

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 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 celsuspensies die hematologisch zijn verkregen, zijn gefixeerd in Camoy's fixeroplossing (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 glasjes⁴.

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 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 fluorescentiemicroscop (zie Aanbevelingen fluorescentiemicroscop).

Stabiliteit van de gereedgemaakte glasjes

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

Proceduraanbevelingen

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

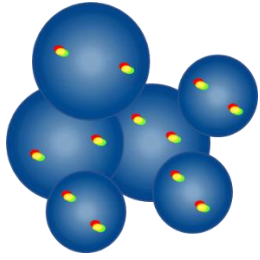
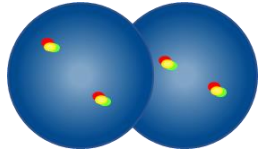
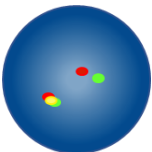
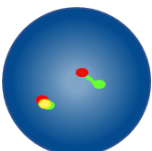
Glasjeskwaliteit beoordelen

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

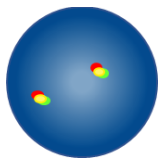
Analyserichtlijnen

- 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 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
- Tel het tijdens het analyseren van breakapart-sondes met twee kleuren als een niet-herschikt/gefuseerd signaal als er tussen de rode en groene signalen een gat bestaat dat niet groter is dan twee signaalbreedtes
- 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 |
|  | Tel als twee fusiesignalen - het gat tussen het rode en groene signaal is minder dan twee signaalbreedtes |
|  | Tel als twee fusiesignalen - één fusiesignaal is diffuus |

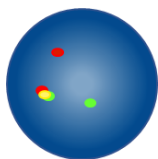
Verwachte resultaten

Verwacht normaal signaalpatroon



In een normale cel worden twee rood/groene fusiesignalen verwacht (2F).

Verwachte abnormale signaalpatronen



In een cel met een RARA-herschikking is het verwachte signaalpatroon één rood signaal, één groen signaal en één fusie (1R, 1G, 1F).

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

Bekende kruisreactiviteit

Geen bekende kruisreactiviteit.

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 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 RAR α Breakapart Probe

| Sonde | Doellocus | Aant. signalen gehybridiseerd met de juiste locus | Totaal aant. gehybridiseerde signalen | Specificiteit (%) |
|--------------------|-----------|---|---------------------------------------|-------------------|
| Rood RAR α | 17q21.1 | 200 | 200 | 100 |
| Groen RAR α | 17q21.2 | 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 RAR α Breakapart Probe

| Aant. cellen met verwachte signaalpatronen | Aant. cellen met noteerbare signalen | Sensitiviteit (%) | 95% betrouwbaarheidsinterval |
|--|--------------------------------------|-------------------|------------------------------|
| 473 | 500 | 94,6 | 3,5 |

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 RAR α Breakapart Probe

| Abnormaal signaalpatroon | Youden-index | Normale drempel (%) |
|--------------------------|--------------|---------------------|
| 1R, 1G, 1F | 0,99 | 3 |

Laboratoria moeten de drempelwaarden verifiëren aan de hand van hun eigen gegevens^{5,6}.

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 RAR α Breakapart Probe

| Variabele | Standaardafwijking (STDEV) |
|---------------------|----------------------------|
| Precisie | 0,38 |
| Monster tot monster | 0,19 |
| Dag tot dag | 0,38 |
| Partij tot partij | 0,38 |
| Algehele afwijking | 0,72 |

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 de RAR α Breakapart Probe

| Variabele | Resultaat |
|---|-----------|
| Klinische sensitiviteit (TPR [true positive rate; percentage terecht positieven]) | 100% |
| Klinische specificiteit (TNR [true negative rate; percentage terecht negatieven]) | 100% |
| Percentage fout-positieven (FPR) = 1 – Specificiteit | 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

1. Creutzig *et al.*, Blood 2012;120(16):3187-3205
2. Zhang *et al.*, Blood Reviews 2015;29(2):101-125
3. Tomita *et al.*, International Journal of Haematology 2013;97(6):717-725
4. Arsham, MS., Barch, M.J. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
5. 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.
6. 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: 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