



A Sysmex Group Company



Návod k použití (IFU)

REF: CE-LPH 013-S / CE-LPH 013

## MLL (KMT2A) Breakapart Probe



POUZE K PROFESIONÁLNÍMU POUŽITÍ



Další informace a více jazyků k dispozici na [ogt.com/IFU](http://ogt.com/IFU)

### Zamýšlený účel

Sonda CytoCell® MLL (KMT2A) Breakapart Probe je kvalitativní, neautomatizovaný, fluorescenční *in situ* hybridizační test (FISH) používaný k detekci chromozomálních přeskupení v oblasti 11q23.3 na chromozomu 11 v hematologicky získaných buněčných suspenzích fixovaných v Carnoyově roztoku (3 : 1 metanol / kyselina octová) od pacientů s potvrzenou nebo předpokládanou akutní myeloidní leukémií (AML), myelodysplastickými syndromy (MDS) nebo akutní lymfoblastickou leukémií (ALL).

### Indikace k použití

Tento prostředek byl vytvořen jako doplněk k dalším klinickým a histopatologickým testům v rámci uznávaných diagnostických postupů a postupů klinické péče v případech, kdy by znalost stavu přeskupení *MLL (KMT2A)* byla důležitá pro klinickou léčbu.

### Omezení

Tento prostředek je navržen tak, aby detekoval přeskupení s body zlomu v oblasti vymezené červenými a zelenými kopiemi v této sadě sond, což zahrnuje gen *MLL (KMT2A)*. Body zlomu mimo tuto oblast nebo variantní přeskupení, plně obsažená v této oblasti, nemusí být tímto prostředkem detekována.

Tento prostředek není určen k použití v rámci samostatné diagnostiky, doprovodné diagnostiky, prenatálního testování, skrínungu populace, testování přímo u pacientů nebo provádění autotestování.

Tento prostředek nebyl validován pro typy vzorků, chorob nebo účely jiné, než ty, které jsou uvedeny v zamýšleném použití.

Je koncipován jako doplněk dalších diagnostických laboratorních testů. Terapeutické postupy nesmí být zahajovány pouze na základě výsledků testů FISH.

Hlášení a interpretace výsledků FISH musejí být prováděny kvalifikovanými pracovníky v souladu s profesionálními standardy praxe a měly by zohledňovat další relevantní výsledky testů, a také klinické a diagnostické informace.

Tento prostředek je určen pouze k laboratornímu profesionálnímu použití.

Nedodržení protokolu může ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům.

### Principy testu

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika umožňující detekovat sekvence DNA na metafázových chromozomech nebo v interfázních jádrech z fixovaných cytogenetických vzorků. Tato technika využívá sondy DNA, které hybridizují na celé chromozomy nebo na jednotlivé jedinečné sekvence, a slouží jako důležitý doplněk cytogenetické analýzy pomocí G-pruhování. Tuto techniku je nyní možno aplikovat jako základní vyšetřovací nástroj při prenatálním a hematologickém vyšetření a při chromozomální analýze solidního tumoru. Po fixování a denaturaci je cílová DNA k dispozici pro reasociaci na podobně denaturovanou, fluorescenčně označenou sondu DNA, která má komplementární sekvenci. Po hybridizaci se nevázaná a nespecificky vázaná DNA sonda odstraní a DNA se barevně označí pro účely vizualizace. Fluorescenční mikroskopie potom umožňuje vizualizaci hybridizované sondy na cílovém materiálu.

### Informace o sondě

Gen *KMT2A* (lysín methyltransferáza 2A) v oblasti 11q23.3 se běžně přeskupuje při akutní leukémii, zejména při leukémii u dětí a při sekundární leukémii, následně po léčbě inhibitory DNA topoizomerázy II<sup>1</sup>.

Gen *KMT2A* má vysokou homologii s genem proteinu drosophila trithorax a kóduje histonovou methyltransferázu, což působí jako epigenetický regulátor transkripce. Translokace *KMT2A* vedou k tvorbě chimerického proteinu, v němž se aminoterminální část *KMT2A* spojí s karboxyterminální částí fúzního partnerského genu. Tento funkční protein má rozhodující roli v embryonálním vývoji a v krvetvorbě<sup>1,2,3,4</sup>.

Přeskupení *KMT2A* je možno detekovat přibližně u 80 % kojenců s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) a u 5–10 % pediatrických a dospělých pacientů s ALL<sup>3,4</sup>. Objevují se také u 60 % případů kojenecké akutní myeloidní leukémie (AML) a u 3 % případů AML de novo a 10 % případů AML spojené s terapií u dospělých<sup>3,5</sup>. Dosud bylo identifikováno více než 70 partnerů, přičemž nejběžnějšími translokacemi jsou *MLL::AFF1*; t(4;11)(q21;q23.3), *MLL::MLLT4*; t(6;11)(q27;q23.3), *MLL::MLLT3*; t(9;11)(p22;q23.3) a *MLL::MLLT1*; t(11;19)(q23.3;p13.3)<sup>1</sup>.

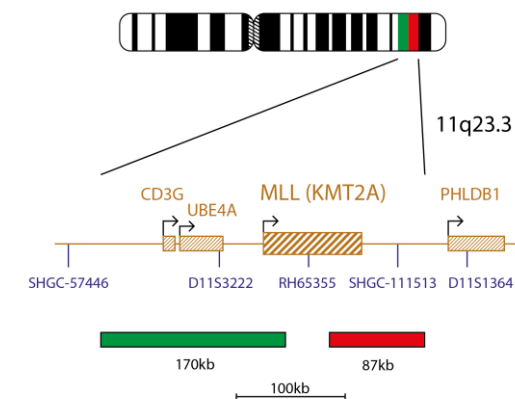
V minulosti bývala přeskupení *KMT2A* u akutní leukémie spojována s horším výsledkem, ale poslední studie ukázaly, že prognóza velmi závisí na fúzním partnerovi a může se lišit u dospělých a u dětí<sup>1</sup>.

### Parametry sondy

MLL, 11q23.3, červená

MLL, 11q23.3, zelená

CMP-H036 v006.00



Produkt *MLL* se skládá ze sondy o délce 87 kb, označené červeně, pokrývající oblast telomerickou ke genu *MLL (KMT2A)*, včetně markeru *SHGC-111513*, a zelené sondy, pokrývající oblast o délce 170 kb centromerickou ke genu *MLL* a zahrnující geny *CD3G* a *UBE4A*.

### Dodaný materiál

**Sonda:** 50 µl v jedné lahvičce (5 testů) nebo 100 µl v jedné lahvičce (10 testů).

Sondy jsou dodávány předem smíchané v hybridizačním roztoku (<65 % formamid; <20 mg dextran sulfátu; <10 % 20× solného roztoku citrátu sodného (SSC)) a jsou připraveny k použití.

**Kontrastní barvivo:** 150 µl v jedné lahvičce (15 testů).

Kontrastním barvivem je DAPI Antifade ES (0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenylinol) v montážním médiu na bázi glycerolu).

### Varování a bezpečnostní pokyny

- Pro diagnostické použití *in vitro*. Výhradně k laboratornímu profesionálnímu použití.
- Směsi v sondách obsahují formamid, což je teratogen; nevdechujte výpary a zamezte kontaktu s pokožkou. Zacházejte s ním opatrně; noste rukavice a laboratorní plášť.
- Zacházejte s DAPI opatrně; noste rukavice a laboratorní plášť.
- Nepoužívejte, pokud jsou lahvičky poškozeny nebo je obsah lahvičky jakkoli znehodnocen.
- Při výběru bezpečné likvidace tohoto produktu se řiďte místními předpisy pro likvidaci ve vaší lokalitě spolu s doporučeními uvedenými v bezpečnostním listu. To platí i pro poškozený obsah testovací sady.
- Všechny použité reagencie a další kontaminované materiály na jedno použití zlikvidujte podle postupů pro infekční nebo potenciálně infekční odpad. Každá laboratoř je odpovědná za nakládání s pevným a kapalným odpadem podle jeho povahy a stupně nebezpečnosti a za jeho zpracování a likvidaci (nebo za zajištění jeho zpracování a likvidace) v souladu s platnými předpisy.
- Pracovníci musí být schopni rozlišit červenou, modrou a zelenou barvu.
- Nedodržení předepsaného protokolu a reagencií může ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům.
- Sonda se nesmí fedit ani míchat s jinými sondami.
- Není-li během kroku predenaturace v rámci protokolu použito 10 µl sondy, může to ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním/negativním výsledkům.
- Všechny produkty by měly být před použitím validovány.

12. Interní kontroly by měly být prováděny pomocí nedotčených buněčných populací v testovacích vzorcích.

#### Definice teploty

- -20 °C / zmražené / v mrazničce: -25 °C až -15 °C
- 37 °C: +37 °C ± 1 °C
- 72 °C: +72 °C ± 1 °C
- 75 °C: +75 °C ± 1 °C
- Pokojová teplota (RT): +15 °C až +25 °C

#### Uchovávání a manipulace

Sadu je třeba uchovávat v mrazničce při teplotách -25 °C až -15 °C až do data expirace, uvedeného na štítku sady. Sonda a lahvičky s kontrastními barvivy musí být uloženy v temnu.



Sonda FISH, kontrastní barvivo DAPI Antifade ES a hybridizační roztok zůstávají při běžném používání stabilní po celou dobu cyklů zmrazování a rozmrazování (přičemž jeden cyklus představuje vyjmutí lahvičky z mrazničky a její vložení zpět) – 5 cyklů pro 50 µl (5 testů) lahvičku sondy FISH, 10 cyklů pro 100 µl (10 testů) lahvičku sondy FISH a 15 cyklů pro 150 µl (15 testů) lahvičku kontrastního barviva. Je třeba minimalizovat vystavení světlu a pokud možno se mu zcela vyhnout. Složky skladujte v dodané nádobě odolné vůči působení světla. Složky použité a skladované za jiných podmínek, než jaké jsou uvedeny na etiketě, nemusí fungovat podle očekávání a mohou nepříznivě ovlivnit výsledky testu. Je třeba vynaložit veškeré úsilí na omezení expozice světlu a teplotním změnám.

#### Potřebné vybavení a materiál, které nejsou součástí dodávky

Je nutné používat kalibrovaná zařízení:

1. Varná deska (s pevnou plotnou a přesným ovládáním teploty do 80 °C)
2. Kalibrované mikropipety s různým objemem a špičkami v rozsahu od 1 µl do 200 µl
3. Vodní lázeň s přesným ovládáním teploty od 37 °C do 72 °C
4. Mikrocentrifugační zkumavky (0,5 ml)
5. Fluorescenční mikroskop (viz oddíl Doporučení ohledně fluorescenčního mikroskopu)
6. Mikroskop s fázovým kontrastem
7. Čisté plastové, keramické nebo skleněné (z ohnivzdorného skla) lahvičky typu „coplin“
8. Chirurgické kleště
9. Kalibrovaný pH metr (nebo pH indikační proužky schopné měřit pH v rozmezí 6,5–8,0)
10. Vlhčená nádoba
11. Imerzní olej na objektiv fluorescenčního mikroskopu
12. Stolní odstředivka
13. Mikroskopová sklička
14. Krycí sklička 24 × 24 mm
15. Stopky
16. Inkubátor 37 °C
17. Lepidlo na bázi kaučukového roztoku
18. Vířivý mixér
19. Odměrné válce
20. Magnetická míchačka
21. Kalibrovaný teploměr

#### Volitelné vybavení, které není součástí dodávky

1. Cytogenetická sušicí komora

#### Potřebné reagentie, které nejsou součástí dodávky

1. 20× fyziologický roztok citrátu sodného (SSC)
2. 100 % etanol
3. Tween-20
4. 1M hydroxid sodný (NaOH)
5. 1M kyselina chlorovodíková (HCl)
6. Demineralizovaná voda

#### Doporučení ohledně fluorescenčního mikroskopu

Pro optimální vizualizaci použijte 100wattovou rtuťovou lampu nebo její ekvivalent a apochromatické objektivy 60/63× nebo 100× s imerzním olejem. Fluorofory použité v této sadě sondy budou excitovat a emitovat při následujících vlnových délkách:

| Fluorofor | Excitace <sub>max</sub><br>[nm] | Emise <sub>max</sub><br>[nm] |
|-----------|---------------------------------|------------------------------|
| Zelená    | 495                             | 521                          |
| Červená   | 596                             | 615                          |

Zajistěte, aby byl mikroskop vybaven příslušnými excitačními a emisními filtry, které pokrývají výše uvedené vlnové délky. Pro optimální simultánní vizualizaci zelených a červených fluoroforů použijte třípásmový DAPI/zelený/červený filtr nebo dvoupásmový zelený/červený filtr.

Před použitím zkontrolujte správnou funkci fluorescenčního mikroskopu. Použijte imerzní olej vhodný pro fluorescenční mikroskopy připravený pro nízkou autofluorescenci. Dbejte na to, aby nedošlo ke smíchání barviva DAPI antifade s imerzním olejem do mikroskopu, protože by tak došlo k zastínění signálů. Dodržujte doporučení výrobce týkající se životnosti lampy a stářích filtrů.

#### Příprava vzorků

Sada je určena k použití u hematologicky získaných buněčných suspenzí fixovaných v Carnoyově fixačním roztoku (3 : 1 metanol / kyselina octová) od pacientů s potvrzenou nebo předpokládanou akutní myeloidní leukémií (AML), myelodysplastickými syndromy (MDS) nebo akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), které jsou připraveny v souladu s pokyny laboratoře nebo zdravotnického zařízení. Na mikroskopová sklička naneste vzorky usušené na vzduchu v souladu se standardními cytogenetickými postupy. *Cytogenetics Laboratory Manual* AGT (Příručka pro cytogenetické laboratoře) obsahuje doporučení pro odběr, kultivaci a získávání vzorků a pro přípravu sklíček<sup>6</sup>.

#### Příprava roztoků

##### Etanolové roztoky

Rozřeďte 100 % etanol demineralizovanou vodou v následujících poměrech a řádně promíchejte:

- 70 % etanol – 7 dílů 100 % etanolu na 3 díly demineralizované vody
  - 85 % etanol – 8,5 dílů 100 % etanolu na 1,5 díly demineralizované vody
- Roztoky skladujte až 6 měsíců při pokojové teplotě ve vzduchotěsné nádobě.

##### Roztok 2×SSC

Zřeďte 1 díl roztoku 20×SSC 9 díly demineralizované vody a řádně promíchejte. Zkontrolujte pH a pomocí NaOH nebo HCl podle potřeby upravte na pH 7,0. Roztok skladujte ve vzduchotěsné nádobě při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů.

##### Roztok 0,4×SSC

Zřeďte 1 díl roztoku 20×SSC 49 díly demineralizované vody a řádně promíchejte. Zkontrolujte pH a pomocí NaOH nebo HCl podle potřeby upravte na pH 7,0. Roztok skladujte ve vzduchotěsné nádobě při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů.

##### Roztok 2×SSC, 0,05 % roztok Tween-20

Zřeďte 1 díl roztoku 20×SSC 9 díly demineralizované vody. Na 10 ml přidejte 5 µl roztoku Tween-20 a řádně promíchejte. Zkontrolujte pH a pomocí NaOH nebo HCl podle potřeby upravte na pH 7,0. Roztok skladujte ve vzduchotěsné nádobě při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů.

#### Protokol FISH

(Poznámka: Dbejte na to, aby vždy byla omezena expozice sondy a kontrastních barviv vůči osvětlení v laboratoři).

#### Příprava sklička

1. Naneste buněčný vzorek na mikroskopové skličko. Nechte ho uschnout. **(Volitelně při použití cytogenetické sušicí komory:** K optimálnímu nanesení buněčných vzorků by měla komora pracovat při teplotě přibližně 25 °C a 50 % vlhkosti. Pokud cytogenetickou sušicí komoru nemáte, použijte jako alternativu digestoř.)
2. Skličko ponořte na 2 minuty do roztoku 2×SSC při pokojové teplotě. Neprotřepávejte.
3. Dehydratujte pomocí etanolové série (70 %, 85 % a 100 %), vždy po dobu 2 minut při pokojové teplotě.
4. Nechte ho uschnout.

#### Predenaturace

5. Vyjměte sondu z mrazničky a nechejte ji zahřát na pokojovou teplotu. Laboratorní lahvičky před použitím krátce odstředte.
6. Dbejte, aby byl roztok sondy rovnoměrně promíchán pipetou.
7. Na každý test odeberte 10 µl sondy a přeneste ji do mikrocentrifugační zkumavky. Zbytek sondy vraťte rychle do mrazničky.
8. Sondu a skličko se vzorkem umístěte na varnou desku a předehevívejte po dobu 5 minut při teplotě 37 °C (+/- 1 °C).
9. Kápněte 10 µl směsi sondy na buněčný vzorek a opatrně jej překryjte krycím sklíčkem. Neprodyšně uzavřete pomocí lepidla na bázi kaučukového roztoku a nechejte lepidlo úplně uschnout.

#### Denaturace

10. Zahříváním sklička na varné desce po dobu 2 minut při teplotě 75 °C (+/- 1 °C) vzorek a sondu souběžně denaturujte.

#### Hybridizace

11. Skličko uložte na noc do vlhké neprůsvitné nádoby při teplotě 37 °C (+/- 1 °C).

#### Post-hybridizační vymývání

12. Vyjměte DAPI z mrazničky a nechejte ho zahřát na pokojovou teplotu.
13. Opatrně sejměte krycí skličko a odstraňte všechny zbytky lepidla.
14. Skličko ponořte na 2 minuty do roztoku 0,4×SSC (pH 7,0) při teplotě 72 °C (+/- 1 °C). Neprotřepávejte.
15. Skličko osušte a na 30 sekund ponořte do roztoku 2×SSC, 0,05 % Tween-20 při pokojové teplotě (pH 7,0). Neprotřepávejte.
16. Skličko osušte a na každý vzorek naneste 10 µl DAPI antifade.
17. Přikryjte krycím sklíčkem, odstraňte veškeré bubliny, uložte do temna a po dobu 10 minut nechejte vyvíjet barvu.
18. Zkontrolujte pomocí fluorescenčního mikroskopu (viz **Doporučení ohledně fluorescenčního mikroskopu**).

#### Doporučení pro zpracování

1. Vypalování nebo stárnutí sklíček může redukovat fluorescenční signál.
2. Podmínky hybridizace mohou být nepříznivě ovlivněny použitím reagentií, které nedodává nebo nedoporučuje společnost Cytocell Ltd.
3. K měření teplot roztoků, vodních lázní a inkubátorů používejte kalibrovaný teploměr, protože tyto teploty jsou velmi důležité k zajištění optimální funkce produktu.

- Koncentrace promývacího roztoku, pH a teplota jsou důležité, protože nedostatečná důslednost může vést k nespecifickému vázání sondy a přílišná důslednost naopak k nedostatečnému signálu.
- Neúplná denaturace může vést k nedostatečnému signálu a příliš dlouhá denaturace může rovněž způsobit nespecifické vázání.
- Nadměrná hybridizace může vést k dodatečným nebo neočekávaným signálům.
- Uživatelé musejí před použitím testu pro diagnostické účely optimalizovat protokol pro své vlastní vzorky.
- Neoptimální podmínky mohou vést k nespecifickému vázání, které může být nesprávně interpretováno jako signál sondy.

#### Interpretace výsledků

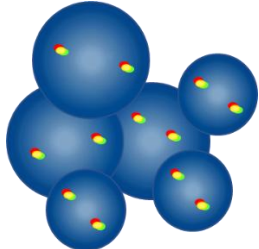
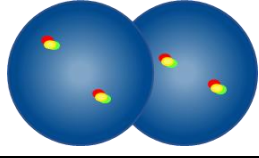
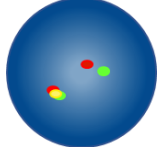
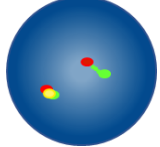
##### Vyhodnocení kvality sklíčka

Sklíčko by se nemělo analyzovat, jestliže:

- jsou signály příliš slabé a nelze je proto analyzovat jednoduchými filtry – pro pokračování v analýze musejí být signály jasné, výrazné a snadno hodnotitelné;
- analýze brání velký počet shluků buněk nebo překrývajících se buněk;
- nebylo hybridizováno >50 % buněk;
- mezi buňkami se nachází příliš mnoho fluorescenčních částic a/nebo fluorescenčního zákalu, který ruší signály – u optimálních sklíček by mělo být pozadí tmavé nebo černé a čiré;
- není možné rozlišit hranice buněčných jader a hranice nejsou nepoškozené.

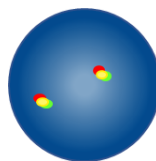
##### Pokyny pro analýzu

- Každý vzorek musí analyzovat a vyhodnotit dva analytici. Jakékoliv nesrovnalosti se musí vyřešit hodnocením třetího analytika.
- Všichni analytici musí mít odpovídající kvalifikaci v souladu s uznávanými národními standardy.
- Všichni analytici musí provést nezávislé hodnocení 100 jader každého vzorku. První analytik musí začít provádět analýzu z levé strany sklíčka a druhý analytik z pravé strany.
- Každý analytik musí zdokumentovat své výsledky na samostatných listech.
- Analyzujte pouze nepoškozená jádra, nikoli překrývající se nebo nahromaděná jádra ani jádra překrytá cytoplazmatickým odpadem či jádra s vysokým stupněm autofluorescence.
- Vyhnete se místům, kde je příliš mnoho cytoplazmatického odpadu nebo kde se vyskytuje nespecifická hybridizace.
- Intenzita signálu se může lišit, dokonce i v rámci jediného jádra. V takových případech použijte jednoduché filtry a/nebo upravte ohniskovou rovinu.
- Za neoptimálních podmínek se mohou signály jevit jako rozptýlené. Jestliže se dva signály stejné barvy vzájemně dotýkají, nebo je mezi nimi vzdálenost menší než dvě šířky signálů, nebo pokud dva signály spojuje slabý pruh, počítejte je jako jeden signál.
- Pokud při analýze dvoubarevných zlomových sond není mezera mezi červeným a zeleným signálem větší než 2 šířky signálu, počítejte to jako nepřeskupený/fúzní signál.
- Pokud si nejste jisti, zda lze buňku analyzovat či nikoli, analýzu neprovádějte.

| Pokyny pro analýzu                                                                  |                                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | Nepočítejte – jádra jsou příliš těsně u sebe, takže není možno určit hranice                              |
|  | Nepočítejte překrývající se jádra – všechny oblasti obou jader nejsou viditelné                           |
|  | Počítejte jako dva fúzní signály – mezera mezi červeným a zeleným signálem je menší než dvě šířky signálu |
|  | Počítejte jako dva fúzní signály – jeden fúzní signál je difúzní                                          |

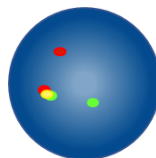
#### Předpokládané výsledky

##### Předpokládaný vzorec normálního signálu



U normální buňky se předpokládají dva červené/zelené fúzní signály (2F).

##### Předpokládaný vzorec abnormálního signálu



V buňce s vyváženým přeskupením *MLL (KMT2A)* bude mít předpokládaný vzorec signálu jeden červený signál, jeden zelený signál a jednu červenou/zelenou fúzi (1F1C1Z).

U aneuploidních/nevyvážených vzorků jsou možné jiné vzory signálů.

#### Známé relevantní interference / interferující látky

Nejsou známy žádné relevantní interference / interferující látky.

#### Známá zkřížená reaktivita

Zkřížená reaktivita není známa.

#### Hlášení závažných událostí

Pro pacienta / uživatele / třetí stranu v Evropské unii a v zemích se shodným regulačním režimem (nařízení (EU) 2017/746 o diagnostických zdravotnických prostředcích *in vitro*); pokud během používání tohoto prostředku nebo v důsledku jeho používání došlo k závažné události, nahláste ji výrobci a svému příslušnému národnímu orgánu.

Pokud došlo k závažnému událostem v jiných zemích, nahláste je prosím výrobci a případně svému příslušnému národnímu orgánu.

Kontaktní osoba pro vigilanci výrobce: [vigilance@oqt.com](mailto:vigilance@oqt.com)

Pro příslušné národní orgány v EU je seznam kontaktních míst pro vigilanci k dispozici na adrese:

[https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts\\_en](https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en)

#### Specifické funkční charakteristiky

##### Analytická specifita

Analytická specifita je procento signálů, které hybridizují do správného lokusu a na žádné jiné místo. Analytická specifita byla stanovena analýzou celkem 200 cílových lokusů. Byly analyzovány 2 chromozomální lokusy v každé z 20 metafázových buněk z 5 vzorků, což znamená celkem 200 datových bodů. Analytická specifita byla vypočtena jako počet signálů FISH, které hybridizovaly na správný lokus, děleno celkovým počtem hybridizovaných signálů FISH.

Analytická specifita jednotlivých sond v sadě byla vypočtena jako počet signálů FISH metafázového chromozomu hybridizovaných na správný lokus vydělený celkovým počtem hybridizovaných FISH signálů metafázového chromozomu, tento výsledek byl vynásoben číslem 100 a vyjádřen jako procento s intervalem spolehlivosti 95 %.

Tabulka 1. Analytická specifita sondy *MLL (KMT2A) Breakapart Probe*

| Sonda                | Cíl     | Počet hybridizovaných metafázových chromozomů | Počet správně hybridizovaných lokusů | Analytická specifita (%) | Interval spolehlivosti 95 % (%) |
|----------------------|---------|-----------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| MLL Distal, červená  | 11q23.3 | 200                                           | 200                                  | 100                      | 98,12–100                       |
| MLL Proximal, zelená | 11q23.3 | 200                                           | 200                                  | 100                      | 98,12–100                       |

##### Analytická citlivost

Analytická citlivost je procento započitatelných interfázových buněk s předpokládaným vzorcem normálního signálu. U každé z 25 suspenzí buněk kostní dřeně fixovaných Carnoyovým roztokem, které byly považovány za karyotypově normální, bylo analyzováno minimálně 200 interfázových buněk, což pro každý typ vzorku znamenalo minimálně 5 000 hodnocených jader. Byly analyzovány údaje o citlivosti na základě procenta buněk vykazujících normální předpokládaný signální vzorec, a byly vyjádřeny jako procento s 95 % intervalem spolehlivosti.

Tabulka 2. Analytická citlivost sondy MLL (KMT2A) Breakapart Probe

| Počet buněk s předpokládanými vzorci signálu | Celkový počet buněk se započítatelnými signály | Analytická citlivost (%) | Interval spolehlivosti 95 % (%) |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| 4965                                         | 5000                                           | 99,3                     | 99,08–99,52                     |

Charakteristika normálních mezních hodnot

Normální mezní hodnota ve spojení se sondami FISH je maximální procento započítatelných interfázních buněk se specifickým abnormálním signálovým vzorem, při kterém se vzorek považuje pro tento signálový vzor za normální.

Normální mezní hodnota byla stanovena pomocí vzorků negativních na přeskupení, které má sonda detekovat, a beta inverzní funkce. U každého vzorku byly dvěma nezávislými analytiky zaznamenány vzorce signálů 100 interfázních jader, celkem 200 jader v každém vzorku.

Mezní hodnota byla určena pomocí funkce  $\beta$ -inverze (BETAINV) v MS Excel. Byla vypočtena jako procento interfázních buněk vykazujících falešné pozitivní signální vzorec pomocí horní hranice jednostranného 95 % intervalu spolehlivosti binomického rozdělení u vzorku normálního pacienta.

Tabulka 3. Charakteristika normálních mezních hodnot MLL (KMT2A) Breakapart Probe

| Vzorec abnormálního signálu | Počet vzorků analyzovaných pro stanovení mezních hodnot | Počet jader vyhodnocených u jednotlivých vzorků | Maximální počet falešně pozitivních vzorců signálu | Normální mezní hodnota (%) |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------|
| 1C1Z1F                      | 1600                                                    | 200                                             | 3                                                  | 3,8                        |

Laboratoře si musí ověřit mezní hodnoty pomocí vlastních dat.<sup>7,8</sup>

Reprodukovatelnost

Byly provedeny studie reprodukovatelnosti za účelem zjištění:

- reprodukovatelnosti na 3 pracovištích v rámci jednoho dne (mezi vzorky),
- reprodukovatelnosti na 3 pracovištích v rámci různých dnů (mezi dny),
- reprodukovatelnosti na 3 pracovištích v rámci různých pracovišť (mezi pracovišti),
- reprodukovatelnosti na jednom pracovišti v rámci různých šarží (mezi šaržemi).

Reprodukovatelnost byla stanovena třemi nezávislými laboratořemi, které testovaly šest zaslepených vzorků (dva negativní na přeskupení, dva vzorky s nízkou pozitivitou, které odpovídaly 1–3násobku mezní hodnoty, a dva vysoce pozitivní vzorky, které obsahovaly více než 45 % buněk pozitivních na přeskupení). Analýza byla provedena pomocí dvou opakovaní jednotlivých vzorků v průběhu pěti dnů, které nenásledovaly po sobě.

Všechny tři laboratoře prováděly testování v rámci stejného dne, v rámci různých dnů a v rámci různých laboratoří s použitím stejné šarže sondy, přičemž jedna z laboratoří také provedla testování reprodukovatelnosti v rámci různých šarží, kdy použila tři různé šarže sondy. Reprodukovatelnost byla stanovena na základě shody mezi různými proměnnými zkoumanými při jednotlivých testech.

Tabulka 4. Reprodukovatelnost sondy MLL (KMT2A) Breakapart Probe

| Studie reprodukovatelnosti                             | Vzorek                                   | Shoda (%) |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------|
| V rámci jednoho dne / různých dnů / různých laboratoří | 90 % shoda negativní klasifikace         | 100 %     |
|                                                        | 95 % shoda klasifikace vysoké positivity | 100 %     |
| V rámci různých šarží                                  | 90 % shoda negativní klasifikace         | 100 %     |
|                                                        | 95 % shoda klasifikace vysoké positivity | 100 %     |

Klinická funkce

Aby bylo zajištěno, že produkt detekuje zamýšlená přeskupení, byla stanovena klinická funkce v průběhu tří retrospektivních studií provedených na externích testovacích pracovištích. Studie zahrnovaly kombinovaný soubor čtyř set osmdesáti osmi (488) vzorků s osmnácti (18) pozitivními a čtyřmi sty sedmdesáti (470) negativními vzorky ve všech laboratořích. Pozitivita každého vzorku byla potvrzena buď pomocí srovnávací komerční sondy uváděné na trh konkurenčním výrobcem, která detekuje stejné abnormality jako hodnocené sondy, nebo porovnáním s karyotypem G-pruhování.

Výsledky těchto testů byly analyzovány, aby poskytly hodnoty klinické citlivosti, klinické specifity a míru falešné positivity (FPR) pozitivních signálů pomocí jednodimenzního přístupu.

Tabulka 5. Klinická funkce MLL (KMT2A) Breakapart Probe

| Variabilní                                           | Výsledek |
|------------------------------------------------------|----------|
| Klinická senzitivita (míra skutečné positivity, TPR) | 99,93 %  |
| Klinická specifita (míra skutečné negativity, TNR)   | 99,97 %  |
| Míra falešné positivity (FPR) = 1–specifičnost       | 0,03 %   |

Souhrn bezpečnosti a funkce (SSP)

SSP je zpřístupněn veřejnosti prostřednictvím evropské databáze zdravotnických prostředků (Eudamed), kde je propojen se základním UDI-DI. Eudamed URL: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> Základní UDI-DI: 50558449LPH013J8

Pokud není systém Eudamed plně funkční, musí být SSP zpřístupněn veřejnosti na základě žádosti zasláné e-mailem na adresu [SSP@ogt.com](mailto:SSP@ogt.com).

Další informace

Další informace o produktu vám sdělí oddělení technické podpory společnosti CytoCell.  
T: +44 (0)1223 294048  
E: [techsupport@cytoCELL.com](mailto:techsupport@cytoCELL.com)  
W: [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

Reference

1. Tamai, Inokuchi, J Clin Exp Hematopathol 2010;50(2):91-98
2. Wright, Vaughan, Critical Reviews in Oncology/Hematology 2014;91(3):283-291
3. Van der Burg et al., Leukemia 2004;18(5):895-908
4. Tomizawa, Pediatr Int 2015;57(8):811-819
5. Grossman et al., Leukemia 28 March 2013; doi10.1038/leu.2013.90
6. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
7. 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.
8. 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.

Slovníček symbolů

| EN ISO 15223-1:2021—„Zdravotnické prostředky—Symboly, které se budou používat s informacemi, dodá výrobce— Část 1: Všeobecné požadavky“<br>(© International Organization for Standardization (Mezinárodní organizace pro normalizaci)) |                                                                    |                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Symbol                                                                                                                                                                                                                                 | Název                                                              | Referenční číslo/čísla |
|                                                                                                                                                    | cs: Výrobce                                                        | 5.1.1                  |
|                                                                                                                                                    | cs: Zplnomocněný zástupce v Evropském společenství / Evropské unii | 5.2.1                  |
|                                                                                                                                                     | cs: Datum spotřeby                                                 | 5.4.1                  |
|                                                                                                                                                    | cs: Kód šarže                                                      | 5.5.1                  |
|                                                                                                                                                    | cs: Katalogové číslo                                               | 5.6.1                  |
|                                                                                                                                                    | cs: Chraňte před slunečním světlem                                 | 5.3.2                  |
|                                                                                                                                                     | cs: Omezení teploty                                                | 5.3.7                  |
|                                                                                                                                                    | cs: Viz návod k použití                                            | 5.4.3                  |
|                                                                                                                                                    | cs: Přečtěte si elektronický návod k použití                       | 5.4.3                  |
|                                                                                                                                                     | cs: Upozornění                                                     | 5.4.4                  |
|                                                                                                                                                    | cs: In vitro zdravotnický diagnostický prostředek                  | 5.5.1                  |

|                                                                                   |                                                           |                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------|
|   | <b>cs:</b> Množství<br>dostačuje k<br>provedení <n> testů | 5.5.5                         |
|  | <b>cs:</b> Jedinečný<br>identifikátor<br>prostředku       | 5.7.10                        |
| <b>Symbols EDMA pro IVD reagencie a složky, revize říjen 2009</b>                 |                                                           |                               |
| <b>Symbol</b>                                                                     | <b>Název</b>                                              | <b>Referenční číslo/čísla</b> |
|  | <b>cs:</b> Obsah (nebo<br>obsahuje)                       | N/A                           |

#### Patenty a ochranné známky

CytoCell je registrovaná ochranná známka společnosti CytoCell Limited.



#### **Cytocell Limited**

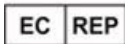
Oxford Gene Technology  
418 Cambridge Science Park  
Milton Road  
CAMBRIDGE  
CB4 0PZ  
SPOJENÉ KRÁLOVSTVÍ

T: +44 (0)1223 294048

F: +44 (0)1223 294986

E: [probes@cytoCell.com](mailto:probes@cytoCell.com)

W: [www.ogt.com](http://www.ogt.com)



#### **Sysmex Europe SE**

Bornbarch 1  
22848 Norderstedt  
NĚMECKO

T: +49 40 527260

W: [www.sysmex-europe.com](http://www.sysmex-europe.com)

#### Historie verzí IFU

V001.00 2023-01-11: Nový IFU z důvodu nařízení (EU) 2017/746

V002 2025-08-29: Odstranění značky UKCA.