



A Sysmex Group Company



Gebruiksaanwijzing

REF: LPH 087-S / LPH 087

CLL Plus Screening Panel



ALLEEN VOOR PROFESSIONEEL GEBRUIK



www.cytocell.com

Meer informatie en andere talen zijn beschikbaar via www.ogt.com

Beperkingen

Dit apparaat is ontworpen voor het detecteren van genomische verliezen/gains/herschikkingen met breekpunten in de gebieden die worden begrensd door de rode en groene klonen in deze sondeset, inclusief de gebieden 13q14.3, *ATM*, *P53 (TP53)* en *MYB* en het centromeer van chromosoom 12. Genomische gains of verliezen buiten deze gebieden of gedeeltelijke gains of verliezen in deze gebieden worden mogelijk niet gedetecteerd door dit apparaat. De test is niet bedoeld voor: gebruik als enig diagnostisch criterium, prenatale tests, screening op basis van populatie, decentrale ('near-patient') tests of zelftests. Dit product is uitsluitend bedoeld voor professioneel gebruik in een laboratorium; alle resultaten moeten worden geïnterpreteerd door voldoende gekwalificeerd personeel en er moet rekening worden gehouden met andere relevante testresultaten.

Dit product is niet gevalideerd voor gebruik met monstertypes of ziektypen die niet worden gespecificeerd als het beoogde gebruik.

De rapportage en interpretatie van FISH-resultaten moet consistent zijn met professionele standaardprocedures en er moet rekening worden gehouden met andere klinische en diagnostische informatie. Deze set is bedoeld als aanvulling op andere diagnostische laboratoriumtests en er mag geen therapeutische actie worden ondernomen op basis van enkel het FISH-resultaat.

De prestaties van het apparaat worden mogelijk beïnvloed als het protocol niet wordt opgevolgd. Dit kan ook leiden tot fout-positieve/negatieve resultaten.

Deze set is niet gevalideerd voor doeleinden die niet worden genoemd als het beoogde gebruik.

Beoogd gebruik

Het CLL Plus Screening Panel is een kwalitatieve, niet-geautomatiseerde, fluorescentie-*in-situ* hybridisatietest (FISH) die wordt gebruikt voor het detecteren van chromosoomdeleties in het gebied 11q22.3 op chromosoom 11, het gebied 17p13.1 op chromosoom 17 of het gebied 13q14.2-q14.3 op chromosoom 13 en/of gains van het centromerische gebied op chromosoom 12 en/of deleties van het *MYB*-gebied op chromosoom 6 op locatie 6q23.3 in een Carnoy's oplossing (3:1 methanol/azijnzuur) met gefixeerde hematologisch verkregen celsuspensies van patiënten die vermoedelijk chronische lymfatische leukemie (CLL) hebben of daarmee zijn gediagnosticeerd.

Indicaties

Dit product is bedoeld als aanvulling op andere klinische en histopathologische tests in erkende diagnostische en klinische zorgtrajecten waarbij het belangrijk is om kennis te hebben over de *P53 (TP53)*-deletiestatus, *ATM*-deletiestatus of *D13S319*-deletiestatus en/of gainstatus van het centromeer van chromosoom 12 voor de klinische behandeling.

Testprincipes

Fluorescentie-*in-situ* hybridisatie (FISH) is een techniek waarmee DNA-sequenties kunnen worden gedetecteerd op metafase chromosomen of in interfase nuclei van vaste cytogenetische monsters. De techniek maakt gebruik van DNA-sondes die hybridiseren tot gehele chromosomen of enkele unieke sequenties en is een goede aanvulling op cytogenetische analyse met G-banding. Deze techniek kan nu worden toegepast als essentieel onderzoekshulpmiddel voor prenatale en hematologische chromosoomanalyse en chromosoomanalyse van solide tumoren. Doel-DNA is, na fixatie en denaturatie, beschikbaar voor vasthechting aan een

soortgelijk gedenatureerde en fluorescent gelabelde DNA-sonde, die een complementaire sequentie bevat. Na de hybridisatie worden niet-gebonden en niet-specifiek gebonden DNA-sondes verwijderd en wordt het DNA tegengekleurd ter visualisatie. Fluorescentiemicroscopie maakt vervolgens de visualisatie van de gehybridiseerde sonde op het doelmateriaal mogelijk.

Sonde-informatie

Een selectie hematologiesondes en een alpha-satellite-sonde voor chronische lymfatische leukemie (CLL).

Alpha Satellite 12 Plus voor CLL

Trisomie 12 is een terugkerende afwijking bij CLL, die bij 20% van de gevallen voorkomt¹ en is vaak de enige unieke cytogenetische afwijking (in 40-60% van de gevallen met trisomie 12)². Patiënten met trisomie 12 hebben een laag risico indien er geen andere genetische laesies aanwezig zijn³. Dit product is ook verkrijgbaar in testsets met 5 (LPH 069-S) en 10 (LPH 069) stuks en is geoptimaliseerd voor hybridisatie gedurende de nacht.

13q14.3

Deleties die 13q14 beïnvloeden zijn de meest voorkomende structurele genetische afwijkingen bij CLL^{3,4,5}. Dit gebied vertoont in 30-60% van de CLL-patiënten heterozygote deletie en in 10-20% van de CLL-patiënten homozygote deletie⁶. Patiënten met deleties van 13q14 hebben een zeer laag risico indien er geen andere genetische laesies aanwezig zijn³.

P53 (TP53) (17p13.1)

Het *TP53*-gen (*tumoreiwit p53*) op 17p13.1 is een van de belangrijkste tumorsuppressorgenen; het is een krachtige transcriptiefactor met een fundamentele rol in het behoud van genetische stabiliteit. Het verlies van *TP53* wordt gemeld bij 10% van alle patiënten met CLL en wordt beschouwd als marker voor de slechtste prognose^{3,7}.

ATM (11q22.3)

Het *ATM*-gen (*ATM-serine/threoninekinase*) op 11q22.3 is een belangrijk checkpoint-gen dat is betrokken bij het beheer van celschade. De functie van het gen is het beoordelen van de hoeveelheid DNA-schade in de cel en dit proberen te repareren door het fosforyleren van belangrijke substraten die zijn betrokken bij de reactiebaan voor DNA-schade⁸. Het verlies van *ATM* wordt gemeld bij 18% van alle patiënten met CLL en wordt beschouwd als marker voor een slechte prognose in CLL⁹.

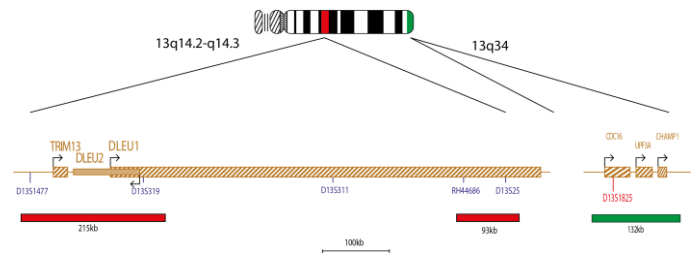
MYB (6q23.3)

Deleties van chromosoom 6q zijn terugkerend bij CLL. Het *MYB*-gen (*MYB-protocoon, transcriptiefactor*) is cruciaal bij hematopoëtische celproliferatie en -differentiatie^{10,11}. Het bevindt zich in band 6q23.3 en is een marker voor 6q-deletie.

Sondespecificatie

13q14.3 Deletion Probe

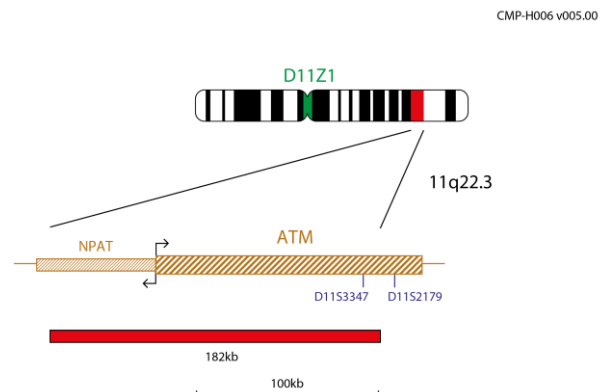
13q14.2-q14.3, rood
13qter, 13q34, groen



De 13q14.2-q14.3-sondes, rood gemarkeerd, beslaan de *D13S319*- en *D13S25*-markeringen. De 13qter-specifieke subtelomeersonde (kloon 163C9), groen gemarkeerd, maakt de identificatie van chromosoom 13 mogelijk en functioneert als controlesonde.

ATM Deletion Probe

ATM, 11q22.3, rood
D11Z1, 11p11.1-q11.1, groen



De ATM is 182kb, rood gemarkeerd, en beslaat het telomerische uiteinde van het NPAT-gen en het centromerische uiteinde van het ATM-gen tot net na de marker D11S3347. Het sondemengsel bevat ook een controlesonde voor het 11 centromeer (D11Z1) die groen is gemarkeerd.

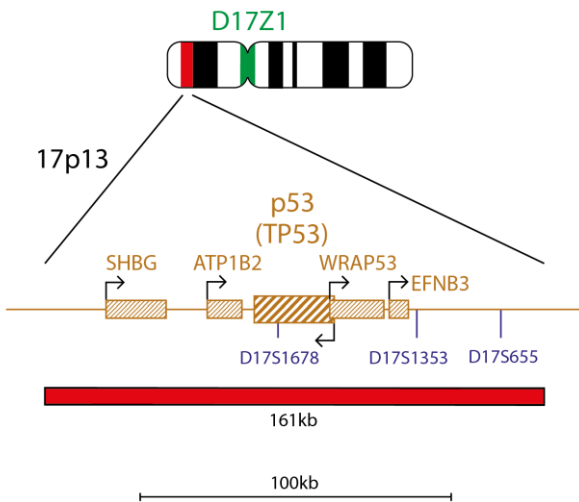
Alpha Satellite 12 Plus voor CLL
D12Z3, 12p11.1-q11.1, rood



De Alpha-Satellite 12 Plus Probe is een herhalingssequentiesonde, rood gemarkeerd, die de centromerische herhalingssequentie D12Z3 herkent.

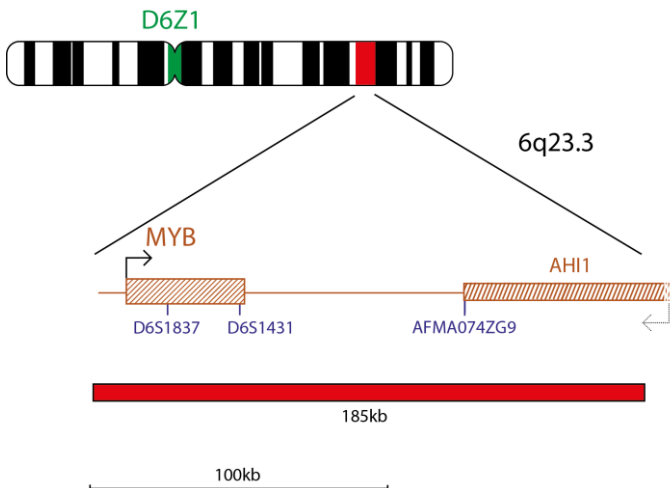
P53 (TP53) Deletion Probe
P53, 17p13, rood
D17Z1, 17p11.1-q11.1, groen

CMP-H039 V007.00



De p53 (TP53)-sonde is 161kb, rood gemarkeerd, en beslaat het gehele gen p53 (TP53) en de naastgelegen gebieden. Het sondemengsel bevat ook een controlesonde voor het 17 centromeer (D17Z1) die groen is gemarkeerd.

MYB Deletion Probe
MYB, 6q23.3, rood
D6Z1, 6p11.1-q11.1, groen



Het MYB-sondemengsel bestaat uit een 185kb-sonde, rood gemarkeerd, die het gehele MYB-gen en een gebied telomerisch van het gen beslaat. Dit omvat ook een centromerisch gedeelte van het AHI1-gen. Dit sondemengsel bevat ook een controlesonde voor het 6 centromeer (D6Z1) die groen is gemarkeerd.

Geleverde materialen

Sondes: 50 µl per buisje (5 tests) of 100 µl per buisje (10 tests)
De sondes worden vooraf gemengd in een hybridisatieoplossing (formamide; dextraansulfaat; SSC-buffer [saline-sodium citrate; zout-natriumcitraat]) geleverd en zijn klaar voor gebruik.

Tegenkleuring: 150 µl per buisje (15 tests)

De tegenkleuring is DAPI Antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenylnindool)).

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

1. Voor *in-vitro* diagnostiek. Alleen voor professioneel gebruik.
2. Draag handschoenen bij het hanteren van DNA-sondes en DAPI-tegenkleuring.
3. De sondemengsels bevatten formamide. Dit is een teratogeen; vermijd het inademen van de dampen en huidcontact. Wees voorzichtig; draag handschoenen en een labjas.
4. DAPI is mogelijk carcinogeen. Wees voorzichtig; draag handschoenen en een labjas.
5. Voer al het gevaarlijke materiaal af volgens de richtlijnen voor het afvoeren van gevaarlijk afval van uw instelling.
6. Gebruikers moeten de kleuren rood, blauw en groen kunnen onderscheiden.
7. De prestaties van het apparaat worden mogelijk beïnvloed als het beschreven protocol niet wordt opgevolgd en de voorgeschreven reagentia niet worden gebruikt. Dit kan ook leiden tot fout-positieve/negatieve resultaten.
8. De sonde moet niet worden verdund of gemengd met andere sondes.
9. De prestaties worden mogelijk beïnvloed als er geen 10 µl sonde wordt gebruikt tijdens het pre-denaturatiestadium van het protocol. Dit kan ook leiden tot fout-positieve/negatieve resultaten.

Opslag en beheer

De set moet worden bewaard in een vriezer bij -25 °C tot -15 °C tot de vervaldatum die is aangegeven op het setlabel. De sonde en buisjes met tegenkleuring moeten in het donker worden bewaard.



De sonde blijft stabiel gedurende bevroer-ontdooicycli bij normaal gebruik (waarbij één cyclus bestaat uit het verwijderen van de sonde uit en terugplaatsen in de vriezer) en is fotostabiel gedurende maximaal 48 uur na blootstelling aan continue belichting. Voorkom onnodige blootstelling aan licht en temperatuurschommelingen.

Benodigde maar niet meegeleverde apparatuur en materialen

Benodigde gekalibreerde apparatuur:

1. Verwarmingsplaat (met een vaste plaat en nauwkeurige temperatuurbediening tot maximaal 80 °C)
2. Gekalibreerde micropipetten en tips met variabel volume van 1 µl - 200 µl
3. Waterbad met nauwkeurige temperatuurbediening op 37 °C en 72 °C
4. Microcentrifugebuisjes (0,5 ml)
5. Fluorescentiemicroscop (zie de paragraaf Aanbevelingen fluorescentiemicroscop)
6. Fasecontrastmicroscop
7. Schone Coplin-potjes van plastic, keramiek of hittebestendig glas
8. Tang
9. Gekalibreerde pH-meter (of pH-indicatorstrips die pH 6,5 - 8,0 kunnen meten)
10. Bevochtigde container
11. Immersie-olie van fluorescentieniveau voor microscoplenzen
12. Werkbladcentrifuge
13. Objectglasjes
14. Dekglasjes van 24x24 mm
15. Timer
16. 37 °C-incubator
17. Rubberen lijmoplossing
18. Vortexmenger
19. Maatcilinders
20. Magneetroerder
21. Gekalibreerde thermometer

Optionele maar niet meegeleverde apparatuur

1. Cytogenetische droogkamer

Benodigde maar niet meegeleverde reagentia

1. 20x SSC-oplossing
2. 100% ethanol
3. Tween-20
4. 1M natriumhydroxide (NaOH)
5. 1M zoutzuur (HCl)
6. Gezuiverd water

Aanbevelingen fluorescentiemicroscop

Gebruik een kwiklamp van 100 W of gelijkwaardig en planapochromatische objectieven voor olie-immersie van 60/63x of 100x voor optimale visualisatie. De fluoroforen die in deze sondeset worden gebruikt, worden geëxciteerd en uitgezonden bij de volgende golflengtes:

Fluorofoor	Excitatie _{max} [nm]	Emissie _{max} [nm]
Groen	495	521
Rood	596	615

Zorg ervoor dat de juiste excitatie- en emissiefilters die de bovenstaande golflengtes beslaan op de microscoop worden aangebracht. Gebruik een drievoudige bandpassfilter voor DAPI/het groene spectrum/het rode spectrum of een tweevoudige bandpassfilter voor het groene spectrum/rode spectrum voor optimale gelijktijdige visualisatie van de groene en rode fluoroforen.

Controleer de fluorescenciemicroscop voorafgaand aan gebruik op een juiste werking. Gebruik immersie-olie die geschikt is voor fluorescenciemicroscopie en is geformuleerd voor lage autofluorescentie. Vermijd het mengen van DAPI Antifade met microscopimmersie-olie, omdat dit signalen kan verstoren. Volg de richtlijnen van de fabrikant wat betreft de levensduur van de lamp en de filters.

Monstervoorbereiding

De set is ontworpen voor gebruik op celsuspensies die hematologisch zijn verkregen, zijn gefixeerd in Carnoy's fixeeroplossing (3:1 methanol/azijnzuur) en zijn voorbereid volgens de richtlijnen van het laboratorium of de instelling. Bereid aan de lucht gedroogde monsters voor op objectiefglasjes volgens standaard cytogenetische procedures. De AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* bevat aanbevelingen voor monsterverzameling, -kweken, -afname en voor het maken van glasjes¹².

Oplossingsvoorbereiding

Ethanoloplossingen

Verdun 100% ethanol met gezuiverd water volgens de volgende verhoudingen en meng grondig:

- 70% ethanol - 7 delen 100% ethanol op 3 delen gezuiverd water
- 85% ethanol - 8,5 delen 100% ethanol op 1,5 delen gezuiverd water

Bewaar de oplossingen maximaal 6 maanden op kamertemperatuur in een luchtdichte container.

2xSSC-oplossing

Verdun 1 deel 20xSSC-oplossing met 9 delen gezuiverd water en meng grondig. Controleer de pH-waarde en breng deze met NaOH of HCl naar pH 7,0 indien nodig. Bewaar de oplossing maximaal 4 weken op kamertemperatuur in een luchtdichte container.

0,4xSSC-oplossing

Verdun 1 deel 20xSSC-oplossing met 49 delen gezuiverd water en meng grondig. Controleer de pH-waarde en breng deze met NaOH of HCl naar pH 7,0 indien nodig. Bewaar de oplossing maximaal 4 weken op kamertemperatuur in een luchtdichte container.

Oplossing 2xSSC; 0,05% Tween-20

Verdun 1 deel 20xSSC-oplossing met 9 delen gezuiverd water. Voeg 5 µl Tween-20 per 10 ml toe en meng grondig. Controleer de pH-waarde en breng deze met NaOH of HCl naar pH 7,0 indien nodig. Bewaar de oplossing maximaal 4 weken op kamertemperatuur in een luchtdichte container.

FISH-protocol

(Opmerking: zorg ervoor dat de sonde en tegenkleuring zo min mogelijk worden blootgesteld aan laboratoriumlampen).

Vorbereiding objectiefglasjes

1. Plaats het celmonster op een glazen objectiefglasje. Laat het opdrogen. (Optioneel, indien een cytogenetische droogkamer wordt gebruikt: de glasjes moeten worden bevestigd met behulp van een cytogenetische droogkamer. De kamer moet voor optimale bevestiging van het celmonster ongeveer 25 °C zijn en een luchtvochtigheid van 50% hebben. Gebruik een zuurkast als er geen cytogenetische droogkamer beschikbaar is).
2. Dompel het glasje 2 minuten onder 2xSSC op kamertemperatuur (KT) zonder het te bewegen.
3. Droog in een ethanolserie (70%, 85% en 100%), 2 minuten in elke oplossing, op KT.
4. Laat het opdrogen.

Pre-denaturatie

5. Haal de sonde uit de vriezer en laat deze op KT komen. Centrifugeer de buisjes kort voorafgaand aan gebruik.
6. Zorg er met een pipet voor dat de sondeoplossing gelijkmatig is vermengd.
7. Verwijder 10 µl sonde per test en breng dit over naar een microcentrifugebuisje. Plaats de overgebleven sonde snel terug in de vriezer.
8. Plaats de sonde en het monsterglasje op een verwarmingsplaat van 37 °C (+/- 1 °C) gedurende 5 minuten om voor te verwarmen.
9. Plaats 10 µl sondemengsel op het celmonster en plaats voorzichtig een dekglasje. Dicht het af met rubberen lijmoplossing en laat de lijm volledig opdrogen.

Denaturatie

10. Denatureer het monster en de sonde gelijktijdig door het objectiefglasje te verwarmen op een verwarmingsplaat van 75 °C (+/- 1 °C) gedurende 2 minuten.

Hybridisatie

11. Plaats het glasje gedurende de nacht in een vochtige en luchtdichte container bij 37 °C (+/- 1 °C).

Post-hybridisatie spoelbeurten

12. Haal de DAPI uit de vriezer en laat deze op KT komen.
13. Verwijder het dekglasje en alle sporen van lijm voorzichtig.
14. Dompel het glasje gedurende 2 minuten onder in 0,4xSSC (pH 7,0) bij 72 °C (+/- 1 °C) zonder het te bewegen.
15. Laat het glasje afdruppen en dompel het 30 seconden onder in 2xSSC; 0,05% Tween-20 op KT (pH 7,0) zonder het te bewegen.
16. Laat het glasje afdruppen en breng 10 µl DAPI Antifade aan op ieder monster.
17. Bedek het met een dekglasje, verwijder eventuele luchtballen en laat de kleur 10 minuten in het donker ontwikkelen.
18. Bekijk met een fluorescenciemicroscop. (Zie **Aanbevelingen fluorescenciemicroscop**.)

Stabiliteit van de gereedgemaakte glasjes

Gereedgemaakte glasjes zijn maximaal 1 maand analyseerbaar, indien deze in het donker worden bewaard bij/beneden KT.

Procedureaanbevelingen

1. Verhitten of verouderen van de glasjes kan de signaalfluorescentie verminderen
2. Hybridisatiecondities kunnen nadelig worden beïnvloed door het gebruik van reagentia die niet door Cytocell Ltd. worden geleverd of aanbevolen
3. Gebruik een gekalibreerde thermometer om de temperatuur van oplossingen, waterbaden en incubators te meten, omdat deze temperaturen van cruciaal belang zijn voor optimale productprestaties.
4. De spoelingsconcentraties, pH en temperaturen zijn belangrijk, omdat te lage naleving kan leiden tot het niet-specifiek binden van de sonde en te hoge naleving er toe kan leiden dat er geen signaal aanwezig is
5. Niet-volledige denaturatie kan ertoe leiden dat er geen signaal aanwezig is en teveel denaturatie kan ook leiden tot niet-specifiek binden
6. Te veel hybridisatie kan leiden tot aanvullende of onverwachte signalen
7. Gebruikers dienen het protocol te optimaliseren voor de eigen monsters alvorens de test voor diagnostische doeleinden te gebruiken
8. Suboptimale condities kunnen leiden tot niet-specifieke binding, wat verkeerd kan worden geïnterpreteerd als een sondesignaal

Interpretatie van resultaten

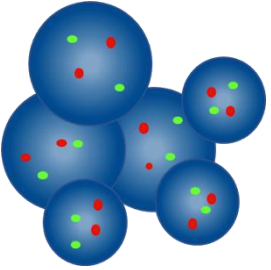
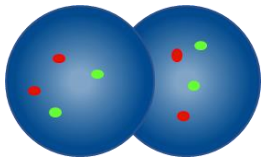
Glasjeskwaliteit beoordelen

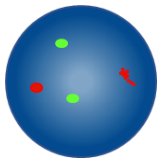
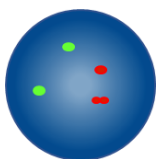
Het glasje dient niet te worden geanalyseerd indien:

- De signalen te zwak zijn om in enkelvoudige filters te worden geanalyseerd - om door te kunnen gaan met de analyse moeten signalen helder, duidelijk en eenvoudig te evalueren zijn
- De analyse wordt belemmerd door een groot aantal samengeklonterde/overlappende cellen
- >50% van de cellen niet zijn gehybridiseerd
- Er zich te veel fluorescente deeltjes bevinden tussen cellen en/of een fluorescente waas de signalen verstoort - in ideale glasjes is de achtergrond donker of zwart en leeg
- De randen van de celkernen niet kunnen worden onderscheiden en niet intact zijn

Analyserichtlijnen

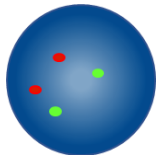
- Ieder monster dient door twee analisten te worden geanalyseerd en geïnterpreteerd. Eventuele verschillen moeten worden verholpen door een beoordeling door een derde analist
- Iedere analist dient voldoende gekwalificeerd te zijn volgens de erkende nationale standaarden
- Iedere analist dient onafhankelijk 100 kernen te noteren voor ieder monster. De eerste analist dient de analyse te starten vanaf de linkerzijde van het glasje en de tweede analist vanaf de rechterzijde
- Iedere analist dient zijn/haar resultaten vast te leggen op afzonderlijke bladen
- Analyseer alleen kernen die intact zijn en geen overlappende of opeengepakte kernen of kernen die worden bedekt door cytoplasmatisch gruis of een hoge mate van autofluorescentie
- Vermijd gebieden met een overmaat aan cytoplasmatisch gruis of niet-specifieke hybridisatie
- Signaalintensiteit kan afwijken, zelfs binnen een enkele kern. Gebruik in dergelijke gevallen enkelvoudige filters en/of pas het brandpuntsvlak aan
- In suboptimale condities kunnen signalen diffuus worden weergegeven. Tel het als één signaal als twee signalen van dezelfde kleur elkaar raken, als de afstand tussen de signalen niet groter is dan twee signaalbreedtes of als de twee signalen zijn verbonden door een vage draad
- Analyseer een cel niet als u niet zeker bent of deze analyseerbaar is

Analyserichtlijnen	
	Niet tellen – nucleï liggen te dicht bij elkaar om grenzen te kunnen bepalen
	Overlappende nucleï niet tellen – niet alle gebieden van beide nucleï zijn zichtbaar

	Tellen als twee rode signalen en twee groene signalen – één van de twee rode signalen is diffuus
	Tellen als twee rode signalen en twee groene signalen – het gat in één rood signaal is minder dan twee signaalbreedtes.

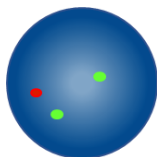
**Verwachte resultaten
13q14.3 Deletion Probe**

Verwacht normaal signaalpatroon

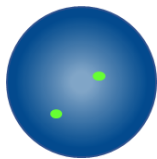


In een normale cel worden twee rode en twee groene signalen (2R, 2G) verwacht.

Verwachte abnormale signaalpatronen



In een cel met een hemizygote deletie van 13q14.3 is het verwachte signaalpatroon één rood signaal en twee groene signalen (1R, 2G).



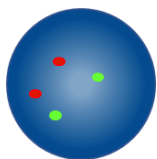
In een cel met een homozygote deletie is het verwachte signaalpatroon geen rode en twee groene signalen (0R, 2G).

13q deleties bij CLL worden als heterogeen beschouwd; een kleine deletie binnen het 13q-gebied kan met deze sonde-set resulteren in een klein restsignaal.

Er zijn andere signaalpatronen mogelijk in aneuploïde/niet-gebalanceerde monsters.

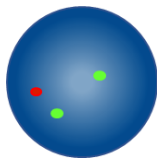
ATM Deletion Probe

Verwacht normaal signaalpatroon



In een normale cel worden twee rode en twee groene signalen (2R, 2G) verwacht.

Verwacht abnormaal signaalpatroon

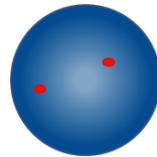


In een cel met een ATM-deletie is het verwachte signaalpatroon één rood signaal en twee groene signalen (1R, 2G).

Er zijn andere signaalpatronen mogelijk in aneuploïde/niet-gebalanceerde monsters.

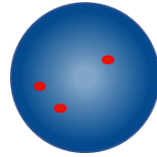
Alpha Satellite 12 Plus voor CLL

Verwacht normaal signaalpatroon



In een normale cel worden twee rode signalen (2R) verwacht.

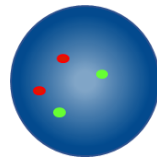
Verwacht abnormaal signaalpatroon



In een cel met trisomie 12 is het verwachte signaalpatroon drie rode signalen (3R). Er zijn andere signaalpatronen mogelijk in aneuploïde/niet-gebalanceerde monsters.

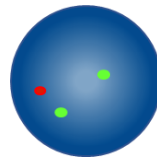
P53 (TP53) Deletion Probe

Verwacht normaal signaalpatroon



In een normale cel worden twee rode en twee groene signalen (2R, 2G) verwacht.

Verwacht abnormaal signaalpatroon

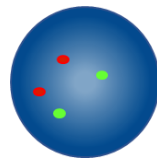


In een cel met een P53-deletie is het verwachte signaalpatroon één rood signaal en twee groene signalen (1R, 2G).

Er zijn andere signaalpatronen mogelijk in aneuploïde/niet-gebalanceerde monsters.

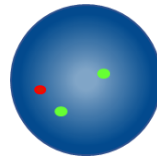
MYB Deletion Probe

Verwacht normaal signaalpatroon



In een normale cel worden twee rode en twee groene signalen (2R, 2G) verwacht.

Verwacht abnormaal signaalpatroon



In een cel met een MYB-deletie is het verwachte signaalpatroon één rood signaal en twee groene signalen (1R, 2G).

Er zijn andere signaalpatronen mogelijk in aneuploïde/niet-gebalanceerde monsters.

Bekende kruisreactiviteit

Sonde	Bekende kruisreactiviteit
13q14.3 Deletion Probe	De groene 13qter probe kan kruishybridisatie naar het centromeer van chromosoom 19 en de p-armen van andere chromosomen laten zien.
ATM Deletion Probe	De groene D11Z1-sonde kan tot 4 kruishybridisatiesignalen naar Xc en 17c laten zien.
Alpha Satellite 12 Plus voor CLL	De sonde kan rode kruishybridisatie met 3c, 6c, 7c en 10c laten zien.
P53 Deletion Probe	De groene D17Z1 probe kan kruishybridisatie naar de centromeren van chromosoom 11 en X laten zien.
MYB Deletion Probe	Geen bekende kruishybridisatie

Ongewenste gebeurtenissen melden

Als u denkt dat er een storing is opgetreden bij dit apparaat of dat de prestatiekenmerken dusdanig zijn afgenomen dat dit heeft bijgedragen aan een ongewenst voorval (bijv. vertraagde of verkeerde diagnose, vertraagde of onjuiste behandeling), dient dit onmiddellijk aan de fabrikant gemeld te worden (**e-mail:** vigilance@ogt.com).

Indien vereist dient de gebeurtenis ook te worden gemeld aan uw nationale bevoegde instantie. Een lijst met meldpunten is beschikbaar op: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Specifieke prestatiekenmerken

Analytische specificiteit

Analytische specificiteit doelt op het percentage signalen dat met de juiste locus hybridiseert en niet met andere loci. De analytische specificiteit werd bepaald door het analyseren van in totaal 200 doelloci. De analytische specificiteit werd berekend als het aantal FISH-signalen dat hybridiseerde met de juiste locus gedeeld door het totaal aantal gehybridiseerde FISH-signalen.

Tabel 1. Analytische specificiteit voor het CLL Plus Screening Panel

Set	Sonde	Doellocus	Aant. signalen gehybridiseerd met de juiste locus	Totaal aant. gehybridiseerde signalen	Specificiteit (%)
13q14.3-deletiesonde	Rood 13q14.3	13q14.3	200	200	100
	Groen 13qter	13qter, 13q34	200	200	100
ATM-deletiesonde	Rood ATM	11q22.3	200	200	100
	Groen D11Z1	11q11.1-q11.1	200	200	100
Alpha Satellite 12 Plus voor CLL	D12Z3 rood	12p11.1-q11.1	200	200	100
P53-deletiesonde	Rood P53	17p13.1	200	200	100
	Groen D17Z1	17p11.1-q11.1	200	200	100
MYB-deletiesonde	Rood MYB	6q23	200	200	100
	Groen D6Z1	6p11.1-q11.1	200	200	100

Analytische sensitiviteit

Analytische sensitiviteit is het percentage scorebare interfasecellen met het verwachte normale signaalpatroon. De analytische sensitiviteit werd bepaald door het analyseren van interfasecellen in verschillende normale monsters. De sensitiviteit werd berekend als het percentage scorebare cellen met het verwachte signaalpatroon (met een betrouwbaarheidsinterval van 95%).

Tabel 2. Analytische sensitiviteit voor het CLL Plus Screening Panel

Set	Aant. cellen met verwachte signaalpatronen	Aant. cellen met noteerbare signalen	Sensitiviteit (%)	95% betrouwbaarheidsinterval
13q14.3-deletiesonde	481	500	96,2	1,6
ATM-deletiesonde	482	500	96,4	1,0
Alpha Satellite 12 Plus voor CLL	487	500	97,4	1,0
P53-deletiesonde	471	500	94,2	2,7
MYB-deletiesonde	479	500	95,8	1,7

Karakterisatie van normale drempelwaarden

De normale drempelwaarde, bij gebruik van FISH-sondes, is het maximumpercentage scorebare interfasecellen met een specifiek abnormaal signaalpatroon waarbij een monster als normaal wordt beschouwd voor dat signaalpatroon.

De normale drempelwaarde werd bepaald aan de hand van monsters van normale en positieve patiënten. Voor ieder monster werden de signaalpatronen van 100 cellen vastgelegd. De Youden-index werd berekend om de grenswaarde te bepalen waarvoor Sensitiviteit + Specificiteit -1 is gemaximaliseerd.

Tabel 3. Karakterisatie van normale drempelwaarden voor het CLL Plus Screening Panel

Set	Abnormaal signaalpatroon	Youden-index	Normale drempel (%)
13q14.3 Deletion Probe	1R, 2G of 0R, 2G	0,95	7
ATM Deletion Probe	1R, 2G	0,99	9
Alpha Satellite 12 Plus voor CLL	3R	0,99	3
P53 Deletion Probe	1R, 2G	0,90	10
MYB Deletion Probe	1R, 2G	0,97	8

Laboratoria moeten de drempelwaarden verifiëren aan de hand van hun eigen gegevens^{13,14}.

Precisie en reproduceerbaarheid

Precisie is een weergave van de natuurlijke variatie van een test wanneer deze enkele keren onder dezelfde condities wordt herhaald. Dit werd bepaald door het analyseren van herhaalde tests met sondes van dezelfde partij op hetzelfde monster, die op dezelfde dag onder dezelfde condities werden uitgevoerd.

Reproduceerbaarheid is een weergave van de variabiliteit van een test en is bepaald met betrekking tot variabiliteit tussen monsters, dagen en partijen. De reproduceerbaarheid van dag tot dag werd bepaald door het analyseren van dezelfde monsters op drie verschillende dagen. De reproduceerbaarheid van partij tot partij werd bepaald door het analyseren van dezelfde monsters met sondes uit drie verschillende partijen op dezelfde dag. De reproduceerbaarheid van monster tot monster werd bepaald door het analyseren van drie replica's van een monster op één dag. Voor ieder monster werden de signaalpatronen van 100 interfasecellen vastgelegd en werd het percentage cellen met het verwachte signaalpatroon berekend.

De reproduceerbaarheid en precisie werden berekend als de standaardafwijking (STDEV) tussen replica's voor iedere variabele en als algehele gemiddelde STDEV.

Tabel 4. Reproduceerbaarheid en precisie voor het CLL Plus Screening Panel

Variabele	Standaardafwijking (STDEV)				
	13q14.3 Deletion Probe	ATM Deletion Probe	Alpha Satellite 12 Plus voor CLL	P53 Deletion Probe	MYB Deletion Probe
Precisie	0,72	0,38	0,72	2,63	1,09
Monster tot monster	0,58	0,38	0,89	2,30	1,19
Dag tot dag	0,96	0,58	0,51	2,39	1,20
Partij tot partij	1,40	1,27	1,27	1,68	0,90
Algehele afwijking	1,03	1,01	1,15	2,16	1,06

Klinische prestatie

De klinische prestatie werd bepaald door middel van een representatief monster voor de beoogde populatie voor dit product. Voor ieder monster werden de signaalpatronen van ≥ 100 interfasecellen vastgelegd. Er werd bepaald of een monster normaal/abnormaal was door het percentage cellen met het specifieke abnormaal signaalpatroon te vergelijken met de normale drempelwaarde. De resultaten werden vervolgens vergeleken met de bekende status van het monster.

De resultaten van de klinische gegevens werden geanalyseerd om de sensitiviteit, specificiteit en drempelwaarden vast te stellen aan de hand van een eendimensionale benadering.

Tabel 5. Klinische prestaties voor het CLL *Plus* Screening Panel

Sonde	Klinische sensitiviteit (TPR [true positive rate; percentage terecht positieven])	Klinische specificiteit (TNR [true negative rate; percentage terecht negatieven])	Percentage fout-positieven (FPR) = 1 – Specificiteit
13q14.3 Deletion Probe	96,3%	99,1%	0,9%
ATM Deletion Probe	100%	99,2%	0,8%
Alpha Satellite 12 <i>Plus</i> voor CLL	100%	100%	0%
P53 Deletion Probe	92,5%	97,1%	2,9%
MYB Deletion Probe	97,8%	99,6%	0,4%

Aanvullende informatie

Neem contact op met de afdeling Technische ondersteuning van CytoCell voor aanvullende productinformatie.

T: +44(0) 1223 294048







E: techsupport@cytozell.com

W: www.ogt.com

Referenties

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. Hammarlund 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.

Symbolenverklaring

REF	nl: Catalogusnummer
	nl: Medisch apparaat voor <i>in-vitro</i> diagnostiek
	nl: Partijnummer
	nl: Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	nl: Fabrikant
	nl: Houdbaarheidsdatum
	nl: Temperatuurgrens
	nl: Buiten bereik van zonlicht bewaren
	nl: Bevat voldoende voor <n> tests
CONT	nl: Inhoud

Patenten en handelsmerken

CytoCell is een geregistreerd handelsmerk van Cytozell Ltd.

**Cytozell Ltd.**

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