



A Sysmex Group Company



### Gebruiksaanwijzing

REF: LPH 067-S / LPH 067

### CLL PROFILER-set



ALLEEN VOOR PROFESSIONEEL GEBRUIK



www.cytocell.com

Meer informatie en andere talen zijn beschikbaar via [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

#### Beperkingen

Dit apparaat is ontworpen voor het detecteren van genoomverliezen groter dan het gebied dat wordt beslaan door de rode en groene klonen in deze sondeset, inclusief de gebieden P53 (TP53), ATM en D13S319, of voor het detecteren van gains groter dan het gebied dat wordt beslaan door de blauwe kloon in deze sondeset, inclusief het centromeer van chromosoom 12. Genoomgains of -verliezen buiten deze gebieden of gedeeltelijke gains of verliezen van 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

De CytoCell CLL PROFILER-set 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 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 de P53 (TP53)-deletiestatus, ATM-deletiestatus of de D13S319-deletiestatus en/of gainstatus van het centromeer van chromosoom 12 te weten 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

De CytoCell CLL PROFILER-set is bedoeld voor het detecteren van deleties van TP53, ATM en D13S319 en gains van de centromeersequenties op chromosoom 12 in perifere bloed- of beenmergmonsters van patiënten met chronische lymfatische leukemie (CLL).

#### P53 (TP53)/ATM-sondecombinatie

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 van die ziekte<sup>1,2</sup>.

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-schade<sup>3</sup>. Het verlies van ATM wordt gemeld bij 18% van de patiënten met CLL en wordt beschouwd als marker voor een slechte prognose van die ziekte<sup>4</sup>.

Analyse van de ATM/TP53-interactie in CLL heeft aangetoond dat TP53 en ATM een belangrijke rol spelen bij de proliferatie van lymfoomkanker<sup>5</sup>. Er is aangetoond dat ATM de fosforylatie van TP53 verbetert als de schade zo groot is dat de cel door apoptose moet worden vernietigd (dit proces wordt geregeld door TP53). Deletie van ATM verwijderd deze checkpoint-activiteit en dus de activatie van TP53. Er wordt daarom geen poging gedaan tot reparatie, of apoptose van, beschadigde cellen, ondanks de aanwezigheid van TP53. Als ATM niet aanwezig is, kunnen beschadigde cellen zich blijven prolifereren<sup>5</sup>.

#### D13S319/13qter/12cen-deletie/enumeratie

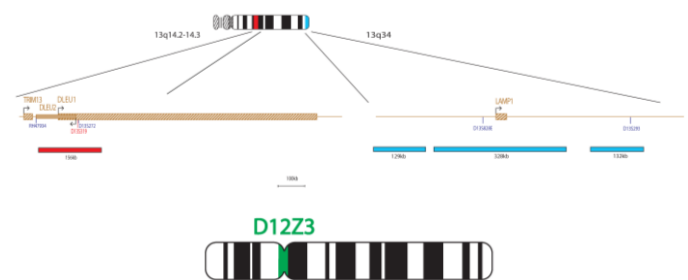
Deleties die 13q14 beïnvloeden zijn ook de meest voorkomende structurele genetische afwijkingen bij chronische lymfatische leukemie (CLL)<sup>6,7,8</sup>. Dit gebied vertoont in 30-60% van de CLL-patiënten heterozygote deletie en in 10-20% van de CLL-patiënten homozygote deletie<sup>9</sup>. Er is aangetoond dat de overlevingskans voor beide groepen vergelijkbaar is<sup>10</sup>. Patiënten met deleties van 13q14 hebben een zeer laag risico indien er geen andere genetische laesies aanwezig zijn<sup>1</sup>.

Twee niet-coderende RNA-genen, DLEU1 (*deletie bij lymfatische leukemie 1*) en DLEU2 (*deletie bij lymfatische leukemie 2*), plus de genetische marker D13S319, beslaan het pathogene kritische gebied van 13q14<sup>11</sup>. DLEU1 is de meest waarschijnlijke kandidaat voor het CLL-gerelateerde tumorsuppressorgen binnen het gebied 13q14<sup>12</sup>. Trisomie 12 is een terugkerende afwijking bij CLL, die bij 20% van de gevallen voorkomt<sup>13</sup> en is vaak de unieke cytogenetische afwijking (in 40-60% van de gevallen met trisomie 12)<sup>7</sup>. Patiënten met trisomie 12 hebben een laag risico indien er geen andere genetische laesies aanwezig zijn<sup>1</sup>.

#### Sondespecificatie

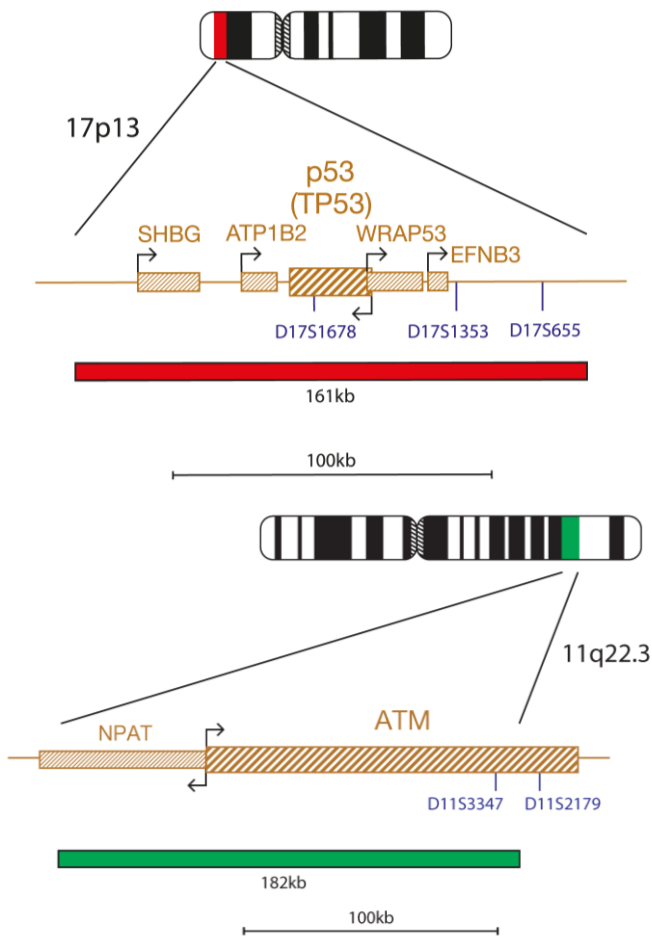
##### D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe

D13S319, 13q14.2, rood  
13qter, 13q34, blauw  
D12Z3, 12p11.1-q11.1, groen



De Chromosome 12 Alpha Satellite-sonde is een herhalingssequentiesonde, groen gemarkeerd, die de centromerische herhalingssequentie D12Z3 herkent. De D13S319-sonde, rood gemarkeerd, beslaat een gebied van 156kb, waaronder het gehele DLEU1-gen en het grootste gedeelte van het DLEU2-gen, en de markers D13S319, D13S272 en RH47934. De 13qter-specifieke subtelomeer-sonde, blauw gemarkeerd, maakt de identificatie van chromosoom 13 mogelijk en functioneert als controlesonde.

**P53 (TP53)/ATM**  
P53, 17p13.1, rood  
ATM, 11q22.3, groen



Het P53-component bestaat uit een 161kb-sonde, rood gemarkeerd, die het gehele gen P53 (TP53) en de naastgelegen gebieden beslaat. Het ATM-component bestaat uit een 182kb-sonde, groen gemarkeerd, die het telomerische uiteinde van het NPAT-gen en het centromerische uiteinde van het ATM-gen tot na de marker D11S3347 beslaat.

#### Geleverde materialen

##### D13S319/13qter/12cen-deletie/enumeratiesonde:

50 µl per buisje (5 tests) of 100 µl per buisje (10 tests)

##### P53 (TP53)/ATMProbe:

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.

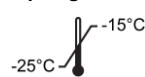
##### Tegenkleuring: 150 µl per buisje (15 tests)

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

#### 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 moedende 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 pH6,5 - 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 <sub>max</sub> [nm]	Emissie <sub>max</sub> [nm]
Blauw	418	467
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. Gebruik een enkelvoudige bandpassfilter voor het blauw spectrum voor optimale visualisatie van het blauwe spectrum of een drievoudige bandpassfilter voor het rode spectrum/groene spectrum/blauwe spectrum voor gelijktijdige visualisatie van de groene, rode en blauwe fluoroforen.

Controleer de fluorescentiemicroscop voorafgaand aan gebruik op een juiste werking. Gebruik immersie-olie die geschikt is voor fluorescentiemicroscopie en is geformuleerd voor lage autofluorescentie. Vermijd het mengen van DAPI Antifade met microscopimmensie-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 perifere bloedcellen of beenmergcellen die zijn gefixeerd in Carnoy's fixerooplossing (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 glasjes<sup>14</sup>.

## 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).

### Voorbereiding objectieflaasjes

1. Plaats het celmonster op een glazen objectieflaasje. Laat het opdrogen. **(Optioneel, indien een cytogetische droogkamer wordt gebruikt:** de glaasjes moeten worden bevestigd met behulp van een cytogetische 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 cytogetische droogkamer beschikbaar is).
2. Dompel het glaasje 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 monsterglaasje 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 dekglasmaasje. Dicht het af met rubberen lijmoplossing en laat de lijm volledig opdrogen.

### Denaturatie

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

### Hybridisatie

11. Plaats het glaasje 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 dekglasmaasje en alle sporen van lijm voorzichtig.
14. Dompel het glaasje gedurende 2 minuten onder in 0,4xSSC (pH 7,0) bij 72 °C (+/- 1 °C) zonder het te bewegen.
15. Laat het glaasje 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 glaasje afdruppen en breng 10 µl DAPI Antifade aan op ieder monster.
17. Bedek het met een dekglasmaasje, verwijder eventuele luchtballen en laat de kleur 10 minuten in het donker ontwikkelen.
18. Bekijk met een fluorescentiemicroscop (zie **Aanbevelingen fluorescentiemicroscop**).

### Stabiliteit van de gereedgemaakte glaasjes

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

### Proceduraanbevelingen

1. Verhitten of verouderen van de glaasjes 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

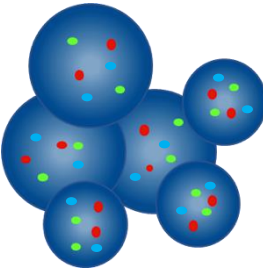
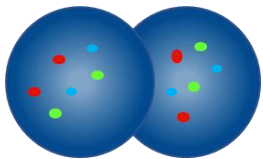
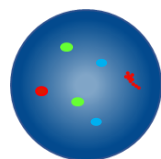
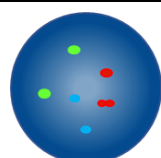
#### Glaasjeskwaliteit beoordelen

Het glaasje 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 fluorescentie waas de signalen verstoort - in ideale glaasjes is de achtergrond donker of zwart en leeg
- De randen van de celkernen niet kunnen worden onderscheiden en niet intact zijn

#### Analyserichtlijnen

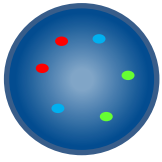
- Ieder monster dient door twee analisten te worden geanalyseerd en geïnterpreteerd. Eventuele verschillen moeten worden verholpen door een beoordeling door een derde analist
- Iedere analist dient voldoende gekwalificeerd te zijn volgens de erkende nationale standaarden
- Iedere analist dient onafhankelijk 100 kernen te noteren voor ieder monster. De eerste analist dient de analyse te starten vanaf de linkerzijde van het glaasje 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 analysebaar 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, twee blauwe signalen – één van de twee rode signalen is diffuus
	Tellen als twee rode signalen, twee blauwe twee groene signalen – het gat in één rood signaal is minder dan twee signaalbreedtes.

## Verwachte resultaten

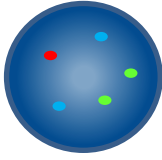
### D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe

#### Verwacht normaal signaalpatroon

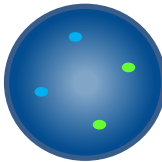


In een normale cel worden twee rode, twee blauwe en twee groene signalen (2R, 2B, 2G) verwacht.

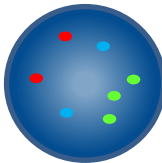
#### Verwachte abnormale signaalpatronen



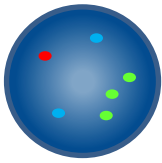
In een cel met een hemizygote deletie van de D13S319-locus is het verwachte signaalpatroon één rood signaal, twee blauwe en twee groene signalen (1R, 2B, 2G).



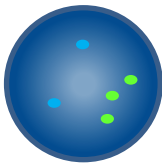
In een cel met een homozygote deletie van de D13S319-locus is het verwachte signaalpatroon geen rode, twee blauwe en twee groene signalen (0R, 2B, 2G).



In een cel met trisomie 12 en een normale D13S319-status is het verwachte signaalpatroon twee rode, twee blauwe en drie groene signalen (2R, 2B, 3G).



In een cel met trisomie 12 en een hemizygote D13S319-deletie is het verwachte signaalpatroon één rood signaal, twee blauwe signalen en drie groene signalen (1R, 2B, 3G).

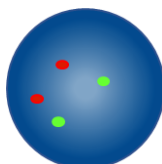


In een cel met trisomie 12 en een homozygote D13S319-deletie is het verwachte signaalpatroon geen rode signalen, twee blauwe signalen en drie groene signalen (0R, 2B, 3G).

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

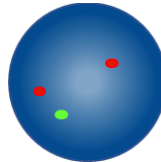
#### P53/ATM-sonde

#### Verwacht normaal signaalpatroon

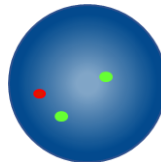


In een normale cel worden twee rode en twee groene signalen (2R, 2G) verwacht.

## Verwachte abnormale signaalpatronen



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



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

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

#### Bekende kruisreactiviteit

De groene D12Z3-sonde kan kruishybridisatie met 3c, 6c, 7c en 10c laten zien.

#### 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](mailto: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 doet 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 de CLL PROFILER-set

Set	Sonde	Doellocus	Aant. signalen gehybridiseerd met de juiste locus	Totaal aant. gehybridiseerde signalen	Specificiteit (%)
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	Rood D13S319	13q14.2	200	200	100
	Blauw 13qter	13q34	200	200	100
	Groen D12Z3	12p11.1-q11.1	200	200	100
P53/ATM-sonde	Rood P53	17p13	200	200	100
	Groen ATM	11q22.3	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 de CLL PROFILER-set

Set	Aant. cellen met verwachte signaalpatronen	Aant. cellen met noteerbare signalen	Sensitiviteit (%)	95% betrouwbaarheidsinterval
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	467	500	93,4	2,6
P53/ATM-sonde	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 de CLL PROFILER-set

Set	Herschikking	Abnormaal signaalpatroon	Youden-index	Normale drempel (%)
D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	Hemizygote D13S319 - deletie	1R, 2B, 2G	0,96	6
	Trisomie 12	2R, 2B, 3G	0,99	4
P53/ATM-sonde	P53-deletie	1R, 2G	0,99	8
	ATM-deletie	2R, 1G	0,99	8

Laboratoria moeten de drempelwaarden verifiëren aan de hand van hun eigen gegevens<sup>15,16</sup>.

#### 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 de CLL PROFILER-set

Variabele	Standaardafwijking (STDEV)	
	D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe	P53/ATM-sonde
Precisie	1,28	1,37
Monster tot monster	1,30	1,60
Dag tot dag	4,12	2,27
Partij tot partij	2,04	1,77
Algehele afwijking	3,30	1,98

#### 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  $\geq 100$  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 eindimensionale benadering.

Tabel 5. Klinische prestaties voor de CLL PROFILER-set

Herschikking	Klinische sensitiviteit (TPR [true positive rate; percentage terecht positieven])	Klinische specificiteit (TNR [true negative rate; percentage terecht negatieven])	Percentage fout-positieven (FPR) = 1 - Specificiteit
<i>D13S319/13qter/12cen Deletion, Enumeration Probe</i>			
D13S319-deletie	96,6%	99,5%	0,5%
Trisomie 12	100%	100,0%	0%
<i>P53/ATM-sonde</i>			
P53-deletie	100%	100%	0%
ATM-deletie	100%	100%	0%

#### Aanvullende informatie

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

T: +44(0) 1223 294048






E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

#### Referenties

- 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
- Juliusson G et al., N Eng J Med 1990;323:720-4
- Puiggros et al., Biomed Res Int 2014;1-13
- Kasar et al., Nature Communications 2015;6:1-12
- Hammarlund 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, M.J. 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.

#### Symbolenverklaring

	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
	nl: Inhoud

#### Patenten en handelsmerken

CytoCell is een geregistreerd handelsmerk van CytoCell Ltd.

#### CytoCell 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@cytoCELL.com  
W: www.ogt.com

