



A Sysmex Group Company



## Gebrauchsanweisung

REF: LPH 027-S / LPH 027

### AML1 (RUNX1) Breakapart Probe



NUR FÜR DEN PROFESSIONELLEN GEBRAUCH



www.cytocell.com

Weitere Informationen und andere Sprachen erhältlich unter [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

#### Einschränkungen

Dieses Produkt wurde entwickelt, um Neuaneordnungen mit Bruchstellen in der Region zu erkennen, die durch die roten und grünen Klone in diesem Sondenset gebunden wird, dazu gehört auch die Region *AML1 (RUNX1)*. Bruchstellen außerhalb dieser Region oder abweichende Neuaneordnungen, die komplett in dieser Region enthalten sind, können mit diesem Produkt nicht erkannt werden. Aufgrund der verstreuten Bruchstellenregion können die Anwender bei einigen Neuaneordnungen bei akuter lymphatischer Leukämie (ALL) abweichende Signalmuster beobachten.

Dieser Test ist nicht für die eigenständige Diagnostik, Pränataldiagnostik, das populationsbasierte Screening, stationäre Untersuchungen oder Selbsttests geeignet. Dieses Produkt ist nur für den professionellen Gebrauch im Labor bestimmt. Alle Ergebnisse sind durch entsprechend qualifiziertes Personal zu interpretieren, dabei sind alle übrigen relevanten Testergebnisse zu berücksichtigen.

Dieses Produkt wurde nicht für die Verwendung mit anderen Probenotypen oder Krankheitstypen als denjenigen validiert, die unter „Verwendungszweck“ aufgeführt sind.

Die Meldung und Auslegung der FISH-Ergebnisse sollte den professionellen Praxisstandards entsprechen und weitere klinische und diagnostische Informationen berücksichtigen. Dieses Kit ist als Ergänzung zu anderen diagnostischen Labortests gedacht und es sollten nicht allein aufgrund des FISH-Ergebnisses therapeutische Maßnahmen eingeleitet werden.

Die Nichteinhaltung des Protokolls kann sich nachteilig auf die Leistung auswirken und zu falsch positiven/negativen Ergebnissen führen.

Dieses Kit wurde nicht für Zwecke außerhalb des angegebenen Verwendungszwecks zugelassen.

#### Verwendungszweck

Die CytoCell AML1 (RUNX1) Breakapart Probe ist ein hochwertiger, nicht automatisierter Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungstest (FISH) zum Nachweis von chromosomalen Neuaneordnungen in der Region 21q22.1 auf Chromosom 21 in mit Carnoy'scher Lösung (3:1 Methanol/Essigsäure) fixierten, hämatologisch gewonnenen Zellsuspensionen von Patienten mit bestätigter oder vermuteter akuter myeloischer Leukämie (AML) oder akuter lymphatischer Leukämie (ALL).

#### Indikationen

Dieses Produkt wurde als Ergänzung zu anderen klinischen und histopathologischen Tests in anerkannten diagnostischen und klinischen Versorgungspfaden konzipiert, bei denen die Kenntnis des *AML1 (RUNX1)* Neuaneordnungsstatus für das klinische Management relevant wäre.

#### Grundprinzipien des Tests

Bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) handelt es sich um eine Technik, die es ermöglicht, DNA-Sequenzen auf Metaphase-Chromosomen oder in Interphase-Kernen in festen zytogenetischen Proben nachzuweisen. Bei dieser Technik kommen DNA-Sonden zum Einsatz, die ganze Chromosomen oder einzelne Sequenzen hybridisieren und als leistungsstarke Ergänzung zur zytogenetischen Analyse der G-Bänderung dienen. Diese Technik kann nun als wesentliches Untersuchungsinstrument bei der Chromosomenanalyse im pränatalen und hämatologischen Bereich sowie bei der Analyse von soliden Tumoren eingesetzt werden. Die Ziel-DNA steht nach Fixierung und Denaturierung für die Bindung an eine ähnlich denaturierte, fluoreszierend

markierte DNA-Sonde zur Verfügung, die eine komplementäre Sequenz aufweist. Nach der Hybridisierung wird die ungebundene und unspezifisch gebundene DNA-Sonde entfernt und zwecks Visualisierung eine Gegenfärbung der DNA vorgenommen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wird dann die hybridisierte Sonde im Zielmaterial visualisiert.

#### Informationen zur Sonde

Das *RUNX1*-Gen (*Transkriptionsfaktor 1 der RUNX-Familie*) an 21q22.1 ist eines der häufigsten Ziele für chromosomale Neuaneordnungen, die bei der akuten Leukämie beim Menschen beobachtet wurden.

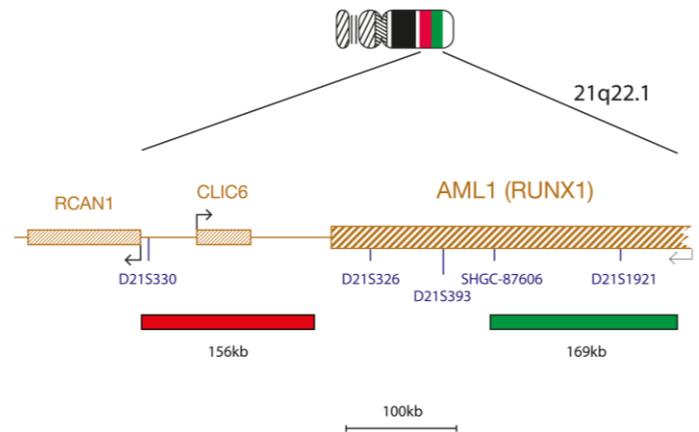
Zu den häufigsten Neuaneordnungen gehören die Fusionen *ETV6-RUNX1* und *RUNX1-RUNX1T1*. Die *ETV6-RUNX1* Fusion wird durch die t(12;21)(p13;q22) Translokation verursacht, die in etwa 21 % aller Fälle von akuter lymphatischer Leukämie vom Typ B-Zell (ALL) im Kindesalter nachgewiesen wird<sup>1</sup>, während die *RUNX1-RUNX1T1* Fusion das Ergebnis der t(8;21)(q22;q22) Translokation ist, die bei 10-22 % der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) des Typs M2 laut FAB (Französisch-Amerikanisch-Britische Klassifikation) und 5-10 % aller AML-Fälle insgesamt beobachtet wird<sup>2,3</sup>. Beide Neuaneordnungen gelten bei diesen Erkrankungen als gute prognostische Indikatoren<sup>4,5</sup>.

Auch bei vielen anderen Translokationen kommt es zu einer Neuaneordnung des *RUNX1*-Gens, zu den Partnern gehören die Chromosomen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 und X<sup>6</sup>. Diese Break-apart-Sonde wurde entwickelt, um Neuaneordnungen unabhängig vom Partnergen nachzuweisen.

Neuaneordnungen von *RUNX1* sind nicht auf Translokationen beschränkt. Mittels FISH konnten auch Amplifikationen des Chromosoms 21 (*iAMP21*), einschließlich des *RUNX1*-Gens, bei ALL im Kindesalter nachgewiesen werden<sup>7,8</sup>. Diese Amplifikationen wurden mit einem schlechteren Outcome in Zusammenhang gebracht<sup>9</sup>.

#### Spezifikation der Sonde

AML1, 21q22.1, rot  
AML1, 21q22.1, grün



Der AML1-Sondenmix besteht aus einer rot markierten 156kb Sonde, die sich centromerisch zum *AML1 (RUNX1)*-Gen befindet, welches das *CLIC6*-Gen umfasst, und einer grün markierten 169kb-Sonde, welche einen Teil des *AML1 (RUNX1)*-Gens abdeckt, einschließlich der Marker *SHGC-87606* und *D21S1921*.

#### Bereitgestelltes Material

**Sonde:** 50 µl pro Ampulle (5 Tests) oder 100 µl pro Ampulle (10 Tests)

Für die Gegenfärbung wird DAPI Antifade verwendet (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidin-2-phenylindol)).

**Gegenfärbung:** 150 µl pro Ampulle (15 Tests)

Für die Gegenfärbung wird DAPI Antifade verwendet (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidin-2-phenylindol)).

#### Warn- und Sicherheitshinweise

1. Nur für den Einsatz in der *in-vitro* Diagnostik. Nur für den professionellen Gebrauch.
2. Tragen Sie Handschuhe, wenn Sie mit DNA-Sonden und DAPI-Gegenfärbung hantieren.
3. Sondenmixturen enthalten Formamid, dabei handelt es sich um ein Teratogen. Dämpfe nicht einatmen und Hautkontakt vermeiden. Gehen Sie vorsichtig vor; tragen Sie Handschuhe und einen Laborkittel.
4. DAPI ist ein potentielles Karzinogen. Gehen Sie vorsichtig vor; tragen Sie Handschuhe und einen Laborkittel.
5. Entsorgen Sie alle Gefahrenstoffe gemäß den Leitlinien, die in Ihrer Einrichtung für die Schadstoffentsorgung gelten.
6. Die Nutzer müssen in der Lage sein, zwischen den Farben Rot, Blau und Grün zu unterscheiden.
7. Die Nichteinhaltung des vorgegebenen Protokolls oder die Nichtnutzung der Reagenzien kann sich nachteilig auf die Leistung auswirken und zu falsch positiven/negativen Ergebnissen führen.
8. Die Sondenflüssigkeit sollte nicht verdünnt oder mit anderen Sondenflüssigkeiten gemischt werden.
9. Werden während der Prä-Denaturierungsphase nicht 10µl der Sonde benutzt, so kann sich das nachteilig auf die Leistung auswirken und zu falsch positiven/negativen Ergebnissen führen.

## Lagerung und Handhabung



Das Kit ist bei Temperaturen zwischen -25 °C und -15 °C in einem Gefrierschrank aufzubewahren, bis das Ablaufdatum, das auf dem Etikett des Kits angegeben ist, erreicht wurde. Die Sonde und die Ampullen mit der Gegenfärbung sind im Dunkeln zu lagern.



Die Sonde bleibt während der Frost-Tau-Zyklen, die im regulären Gebrauch auftreten, stabil (dabei besteht ein Zyklus jeweils aus der Entnahme der Sonde aus dem Gefrierschrank und dem Austausch der Sonde im Gefrierschrank) und ist bis zu 48 Stunden lang lichtbeständig, nachdem sie kontinuierlichen Lichtverhältnissen ausgesetzt wurde. Es müssen alle Anstrengungen unternommen werden, um die Exposition gegenüber Licht- und Temperaturschwankungen zu begrenzen.

## Benötigte Geräte und Materialien, die nicht zum Lieferumfang gehören

Es müssen kalibrierte Geräte verwendet werden:

1. Heizplatte (mit einer festen Platte und einer präzisen Temperaturregelung bis 80 °C)
2. Kalibrierte Mikropipetten und Spitzen mit variablem Volumen von 1 µl – 200 µl
3. Wasserbad mit präziser Temperaturregelung bei 37 °C und 72 °C
4. Mikrozentrifugenröhrchen (0,5 ml)
5. Fluoreszenzmikroskop (bitte beachten Sie dazu den Abschnitt „Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop“)
6. Phasenkontrastmikroskop
7. Saubere Coplin-Gefäße aus Kunststoff, Keramik oder hitzebeständigem Glas
8. Pinzette
9. Kalibriertes pH-Messgerät (oder pH-Indikatorstreifen für die Messung von pH-Werten zwischen 6,5–8,0)
10. Befeuchteter Behälter
11. Immersionsöl für das Objektiv des Fluoreszenz-Mikroskops
12. Laborzentrifuge
13. Objektträger
14. 24 x 24 mm Deckgläser
15. Zeitmesser
16. 37 °C Inkubator
17. Kleber auf Gummibasis
18. Vortexmischer
19. Messzylinder
20. Magnetrührer
21. Kalibriertes Thermometer

## Optionale Ausrüstung, die nicht zum Lieferumfang gehört

1. Zytogenetische Trocknungskammer

## Benötigte Reagenzien, die nicht zum Lieferumfang gehören

1. 20x Kochsalz-Natrumcitrat (SSC)-Lösung
2. 100 % Ethanol
3. Tween-20
4. 1M Natriumhydroxid (NaOH)
5. 1M Salzsäure (HCl)
6. Destilliertes Wasser

## Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Benutzen Sie eine 100 Watt Quecksilberlampe oder eine gleichwertige Lampe sowie 60/63x oder 100x Plan-Apochromate als Objektive für eine optimale Visualisierung. Die Fluorophore, die in diesem SONDENSET verwendet werden, werden bei folgenden Wellenlängen angeregt und emittiert:

Fluorophor	Max. Erregung [nm]	Max. Aussendung [nm]
Grün	495	521
Rot	596	615

Achten Sie auf eine angemessene Anregung und stellen Sie sicher, dass das Mikroskop mit Emissionsfiltern ausgestattet ist, welche die oben aufgeführten Wellenlängen abdecken. Verwenden Sie einen dreifachen Bandfilter DAPI/grünes Spektrum/rotes Spektrum oder einen zweifachen Bandfilter grünes Spektrum/rotes Spektrum, um eine optimale gleichzeitige Visualisierung der grünen und roten Fluorophore zu gewährleisten.

Überprüfen Sie das Fluoreszenzmikroskop vor dem Gebrauch, um sich von seiner einwandfreien Funktion zu überzeugen. Verwenden Sie Immersionsöl, das für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet ist und aufgrund seiner Formulierung eine geringe Autofluoreszenz aufweist. Mischen Sie DAPI-Antifade nicht mit Mikroskop-Immersionen, da dadurch die Signale verdeckt werden können. Befolgen Sie hinsichtlich der Lebensdauer der Lampe und dem Alter der Filter die Empfehlungen der Hersteller.

## Vorbereitung der Probe

Das Kit ist für den Einsatz auf hämatologisch gewonnenen Zellsuspensionen konzipiert, die in Carnoy'scher Lösung (3:1 Methanol/Essigsäure) fixiert sind und nach den Richtlinien des Labors oder des Instituts vorbereitet werden. Bereiten Sie lufttrocknende Proben nach den zytogenetischen Standardverfahren auf Objektträgern vor. Das AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* enthält Empfehlungen für die Sammlung, Kultivierung und Entnahme von Proben sowie die Präparation der Objektträger<sup>10</sup>.

## Vorbereitung der Lösung

### Ethanolösungen

Verdünnen Sie 100 % Ethanol unter Berücksichtigung der folgenden Mischverhältnisse mit destilliertem Wasser und mischen Sie die Lösung gründlich durch.

- 70 % Ethanol – 7 Teile 100 % Ethanol auf 3 Teile destilliertes Wasser
  - 85 % Ethanol – 8,5 Teile 100 % Ethanol auf 1,5 Teile destilliertes Wasser
- Lagern Sie die Lösungen bis zu 6 Monate bei Raumtemperatur in einem luftdichten Behälter.

### 2x SSC Lösung

Verdünnen Sie 1 Teil 20x SSC Lösung mit 9 Teilen destilliertem Wasser und mischen Sie die Lösung gründlich durch. Messen Sie den pH-Wert und korrigieren Sie diesen nach Bedarf mit NaOH oder HCl auf einen pH-Wert von 7,0. Lagern Sie die Lösung bis zu 4 Wochen bei Raumtemperatur in einem luftdichten Behälter.

### 0,4x SSC Lösung

Verdünnen Sie 1 Teil 20x SSC Lösung mit 49 Teilen destilliertem Wasser und mischen Sie die Lösung gründlich durch. Messen Sie den pH-Wert und korrigieren Sie diesen nach Bedarf mit NaOH oder HCl auf einen pH-Wert von 7,0. Lagern Sie die Lösung bis zu 4 Wochen bei Raumtemperatur in einem luftdichten Behälter.

### 2x SSC, 0,05 % Tween-20 Lösung

Verdünnen Sie 1 Teil 20x SSC Lösung mit 9 Teilen destilliertem Wasser. Fügen Sie 5 µl Tween-20 auf 10 ml hinzu und mischen Sie die Lösung gründlich durch. Messen Sie den pH-Wert und korrigieren Sie diesen nach Bedarf mit NaOH oder HCl auf einen pH-Wert von 7,0. Lagern Sie die Lösung bis zu 4 Wochen bei Raumtemperatur in einem luftdichten Behälter.

## FISH-Protokoll

(Hinweis: Stellen Sie sicher, dass die Exposition der Sonde und der Gegenfärbung gegenüber den Laborlampen stets begrenzt ist).

### Vorbereitung des Objektträgers

1. Leuchten Sie die Zellprobe auf einem Objektträger aus Glas aus. Lassen Sie den Objektträger trocknen. (**Optional, falls eine zytogenetische Trocknungskammer verwendet wird:** die Ausleuchtung der Objektträger sollte in einer zytogenetischen Trocknungskammer vorgenommen werden. Die Kammer sollte bei etwa 25 °C und 50 % Luftfeuchtigkeit betrieben werden, um eine optimale Ausleuchtung der Zellproben sicherzustellen. Steht keine zytogenetische Trocknungskammer zur Verfügung, so kann alternativ auch ein Dunstabzug verwendet werden).
2. Tauchen Sie den Objektträger 2 Minuten lang bei Raumtemperatur (RT) in 2x SSC, ohne die Lösung dabei zu schütteln.
3. In einer Ethanolserie (70 %, 85 % und 100 %) jeweils 2 Minuten bei RT dehydrieren.
4. Lassen Sie den Objektträger trocknen.

### Prä-Denaturierung

5. Entnehmen Sie die Sonde aus dem Gefrierschrank und erwärmen Sie diese auf RT. Die Röhrchen vor dem Gebrauch kurz zentrifugieren.
6. Stellen Sie sicher, dass die Sondenlösung mit einer Pipette gleichmäßig durchgemischt wird.
7. Entnehmen Sie jeweils 10 µl Sonde pro Test und geben Sie diese Menge in ein Mikrozentrifugenröhrchen. Geben Sie die verbleibende Sonde schnell wieder zurück in den Gefrierschrank.
8. Platzieren Sie die Sonde und den Objektträger mit der Probe zum Vorwärmen 5 Minuten lang auf einer Heizplatte mit einer Temperatur von 37 °C (+/- 1 °C).
9. Tröpfeln Sie 10 µl des SONDENMISCHS auf die Zellprobe und setzen Sie vorsichtig ein Deckglas darauf. Verschließen Sie das Gefäß mit Kleber auf Gummibasis und lassen Sie den Kleber vollständig trocknen.

### Denaturierung

10. Denaturieren Sie die Probe und die Sonde gleichzeitig, indem Sie den Objektträger 2 Minuten lang auf einer Heizplatte auf eine Temperatur von 75 °C (+/- 1 °C) erhitzen.

### Hybridisierung

11. Platzieren Sie den Objektträger über Nacht in einem feuchten, luftdichten Behälter bei einer Temperatur von 37 °C (+/- 1 °C).

### Spülgänge nach der Hybridisierung

12. Entnehmen Sie die DAPI-Lösung aus dem Gefrierschrank und erwärmen Sie diese auf RT.
13. Nehmen Sie das Deckglas ab und entfernen Sie vorsichtig etwaige Kleberrückstände.
14. Tauchen Sie den Objektträger 2 Minuten lang bei einer Temperatur von 72 °C (+/- 1 °C) ohne Schütteln in 0,4x SSC (pH 7,0) ein.
15. Den Objektträger abtropfen lassen und bei RT (pH 7,0) 30 Sekunden lang ohne Schütteln in 2x SSC, 0,05 % Tween-20 eintauchen.
16. Den Objektträger trocknen lassen und 10 µl DAPI Antifade auf jede Probe aufbringen.
17. Ein Deckglas aufsetzen, etwaige Blasen entfernen und 10 Minuten abwarten, während sich die Farbe im Dunkeln entwickelt.
18. Unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachten. (Bitte beachten Sie dazu den Abschnitt „Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop“.)

**Stabilität der fertigen Objektträger**

Fertige Objektträger bleiben bei Lagerung im Dunkeln bei oder unter RT bis zu 1 Monat lang analysierbar.

**Empfehlungen zur Vorgehensweise**

1. Die Ofenbehandlung oder Aushärtung von Objektträgern kann die Signalfluoreszenz reduzieren.
2. Die Hybridisierungsbedingungen können beeinträchtigt werden, wenn andere Reagenzien als die verwendet werden, die durch CytoCELL Ltd. zur Verfügung gestellt oder empfohlen werden.
3. Verwenden Sie ein geeichtes Thermometer, um die Temperatur von Lösungen, Wasserbädern und Inkubatoren zu messen, da diese für eine optimale Produktleistung eine entscheidende Rolle spielen.
4. Die Waschkonzentrationen, der pH-Wert und die Temperaturen sind wichtig, da eine geringe Stringenz zu einer unspezifischen Bindung der Sonde führen kann und eine zu hohe Stringenz ein fehlendes Signal verursachen kann.
5. Eine unvollständige Denaturierung kann zu einem fehlenden Signal führen, eine übermäßige Denaturierung dagegen auch zu unspezifischer Bindung.
6. Eine übermäßige Hybridisierung kann zu zusätzlichen oder unerwarteten Signalen führen.
7. Anwender sollten das Protokoll für ihre eigenen Proben optimieren, bevor sie den Test für diagnostische Zwecke einsetzen.
8. Suboptimale Bedingungen können zu einer unspezifischen Bindung führen, die fälschlicherweise als Sondensignal interpretiert werden kann.

**Auswertung der Ergebnisse**

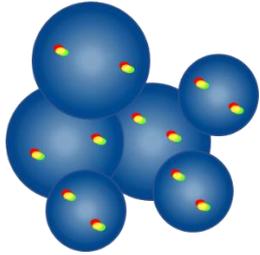
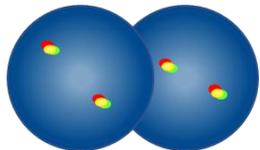
**Beurteilung der Objektträgerqualität**

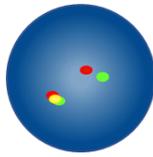
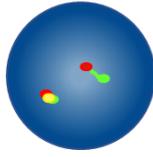
Der Objektträger sollte nicht analysiert werden, falls folgendes zutrifft:

- Die Signale sind zu schwach für eine Analyse in Einzelfiltern – um die Analyse fortzusetzen, sollten Signale hell, deutlich und leicht auswertbar sein.
- Es gibt eine große Anzahl von verklumpten/überlappenden Zellen, welche die Analyse stören.
- >50 % der Zellen sind nicht hybridisiert.
- Es gibt einen Überschuss an fluoreszierenden Partikeln zwischen den Zellen und/oder einen fluoreszierenden Schleier, der die Signale stört – bei einem optimalen Objektträger sollte der Hintergrund dunkel oder schwarz und sauber aussehen.
- Die Zellkerngrenzen sind nicht eindeutig erkennbar und nicht intakt.

**Analyseleitlinien**

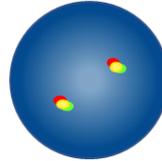
- Jede Probe sollte von zwei Analytikern analysiert und ausgewertet werden. Etwaige Unstimmigkeiten sind durch die Auswertung durch einen dritten Analytiker zu klären
- Jeder Analytiker muss über eine angemessene Qualifikation verfügen, die den anerkannten nationalen Standards entspricht.
- Jeder Analytiker sollte unabhängig voneinander 100 Kerne für jede Probe bewerten. Der erste Analytiker sollte mit seiner Analyse auf der linken Seite des Objektträgers beginnen, der zweite Analytiker auf der rechten Seite.
- Jeder Analytiker sollte seine Ergebnisse in separaten Tabellen dokumentieren.
- Analysieren Sie nur intakte Kerne, keine überlappenden oder überfüllten Kerne und keine Kerne, die mit zytoplasmatischen Ablagerungen bedeckt sind oder einen hohen Autofluoreszenzgrad aufweisen.
- Meiden Sie Bereiche, in denen übermäßige zytoplasmatische Ablagerungen oder unspezifische Hybridisierung vorhanden sind.
- Die Signalintensität kann variieren, das gilt auch für einzelne Kerne. Verwenden Sie in solchen Fällen Einzelfilter und/oder passen Sie die Bildebene entsprechend an.
- Unter suboptimalen Bedingungen können Signale diffus erscheinen. Wenn sich zwei Signale der gleichen Farbe berühren oder der Abstand zwischen ihnen nicht größer als zwei Signalbreiten ist, oder wenn ein schwacher Strang vorhanden ist, der die beiden Signale verbindet, zählen diese beiden Signale jeweils als ein Signal.
- Wenn bei der Analyse von zweifarbigen Break-apart-Sonden ein Abstand zwischen dem roten und grünen Signal nicht größer als zwei Signalbreiten ist, so wird dies als nicht neu angeordnetes/fusioniertes Signal gedeutet.
- Falls Sie Zweifel haben, ob eine Zelle für die Analyse in Frage kommt oder nicht, analysieren Sie diese Zelle nicht.

Analyseleitlinien	
	Nicht zählen – Kerne sind zu nah beieinander, um die Grenzen zu bestimmen
	Überlappende Kerne nicht zählen – es sind nicht alle Bereiche beider Kerne sichtbar

	Als zwei Fusionssignale zählen – der Abstand zwischen dem roten und grünen Signal beträgt weniger als zwei Signalbreiten
	Als zwei Fusionssignale zählen – ein Fusionssignal ist diffus

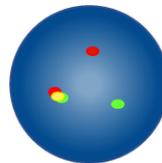
**Erwartete Ergebnisse**

Erwartetes normales Signalmuster



In einer normalen Zelle werden zwei rote/grüne Fusionssignale (2F) erwartet.

Erwartetes abnormales Signalmuster



In einer Zelle mit balancierter AML1 (RUNX1)Neuanordnung entspricht das erwartete Signalmuster einem roten, einem grünen und einem Fusionssignal (1R, 1G, 1F).

Andere Signalmuster sind bei aneuploiden/unausgewogenen Proben möglich.

**Bekannte Kreuzreaktionen**

Keine bekannten Kreuzreaktionen.

**Meldung von unerwünschten Ereignissen**

Falls Sie der Ansicht sind, dass dieses Produkt eine Fehlfunktion aufweist oder es zu einer Verschlechterung der Leistungsmerkmale gekommen ist, die zu einem unerwünschten Ereignis (z. B. verzögerte Diagnose, Fehldiagnose, verzögerte oder ungeeignete Therapie) geführt haben könnte, muss dies unverzüglich dem Hersteller gemeldet werden. (E-Mail: [vigilance@ogt.com](mailto:vigilance@ogt.com)).

Ggf. sollte das Ereignis auch Ihrer zuständigen nationalen Behörde gemeldet werden. Eine Liste der Ansprechpartner, die für die Vigilanz verantwortlich sind, finden Sie unter: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

**Spezifische Leistungsmerkmale**

**Analytische Spezifität**

Analytische Spezifität bezeichnet den Prozentsatz der Signale, die im richtigen Locus und an keinem anderen Ort hybridisiert wurden. Die analytische Spezifität wurde durch die Analyse von insgesamt 200 Zielloci ermittelt. Die analytische Spezifität wurde berechnet, indem die Anzahl der FISH-Signale, die an den richtigen Locus hybridisiert wurden, durch die Gesamtzahl der hybridisierten FISH-Signale dividiert wurde.

Tabelle 1 Analytische Spezifität der AML1 Breakapart Probe

Sonde	Ziellocus	Anzahl der Signale, die im richtigen Locus hybridisiert wurden	Gesamtzahl der hybridisierten Signale	Spezifität (%)
Rot AML1	21q22	200	200	100
Grün AML1	21q22	200	200	100

**Analytische Sensitivität**

Die analytische Sensitivität ist der Prozentsatz der auswertbaren Zellen in der Interphase, die das erwartete normale Signalmuster aufweisen. Die analytische Sensitivität wurde durch die Analyse von Zellen in der Interphase in verschiedenen normalen Proben ermittelt. Die Sensitivität wurde als Prozentsatz der auswertbaren Zellen berechnet, die das erwartete Signalmuster aufweisen (mit einem Konfidenzintervall von 95 %).

Tabelle 2 Analytische Sensitivität der AML1 Breakapart Probe

Anzahl der Zellen mit erwarteten Signalmustern	Anzahl der Zellen mit auswertbaren Signalen	Sensitivität (%)	95 % Konfidenzintervall
4974	5000	99,48	99,24 – 99,64

#### Charakterisierung der normalen Cut-off-Werte

Der normale Cut-off-Wert ist in Verbindung mit FISH-Sonden der maximale Prozentsatz der auswertbaren Zellen in der Interphase mit einem spezifischen abnormalen Signalmuster, bei dem eine Probe für das betreffende Signalmuster als normal gilt.

Der normale Cut-off-Wert wurde mithilfe von Proben, die negativ auf die Neuordnung waren, die mit dieser Sonde erfasst werden soll, und der Beta-Inverse-Funktion ermittelt. Für jede Probe wurden die Signalmuster von 100 Zellen in der Interphase durch zwei unabhängige Analytiker aufgezeichnet, also insgesamt 200 für jede Probe.

Tabelle 3 Charakterisierung der normalen Cut-off-Werte der AML1 Breakapart Probe

Abnormales Signalmuster	Anzahl der Proben, die zur Generierung des Cut-off-Werts untersucht wurden	Anzahl der bewerteten Kerne pro Probe	Max. Anzahl der falsch positiven Signalmuster	Normaler Cut-off-Wert (%)
1R, 1G, 1F	25	200	2	3,5

Labore müssen die Cut-off-Werte anhand eigener Daten überprüfen<sup>11, 12</sup>.

#### Genauigkeit und Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit wurde durch drei unabhängige Labore nachgewiesen, die sechs verblindete Proben untersuchten (zwei ohne Neuordnung, zwei schwach positive mit dem 1- bis 3-fachen Cut-off-Wert und zwei stark positive Proben, in denen mehr als 45 % der Zellen positiv auf die Neuordnung getestet wurden). Die Analyse wurde durchgeführt, indem an fünf nicht aufeinanderfolgenden Tagen jeweils zwei Kopien jeder Probe untersucht wurden.

Alle drei Standorte führten Tests innerhalb eines Tages, an mehreren Tagen und innerhalb des Standorts mit der gleichen Sondencharge durch, während einer der Standorte auch die Reproduzierbarkeit innerhalb der Charge mit drei verschiedenen Sondenchargen untersuchte.

Die Reproduzierbarkeit wurde anhand der Übereinstimmung zwischen den Variablen berechnet, die bei jedem Test untersucht wurden.

Tabelle 4 Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der AML1 Breakapart Probe

Studie zur Reproduzierbarkeit	Probe	Übereinstimmung (%)
Innerhalb des Tages/ an verschiedenen Tagen/ innerhalb des Standorts	Negativ	100
	Stark positiv	100
Innerhalb der Charge	Negativ	100
	Stark positiv	100

#### Klinische Leistung

Die klinische Leistung wurde anhand einer repräsentativen Reihe von 100 konsekutiven Proben ermittelt, die von Patienten entnommen wurden, welche aufgrund von AML oder MDS überwiesen wurden. Die Inzidenzraten der Neuordnungen, die mit der Sonde erkannt wurden, wurden mit denen verglichen, die aus einer Überprüfung der Literaturquellen hervorgingen. Für diesen Vergleich wurde das in der Literatur angegebene Konfidenzintervall für eine Populationsgröße von 100 Stichproben durch Berechnung von 1 - Stichprobenproportionstest mit Kontinuitätskorrektur berechnet.

Tabelle 5 Klinische Leistung der AML1 Breakapart Probe

Neuordnung	Prävalenz			
	Literaturrecherche (%)	95% LCI (%)	Klinische Studie (%)	95% UCL (%)
AML mit RUNX1-Neuordnungen	3,8	1,2	2	10,2

#### Zusätzliche Informationen

Für weitere Produktinformationen wenden Sie sich bitte an den technischen Support von CytoCell.

Tel.: +44 (0)1223 294048

E-Mail: techsupport@cytozell.com

Website: www.ogt.com

#### Referenzen

- Jamil A *et al.* Cancer Genet Cytogenet. 2000;122(2):73-8.
- Swerdlow *et al.* (eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017.
- Reikvam H, *et al.* J Biomed Biotechnol. 2011; 2011:104631.

- Shurtleff *et al.* Leukemia. 1995 Dec;9(12):1985-9.
- Cho *et al.* Korean J Intern Med. 2003 Mar;18(1):13-20.
- De Braekeleer *et al.* Anticancer Research. 2009;29(4):1031-1038.
- Niini T. Haematologica 2000;85(4):362-6.
- Harewood *et al.* Leukemia. 2003 Mar;17(3):547-53.
- Robinson HM *et al.* Leukemia. 2003;17(11):2249-50.
- Arsham MS, Barch MJ and Lawce HJ (eds). (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. Genet Med. 2011;13(7):667-675.
- Wiktor AE, Dyke DLV, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16–23.

#### Symboleinfaden

REF	de: Katalognummer
IVD	de: Medizinprodukt für die <i>in vitro</i> Diagnostik
LOT	de: Chargencode
	de: Gebrauchsanweisung beachten
	de: Hersteller
	de: Verfallsdatum
	de: Temperaturgrenze
	de: Vor Sonnenlicht schützen
	de: Menge reicht für <n> Tests
CONT	de: Inhalt

#### Patente und Warenzeichen

CytoCell ist eine eingetragene Warenzeichen von CytoCell Ltd.

**CytoCell Ltd.**  
Oxford Gene Technology,  
418 Cambridge Science Park,  
Milton Road,  
Cambridge, CB4 0PZ, UK  
Tel.: +44(0)1223 294048  
Fax: +44(0)1223 294986  
E-Mail: probes@cytozell.com  
Website: www.ogt.com

