 °C (+/- 1 °C) temperatūrā 5 minūtes.
9. Uzlieciet 10 µl zondes maisījuma uz šūnu parauga un rūpīgi uzlieciet segstikliņu. Hermetizējiet ar gumijas līmi un ļaujiet līmei pilnībā nožūt.

Denaturēšana

10. Veiciet parauga un zondes vienlaicīgu denaturēšanu, sildot priekšmetstikliņu uz sildierīces 75 °C (+/- 1 °C) temperatūrā 2 minūtes.

Hibridizācija

11. Ievietojiet priekšmetstikliņu gaismu necaurlaidīgā konteinerā ar mitru vidi un atstājiet to 37 °C (+/- 1 °C) temperatūrā līdz nākamajai dienai.

Skalošana pēc hibridizācijas

12. Izņemiet DAPI no saldētavas un ļaujiet tam sasilt līdz istabas temperatūrai.
13. Noņemiet segstikliņu un rūpīgi notīriet visas līmes atliekas.
14. Iegremdējiet priekšmetstikliņu 0,4xSSC (pH 7,0) 72 °C (+/- 1 °C) temperatūrā uz 2 minūtēm nemaisot.
15. Noteciniet šķīdumu no priekšmetstikliņa un iegremdējiet to 2xSSC, 0,05% Tween-20 šķīdumā istabas temperatūrā (pH 7,0) uz 30 sekundēm nemaisot.
16. Noteciniet šķīdumu no priekšmetstikliņa un katram paraugam pievienojiet 10 µl DAPI luminiscences uzturēšanas līdzekli.
17. Uzlieciet segstikliņu, likvidējiet burbuļus un ļaujiet krāsai tumsā attīstīties 10 minūtes.
18. Skatiet luminiscences mikroskopā. (Sk. sadaļu Ieteikumi attiecībā uz luminiscences mikroskopu.)

Sagatavoto priekšmetstikliņu stabilitāte

Sagatavotie priekšmetstikliņi ir analizējami 1 mēneša periodā, ja tiek glabāti tumsā un istabas temperatūrā vai par istabas temperatūru zemākā temperatūrā.

Ieteikumi attiecībā uz procedūru

1. Priekšmetstikliņu karsēšana vai novecošana var samazināt signāla luminiscenci.

2. Tādu reaģentu izmantošana, kas nav uzņēmuma Cytocell Ltd. nodrošinātie vai ieteiktie reaģenti, var nelabvēlīgi ietekmēt hibridizācijas apstākļus.
3. Šķīdumu, ūdens vannu un inkubatoru temperatūras mērīšanai jāizmanto kalibrēts termometrs, jo norādītās temperatūras ievērošana ir kritiski svarīga produkta optimālas veiktspējas nodrošināšanai.
4. Skalošanas šķīdumu koncentrācijas, pH vērtības un temperatūras vērtības ir svarīgas, jo pārāk lielas pielaišanas gadījumā iespējama nespecifiska sasaiste, savukārt pārāk mazas pielaišanas gadījumā iespējama signāla nepietiekamība.
5. Nepilnīga denaturēšana var izraisīt signāla nepietiekamību, savukārt pārmērīga denaturēšana arī var izraisīt nespecifisku sasaisti.
6. Pārmērīga hibridizācijas dēļ iespējami papildu vai neparedzēti signāli.
7. Pirms testa izmantošanas diagnostikas nolūkiem lietotājiem ir jāveic protokola optimizācija atbilstoši saviem paraugiem.
8. Ja apstākļi nav pietiekami optimāli, iespējama nespecifiska sasaiste, kas var tikt nepareizi interpretēta kā zondes signāls.

Rezultātu interpretēšana

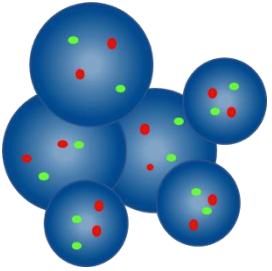
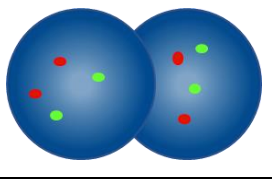
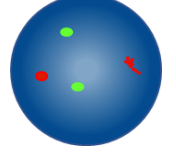
Sagatavotā priekšmetstikliņa ar paraugu kvalitātes novērtēšana

Paraugu nedrīkst analizēt tālāk norādītajos gadījumos.

- Signāli ir pārāk vāji analizēšanai atsevišķos filtros — lai veiktu analīzi, signāliem jābūt spilgtiem, labi izšķiramiem un viegli novērtējamiem.
- Ir daudz salīpušu/pārklājošos šūnu, kas traucē veikt analīzi.
- >50% šūnu nav hibridizētas.
- Starp šūnām atrodas pārāk daudz luminiscējošo daļiņu un/vai luminiscējošs aizmiglojums, kas rada signāla traucējumus, — optimālā priekšmetstikliņā ar paraugu fonam jābūt tumšam vai melnam un tīram.
- Šūnu kodolu robežas nav izšķiramas un nav veselas.

Uz analīzi attiecināmās vadlīnijas

- Katra parauga analīzi un interpretēšanu ir jāveic diviem laboratorijas speciālistiem. Visas neatbilstības ir jānovērš, novērtēšanu veicot trešajam laboratorijas speciālistam.
- Katram laboratorijas speciālistam jābūt attiecīgi kvalificētam atbilstoši spēkā esošajiem valsts līmeņa standartiem.
- Katram laboratorijas speciālistam neatkarīgi jāveic novērtēšana 100 kodoliem no katra parauga. Pirmajam laboratorijas speciālistam jāskatās analīze no priekšmetstikliņa kreisās puses, savukārt otram laboratorijas speciālistam — no priekšmetstikliņa labās puses.
- Katram laboratorijas speciālistam jādokumentē savi rezultāti atsevišķās lapās.
- Ir jāanalizē tikai veseli kodoli, nevis pārklājošie kodoli, sablīvējušies kodoli vai kodoli, kurus sedz citoplazmatiskās atliekas vai augsta līmeņa autoluminiscence.
- Jāizvairās no zonām ar pārmērīgu citoplazmatisko atlieku apjomu vai nespecifisku hibridizāciju.
- Signāla intensitāte var būt mainīga, pat vienā kodolā. Šādos gadījumos izmantojiet atsevišķus filtrus un/vai pielāgojiet fokālo plakni.
- Ja apstākļi nav pietiekami optimāli, signāli var šķīst izkliedēt. Ja divi vienādas krāsas signāli savstarpēji saskaras vai attālums starp tiem nepārsniedz divus signāla platumus, vai arī abus signālus savieno tikko redzams pavediens, šie signāli ir uzskatāmi par vienu signālu.
- Ja pastāv šaubas, vai šūna ir analizējama, neveiciet tās analīzi.

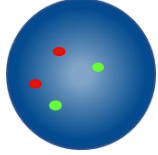
Uz analīzi attiecināmās vadlīnijas	
	Neskaitīt — kodoli atrodas pārāk tuvu viens otram, lai varētu noteikt to robežas
	Neskaitīt pārklājošos kodolus — nav redzamas visas abu kodolu zonas
	Skaitīt kā divus sarkanus signālus un divus zaļus signālus — viens no abiem sarkanajiem signāliem ir difūzs



Paredzamie rezultāti

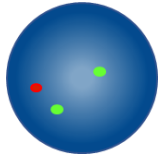
Zonde 13q14.3 Deletion Probe

Paredzamais normālu signālu modelis

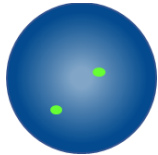


Normālā šūnā ir paredzami divi sarkani un divi zaļi signāli (2S, 2Z).

Paredzamie anormālo signālu modeļi



Šūnā ar hemizigotu 13q14.3 delēciju paredzamais signālu modelis ir viens sarkans un divi zaļi signāli (1S, 2Z).



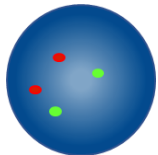
Šūnā ar homozigotu delēciju paredzamais signālu modelis ir divi zaļi signāli, bez sarkaniem signāliem (0S, 2Z).

13q dzēsumi CLL ietvaros tiek atzīti par heterogēniem; neliels dzēsums 13q reģionā var izraisīt nelielu atlikušo signālu ar šo zonžu komplektu.

Citi signālu modeļi ir iespējami aneiploīdos/nelīdzsvarotos paraugos.

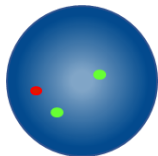
Zonde ATM Deletion Probe

Paredzamais normālu signālu modelis



Normālā šūnā ir paredzami divi sarkani un divi zaļi signāli (2S, 2Z).

Paredzamais anormālo signālu modelis

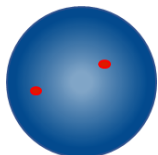


Šūnā ar ATM delēciju paredzamais signālu modelis ir viens sarkans un divi zaļi signāli (1S, 2Z).

Citi signālu modeļi ir iespējami aneiploīdos/nelīdzsvarotos paraugos.

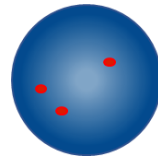
Alpha Satellite 12 Plus for CLL

Paredzamais normālu signālu modelis



Normālā šūnā ir paredzami divi sarkani signāli (2S).

Paredzamais anormālo signālu modelis

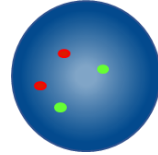


Šūnā ar 12. hromosomas trisomiju paredzamais signālu modelis ir trīs sarkani signāli (3S).

Citi signālu modeļi ir iespējami aneiploīdos/nelīdzsvarotos paraugos.

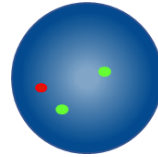
Zonde P53 (TP53) Deletion Probe

Paredzamais normālu signālu modelis



Normālā šūnā ir paredzami divi sarkani un divi zaļi signāli (2S, 2Z).

Paredzamais anormālo signālu modelis

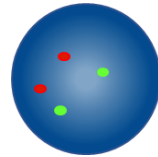


Šūnā ar P53 delēciju paredzamais signālu modelis ir viens sarkans un divi zaļi signāli (1S, 2Z).

Citi signālu modeļi ir iespējami aneiploīdos/nelīdzsvarotos paraugos.

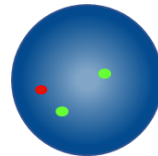
Zonde MYB Deletion Probe

Paredzamais normālu signālu modelis



Normālā šūnā ir paredzami divi sarkani un divi zaļi signāli (2S, 2Z).

Paredzamais anormālo signālu modelis



Šūnā ar MYB delēciju paredzamais signālu modelis ir viens sarkans un divi zaļi signāli (1S, 2Z).

Citi signālu modeļi ir iespējami aneiploīdos/nelīdzsvarotos paraugos.

Zināmā krusteniskā reakcija

Zonde	Zināmā krusteniskā reakcija
Zonde 13q14.3 Deletion Probe	Zaļā 13qter zonde var uzrādīt krustenisko hibridizāciju ar 19. hromosomas centromēru un citu hromosomu īsajiem (p) pleciem.
Zonde ATM Deletion Probe	Zaļā D11Z1 zonde var uzrādīt līdz pat 4 krusteniskās hibridizācijas signāliem attiecībā uz Xc un 17c.
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	Šī zonde var uzrādīt krustenisko sarkanā hibridizāciju ar 3c, 6c, 7c un 10c.
Zonde P53 Deletion Probe	Zaļā D17Z1 zonde var uzrādīt krustenisko hibridizāciju ar 11. hromosomas un X hromosomas centromēru.
Zonde MYB Deletion Probe	Nav zināmas krusteniskās hibridizācijas

Ziņošana par nevēlamiem notikumiem

Ja uzskatāt, ka ir radušies šīs ierīces darbības traucējumi vai tās veikspējas rādītāji ir pasliktinājušies, iespējami izraisot nelabvēlīgu notikumu (piemēram, novēlotu vai nepareizu diagnozi, novēlotu vai nepiemērotu terapiju), par to nekavējoties jāziņo ražotājam (e-pasta adrese: vigilance@oqt.com).

Bar šādu notikumu arī var būt jāziņo kompetentajai iestādei attiecīgajā valstī. Kontaktpersonu medicīnas ierīču kontroles jautājumos saraksts ir atrodamas šajā vietnē: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Specifiskās veikspējas raksturlielumi

Analītiskais specifiskums

Analītiskais specifiskums tiek izteikts kā to signālu procentuālā vērtība, kas hibridizējas ar pareizo lokusu un nekādu citu vietu. Analītiskais specifiskums tika noteikts, veicot 200 mērķa lokusu analīzi. Analītiskais specifiskums tika noteikts, luminiscentās in situ hibridizācijas signālu, kas hibridizējās ar pareizo lokusu, skaitu izdalot ar hibridizēto luminiscentās in situ hibridizācijas signālu kopskaitu.

1. tabula Skrīninga paneļa CLL Plus Screening Panel analītiskais specifiskums

Komplekts	Zonde	Mērķa lokuss	Ar pareizo lokusu hibridizēto signālu skaits	Hibridizēto signālu kopskaits	Specifiskums (%)
Zonde 13q14.3 Deletion Probe	Sarkans 13q14.3	13q14.3	200	200	100
	Zaļš 13qter	13qter, 13q34	200	200	100
Zonde ATM Deletion Probe	Sarkans ATM	11q22.3	200	200	100
	Zaļš D11Z1	11q11.1-q11.1	200	200	100
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	D12Z3, sarkana	12p11.1-q11.1	200	200	100
Zonde P53 Deletion Probe	Sarkans P53	17p13.1	200	200	100
	Zaļš D17Z1	17p11.1-q11.1	200	200	100
Zonde MYB Deletion Probe	Sarkans MYB	6q23	200	200	100
	Zaļš D6Z1	6p11.1-q11.1	200	200	100

Analītiskais jutīgums

Analītiskais jutīgums tiek izteikts kā novērtējamo interfāzes šūnu ar paredzamu normālo signālu modeli procentuālā vērtība. Analītiskais jutīgums tika noteikts, analizējot interfāzes šūnas dažādos normālos paraugos. Jutīgums tika aprēķināts kā novērtējamo šūnu ar paredzamo signālu modeli procentuālā vērtība (ar 95% ticamības intervālu).

2. tabula Skrīninga paneļa CLL Plus Screening Panel analītiskais jutīgums

Komplekts	Šūnu ar paredzamiem signālu modeļiem skaits	Šūnu ar novērtjamiem signāliem skaits	Jutīgums (%)	95% ticamības intervāls
Zonde 13q14.3 Deletion Probe	481	500	96,2	1,6
Zonde ATM Deletion Probe	482	500	96,4	1,0
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	487	500	97,4	1,0
Zonde P53 Deletion Probe	471	500	94,2	2,7
Zonde MYB Deletion Probe	479	500	95,8	1,7

Normalitātes robežvērtību raksturojums

Uz luminiscentās in situ hibridizācijas zondēm attiecināmā normalitātes robežvērtība ir novērtējamo interfāzes šūnu ar specifisku anormālo signālu modeli, ar kādu paraugs ir uzskatāms par normālu attiecībā uz šādu signālu modeli, maksimālā procentuālā vērtība.

Normalitātes robežvērtība tika noteikta, izmantojot paraugus no normāliem un pozitīviem pacientiem. Katram paraugam tika reģistrēti 100 šūnu signālu modeļi. Tika aprēķināts Jūdena indekss, lai noteiktu robežvērtību, kurai ir maksimizēts jutīgums + specifiskums -1.

3. tabula Skrīninga paneļa CLL Plus Screening Panel normalitātes robežvērtību raksturojums

Komplekts	Anomālu signālu modelis	Jūdena indekss	Normalitātes robežvērtība (%)
Zonde 13q14.3 Deletion Probe	1S, 2Z vai 0S, 2Z	0,95	7
Zonde ATM Deletion Probe	1S, 2Z	0,99	9
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	3S	0,99	3
Zonde P53 Deletion Probe	1S, 2Z	0,90	10
Zonde MYB Deletion Probe	1S, 2Z	0,97	8

Laboratorijām jāveic robežvērtību verifikācija, izmantojot savus datus^{13, 14}.

Precizitāte un reproducējamība

Precizitāte ir testa dabīgo atšķirību rādītājs, testu atkārtotot vairākas reizes vienādos apstākļos. Šis rādītājs tika noteikts, analizējot atkārtotu viena parauga testēšanu ar zondēm no vienas partijas, vienādos apstākļos un vienā dienā.

Reproducējamība ir testa variabilitātes rādītājs un ir noteikta, ņemot vērā paraugu līmeņa, dienas līmeņa un partijas līmeņa variabilitāti. Dienas līmeņa reproducējamība tika noteikta, analizējot vienus un tos pašus paraugus trīs dažādās dienās. Partijas līmeņa reproducējamība tika noteikta, vienā dienā analizējot vienus un tos pašus paraugus un izmantojot zondes no trīs dažādām partijām. Paraugu līmeņa reproducējamība tika noteikta, analizējot trīs parauga replikātus vienā dienā. Katram paraugam tika reģistrēti 100 interfāzes šūnu signālu modeļi un tika aprēķināta šūnu ar paredzamo signālu modeli procentuālā vērtība.

Reproducējamība un precizitāte tika aprēķinātas kā standartnovirze (Standard Deviation — STDEV) starp replikātiem katram mainīgajam, kā arī vispārējā vidējā STDEV.

4. tabula Skrīninga paneļa CLL Plus Screening Panel reproducējamība un precizitāte

Mainīgais	Standartnovirze (STDEV)				
	Zonde 13q14.3 Deletion Probe	Zonde ATM Deletion Probe	Alpha Satellite 12 Plus for CLL	Zonde P53 Deletion Probe	Zonde MYB Deletion Probe
Precizitāte	0,72	0,38	0,72	2,63	1,09
Paraugu līmeņa	0,58	0,38	0,89	2,30	1,19
Dienas līmeņa	0,96	0,58	0,51	2,39	1,20
Partijas līmeņa	1,40	1,27	1,27	1,68	0,90
Vispārīgā novirze	1,03	1,01	1,15	2,16	1,06

Klīniskā veikspēja

Klīniskā veikspēja tika noteikta, izmantojot produkta paredzēto populāciju reprezentējošu paraugu. Katram paraugam tika reģistrēti ≥ 100 interfāzes šūnu signālu modeļi. Normalitāte/anormalitāte tika noteikta, salīdzinot šūnu ar specifisku anormālo signālu modeli procentuālo vērtību ar normalitātes robežvērtību. Rezultāti pēc tam tika salīdzināti ar zināmo parauga statusu.

Klīnisko datu rezultāti tika analizēti, lai iegūtu jutīguma, specifiskuma un normalitātes vērtības, izmantojot viendimensionālu pieeju.

5. tabula Skrīninga paneļa CLL Plus Screening Panel klīniskā veikspēja

Zonde	Klīniskais jutīgums (pareizi pozitīvo rezultātu rādītājs (true positive rate — TPR))	Klīniskais specifiskums (pareizi negatīvo rezultātu rādītājs (true negative rate — TNR))	Kļūdaini pozitīvo rezultātu rādītājs (false positive rate — FPR) = 1 — specifiskums
Zonde 13q14.3 Deletion Probe	96,3%	99,1%	0,9%
Zonde ATM Deletion Probe	100%	99,2%	0,8%
Alpha Satellite 12 Plus for CLL	100%	100%	0%
Zonde P53 Deletion Probe	92,5%	97,1%	2,9%
Zonde MYB Deletion Probe	97,8%	99,6%	0,4%

Papildinformācija

Lai saņemtu papildinformāciju par produktu, sazinieties ar CytoCell tehniskā atbalsta nodaļu.

Tālr.: +44 (0)1223 294048










E-pasts: techsupport@cytoCELL.com

Timeklī: www.ogt.com

Atsauces

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.

Simbolu skaidrojums

REF	Iv: Kataloga numurs
	Iv: <i>In vitro</i> diagnostikai paredzēta medicīnas ierīce
	Iv: Partijas kods
	Iv: Skatīt lietošanas instrukciju
	Iv: Ražotājs
	Iv: Derīguma termiņš
	Iv: Temperatūras ierobežojums
	Iv: Sargāt no saules gaismas
	Iv: Saturs ir pietiekams <n> testiem
	Iv: Saturs

Patenti un preču zīmes

CytoCell ir SIA CytoCELL reģistrēta preču zīme.



Cytocell Ltd.

Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, Apvienotā Karaliste
Tālr.: +44(0)1223 294048
Fakss: +44(0)1223 294986
E-pasts: probes@cytoCELL.com
Timeklī: www.ogt.com