



A Sysmex Group Company



### Anwendungshinweise

REF: LPH 089 / LPH 089-S

### CBFB Breakapart Probe



NUR FÜR DEN PROFESSIONELLEN GEBRAUCH



www.cytocell.com

Weitere Informationen und andere Sprachen erhältlich unter

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

#### Verwendungszweck

Die CytoCell® CBFB Breakapart Probe ist ein hochwertiger, nicht automatisierter Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungstest (FISH) zum Nachweis von chromosomalen Neuaneordnungen in der Region 16q22 auf Chromosom 16 in mit Carnoy'scher Lösung (3:1 Methanol/Essigsäure) fixierten, hämatologisch gewonnenen Zellsuspensionen von Patienten mit bestätigter oder vermuteter akuter myeloischer Leukämie (AML).

#### Indikationen

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

#### Einschränkungen

Dieses Produkt wurde entwickelt, um Neuaneordnungen mit Bruchstellen in der Region zu erkennen, die durch die roten und grünen Klone in diesem Sondenstreckensatz gebunden wird, dazu gehört auch das *CBFB* Gen. Bruchstellen außerhalb dieser Region oder abweichende Neuaneordnungen, die komplett in dieser Region enthalten sind, können mit diesem Produkt nicht erkannt werden.

Dieses Produkt ist nicht für die eigenständige Diagnostik, Begleitdiagnostik, Pränataldiagnostik, das populationsbasierte Screening, stationäre Untersuchungen oder Selbsttests geeignet.

Dieses Produkt wurde nicht für andere Probenotypen, Krankheiten oder Zwecke als die im Verwendungszweck angegebenen validiert.

Es ist als Ergänzung zu anderen diagnostischen Labortests gedacht und es sollten nicht allein aufgrund des FISH-Ergebnisses therapeutische Maßnahmen eingeleitet werden.

Die Meldung und Auslegung der FISH-Ergebnisse sollte von entsprechend qualifiziertem Fachpersonal durchgeführt werden, den professionellen Praxisstandards entsprechen und weitere Testergebnisse sowie klinische und diagnostische Informationen berücksichtigen.

Dieses Produkt ist nur für den professionellen Gebrauch im Labor bestimmt.

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

#### 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, fluoreszierende 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 Probenmaterial visualisiert.

#### Informationen zur Sonde

Das CBFB-Gen (core-binding factor subunit beta) befindet sich auf 16q22 und ist am häufigsten aufgrund der Inversion  $inv(16)(p13.11q22.1)$  oder der Translokation  $t(16;16)(p13.11;q22.1)$  neu angeordnet. In seltenen Fällen wurde über Translokationen von 16q22 mit verschiedenen anderen Genpartnern berichtet, während auch eine Deletion der Region 16q22 gemeldet wurde<sup>1</sup>.

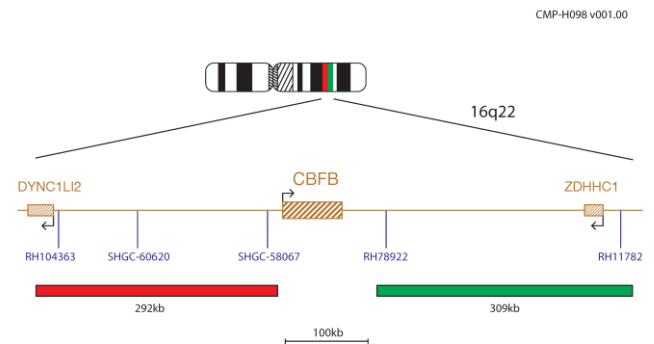
Bei der akuten myeloischen Leukämie mit  $inv(16)(p13.11q22.1)$  oder  $t(16;16)(p13.11;q22.1)$  handelt es sich laut Klassifikationskriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für myeloische Neoplasien und akute Leukämien um eine eigenständige Erkrankung.<sup>2</sup> Diese Neuaneordnungen finden sich häufig bei Patienten mit myelomonozytischem Subtyp mit erhöhten Knochenmark-Eosinophilen, früher bezeichnet als AML FAB (Französisch-Amerikanisch-Britische Klassifizierung) Typ M4Eo, und treten in etwa 5-8 %<sup>2</sup> aller AML-Fälle auf. Fälle von therapiebedingter AML können diese Neuaneordnung ebenfalls aufweisen<sup>2,3</sup>.

Die Inversion  $inv(16)(p13.11q22.1)$  oder Translokation  $t(16;16)(p13.11;q22.1)$  führt zu Neuaneordnungen des CBFB-MYH11-Gens und gilt bei Patienten mit AML als günstige zytogenetische Risikogruppe<sup>4,5,6</sup>.

Sowohl bei der Inversion  $inv(16)(p13.11q22.1)$  als auch bei der Translokation  $t(16;16)(p13.11;q22.1)$  treten diese Bruchstellen in Intron 5 des CBFB und Intron 5 des MYH11 auf. Der N-Terminus des CBFB fusioniert mit dem C-Terminus von MYH11 und dessen Multimerisierungsdomäne. Das daraus resultierende chimäre Protein reduziert die Menge an aktiver CBF. Außerdem kommt es zu einer Akkumulation von CBFB-MYH11/CBFA-Multimeren im Kern. CBFB reguliert die Expression bestimmter ADP-Ribosylierungsfaktoren (AFRs) und anderer Tumorsuppressorgene (TSGs), daher geht man davon aus, dass das Fusionsprotein die TSG-Expression unterdrückt<sup>4</sup>. Es hat sich gezeigt, dass dieses Fusionsprotein für die Leukämogenese notwendig, jedoch nicht allein ausreichend ist. Fortlaufende Studien arbeiten daran herauszufinden, wie das Protein offenbar mit RUNX1 zusammenarbeitet, um Zellproliferation und die Blockierung der Zelldifferenzierung zu vermitteln, die für die Entwicklung der Leukämie erforderlich sind<sup>7,8</sup>.

#### Spezifikation der Sonde

CBFB, 16q22, Rot  
CBFB, 16q22, Grün



Der CBFB Breakapart Probe-Mix besteht aus zwei verschiedenen Sonden. Die rote Sonde (292kb) befindet sich centromerisch vom CBFB-Gen und erstreckt sich über den Marker RH104363 hinaus, um einen Teil des DYNC1LI2-Gens abzudecken, und umfasst die Marker SHGC-60620 und SHGC-58067. Die grüne Sonde (309kb) befindet sich telomerisch vom CBFB-Gen und erstreckt sich durch den Marker RH78922 über das ZDHHC1-Gen hinaus bis zu einer Region, die sich telomerisch vom Marker RH11782 befindet.

#### Im Lieferumfang enthaltene Materialien

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

Die Sonden werden in Hybridisierungslösung (Formamid, Dextransulfat, Salznatriumcitrat (SSC)) bereitgestellt und sind gebrauchsfertig.

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

Für die Gegenfärbung wird DAPI Antifade ES (0,125 µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) in Glycerin-basiertem Einbettungsmittel) verwendet.

#### Warn- und Sicherheitshinweise


1. Nur für den Einsatz in der *In-vitro*-Diagnostik. Nur für den professionellen Gebrauch im Labor.
2. 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.
3. DAPI ist ein potentiell Karzinogen. Gehen Sie vorsichtig vor; tragen Sie Handschuhe und einen Laborkittel.
4. Nicht verwenden, wenn die Ampulle(n) beschädigt ist/sind oder der Inhalt der Ampulle in irgendeiner Weise beeinträchtigt ist.
5. Hinweise zur sicheren Entsorgung dieses Produkts finden Sie in den für Ihren Standort geltenden örtlichen Entsorgungsvorschriften sowie den Empfehlungen im Sicherheitsdatenblatt. Dies gilt auch für beschädigte Inhalte von Testkits.
6. Entsorgen Sie alle gebrauchten Reagenzien und alle anderen kontaminierten Einwegmaterialien gemäß den Verfahren für infektiösen oder potenziell infektiösen Abfall. Es liegt in der Verantwortung jedes Labors, feste und flüssige Abfälle entsprechend ihrer Art und Gefährlichkeit zu behandeln und zu entsorgen (oder behandeln und entsorgen zu lassen), und zwar in Übereinstimmung mit den geltenden Vorschriften.

- Die Nutzer müssen in der Lage sein, zwischen den Farben Rot, Blau und Grün zu unterscheiden.
- Die Nichteinhaltung des vorgegebenen Protokolls oder die Nichtnutzung der Reagenzien kann sich nachteilig auf die Leistung auswirken und zu falsch positiven/negativen Ergebnissen führen.
- Die Sondenflüssigkeit sollte nicht verdünnt oder mit anderen Sondenflüssigkeiten gemischt werden.
- Werden während der Prä-Denaturierungsphase nicht 10 µl der Sonde benutzt, so kann sich das nachteilig auf die Leistung auswirken und zu falsch positiven/negativen Ergebnissen führen.
- Alle Produkte sind vor dem Gebrauch zu validieren.
- Es sollten interne Kontrollen an den nicht betroffenen Zellpopulationen der Testproben durchgeführt werden.

#### Temperaturdefinitionen

- 20 °C / Gefroren / Im Gefrierschrank: -25 °C bis -15 °C
- 37 °C: +37 °C ± 1 °C
- 72 °C: +72 °C ± 1 °C
- 75 °C: +75 °C ± 1 °C
- Raumtemperatur (RT): +15 °C bis +25 °C

#### Lagerung und Handhabung

 Das Kit sollte bei einer Temperatur von -25 °C bis -15 °C im Gefrierschrank bis zu dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum gelagert werden. Die Sonde und die Ampullen mit der Gegenfärbung sind im Dunkeln zu lagern.



Die FISH-Sonde, die DAPI Antifade ES Gegenfärbung und die Hybridisierungslösung bleiben 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). Die Lichteinstrahlung sollte minimiert und wenn möglich vermieden werden. Lagern Sie die Komponenten in dem mitgelieferten lichtdichten Behälter. Komponenten, die unter anderen als den auf dem Etikett angegebenen Bedingungen verwendet und gelagert werden, funktionieren möglicherweise nicht wie erwartet und können die Testergebnisse negativ beeinflussen. 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:

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

#### Optionale Ausrüstung, die nicht zum Lieferumfang gehört

- Zytogenetische Trocknungskammer

#### Benötigte Reagenzien, die nicht zum Lieferumfang gehören

- 20x Kochsalz-Natrumcitrat (SSC)-Lösung
- 100 % Ethanol
- Tween-20
- 1M Natriumhydroxid (NaOH)
- 1M Salzsäure (HCl)
- 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 Sondenstet 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-Immersionöl, da dadurch die Signale verdeckt werden können. Befolgen Sie hinsichtlich der Lebensdauer der Lampe und der Anwendungsdauer 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>9</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

- Leuchten Sie die Zellprobe auf einem Objektträger aus Glas aus. Lassen Sie den Objektträger trocknen. (Optional, falls eine zytogenetische Trockenkammer verwendet wird: 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).
- Tauchen Sie den Objektträger 2 Minuten lang bei Raumtemperatur (RT) in 2x SSC, ohne die Lösung dabei zu schütteln.
- In einer Ethanolserie (70 %, 85 % und 100 %) jeweils 2 Minuten bei RT dehydrieren.
- Lassen Sie den Objektträger trocknen.

#### Prä-Denaturierung

- Entnehmen Sie die Sonde aus dem Gefrierschrank und erwärmen Sie diese auf RT. Die Röhrchen vor dem Gebrauch kurz zentrifugieren.
- Stellen Sie sicher, dass die Sondenlösung mit einer Pipette gleichmäßig durchgemischt wird.
- Entnehmen Sie jeweils 10 µl Sondenflüssigkeit pro Test und geben Sie diese Menge in ein Mikrozentrifugenröhrchen. Geben Sie die verbleibende Sonde schnell wieder zurück in den Gefrierschrank.
- 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).
- 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

- 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

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

### Spülgänge nach der Hybridisierung

- Entnehmen Sie die DAPI-Lösung aus dem Gefrierschrank und erwärmen Sie diese auf RT.
- Nehmen Sie das Deckglas ab und entfernen Sie vorsichtig etwaige Kleberrückstände.
- 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.
- Den Objektträger abtropfen lassen und bei RT (pH 7,0) 30 Sekunden lang ohne Schütteln in 2x SSC, 0,05 % Tween-20 eintauchen.
- Den Objektträger trocknen lassen und 10 µl DAPI Antifade auf jede Probe aufbringen.
- Ein Deckglas aufsetzen, etwaige Blasen entfernen und 10 Minuten abwarten, während sich die Farbe im Dunkeln entwickelt.
- Unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachten (bitte beachten Sie dazu den Abschnitt „Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop“).

### Empfehlungen zur Vorgehensweise

- Die Ofenbehandlung oder Aushärtung von Objektträgern kann die Signalfluoreszenz reduzieren.
- Die Hybridisierungsbedingungen können beeinträchtigt werden, wenn andere Reagenzien als die verwendet werden, die durch Cytocell Ltd. zur Verfügung gestellt oder empfohlen werden.
- 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.
- 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.
- Eine unvollständige Denaturierung kann zu einem fehlenden Signal führen, eine übermäßige Denaturierung dagegen auch zu unspezifischer Bindung.
- Eine übermäßige Hybridisierung kann zu zusätzlichen oder unerwarteten Signalen führen.
- Anwender sollten das Protokoll für ihre eigenen Proben optimieren, bevor sie den Test für diagnostische Zwecke einsetzen.
- Suboptimale Bedingungen können zu einer unspezifischen Bindung führen, die fälschlicherweise als Sondersignal interpretiert werden kann.

### Auswertung der Ergebnisse

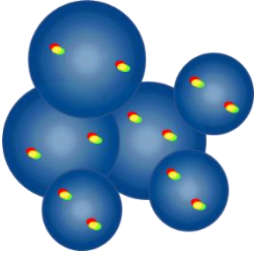
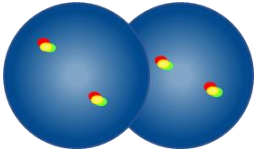
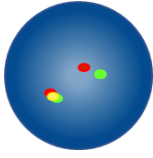
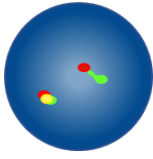
#### Beurteilung der Objektträgerqualität

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

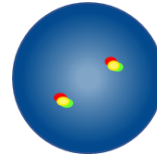
- Jede Probe sollte von zwei Analytikern analysiert und ausgewertet werden. Etwaige Unstimmigkeiten sind durch die Auswertung durch einen dritten Analytiker zu klären.
- Jeder Analytiker muss über eine angemessene Qualifikation verfügen, die den anerkannten nationalen Standards entspricht.
- Jeder Analytiker 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.
- Wenn bei der Analyse von dreifarbigem Break-apart-Sonden ein Abstand zwischen einem beliebigen der drei Signale (rot, grün, blau) 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 Sondenbreiten
	Als zwei Fusionssignale zählen – ein Fusionssignal ist diffus

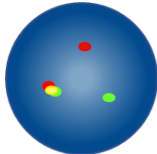
### Erwartete Ergebnisse

#### Erwartetes normales Signalmuster

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



#### Erwartetes abnormales Signalmuster



In einer Zelle mit CBF-B-Neuanordnung entspricht das erwartete Signalmuster einem Fusionssignal, einem roten und einem grünen Signal (1F1R1G).

Andere Signalmuster sind bei aneuploiden/unbalancierten Proben möglich.

#### Bekannte relevante Interferenzen/Störsubstanzen

Keine relevanten Interferenzen/Störsubstanzen bekannt.

#### Bekannte Kreuzreaktionen

Keine bekannten Kreuzreaktionen.

#### Meldung schwerwiegender Vorfälle

Für Patienten/Anwender/Dritte in der Europäischen Union und in Ländern mit identischem Regelwerk (Richtlinie 98/79/EG/Verordnung (EU) 2017/746 über *In-vitro-Diagnostika*): Wenn während der Verwendung dieses Produkts oder als Folge seiner Verwendung ein schwerwiegender Zwischenfall aufgetreten ist, melden Sie dies bitte dem Hersteller und Ihrer zuständigen nationalen Behörde.

Bei schwerwiegenden Vorfällen in anderen Ländern melden Sie diese bitte dem Hersteller und ggf. der zuständigen nationalen Behörde.

Vigilanz-Ansprechpartner des Herstellers: [vigilance@ogt.com](mailto:vigilance@ogt.com)

Eine Liste der Vigilanz-Ansprechpartner für die zuständigen nationalen Behörden in der EU finden Sie unter: [https://ec.europa.eu/health/md\\_sector/contact\\_en](https://ec.europa.eu/health/md_sector/contact_en)

## Spezifische Leistungsmerkmale

### Analytische Spezifität

Analytische Spezifität bezeichnet den Prozentsatz der Signale, die im richtigen Locus und an keinem anderen Ort hybridisiert wurden. Vier chromosomale Loci in jeder der zwanzig Metaphasezellen aus fünf Proben wurden analysiert, das ergibt 400 Datenpunkte. Die Position jeder hybridisierten Sonde wurde abgebildet und die Anzahl der FISH-Signale der Metaphase-Chromosomen, die am richtigen Ort hybridisiert wurden, wurde aufgezeichnet.

Die analytische Spezifität jeder Sonde im Kit wurde berechnet, indem die Anzahl der FISH-Signale der Metaphase-Chromosomen, die am richtigen Locus hybridisiert wurden, durch die Gesamtzahl der hybridisierten FISH-Signale der Metaphase-Chromosomen dividiert wurde. Dieses Ergebnis wurde mit 100 multipliziert, als Prozentsatz ausgedrückt und mit einem Konfidenzintervall von 95 % angegeben.

Tabelle 1 Analytische Spezifität der CBF Breakapart Probe

Ziel	Anzahl der hybridisierten Metaphase-Chromosomen	Anzahl der korrekt hybridisierten Loci	Analytische Spezifität	95 % Konfidenzintervall
16q22 Texas Red	200	200	100 %	98,12–100 %
16q22 FITC	200	200	100 %	98,12–100 %

### Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität ist der Prozentsatz der auswertbaren Zellen in der Interphase, die das erwartete normale Signalmuster aufweisen. Es wurden mindestens 200 Zellen in der Interphase für jede der fixierten Zellsuspensionen aus Knochenmarksproben analysiert, sodass für jeden Probentyp mindestens 5.000 Kerne ausgewertet werden. Die Sensitivitätsdaten wurden basierend auf dem Prozentsatz der Zellen analysiert, die ein normales erwartetes Signalmuster aufweisen, und als Prozentsatz mit einem Konfidenzintervall von 95 % ausgedrückt.

Tabelle 2 Analytische Sensitivität der CBF Breakapart Probe

Probentyp	Sensitivitätskriterien	Sensitivitätsergebnis
Knochenmark	>95 %	97,92 % (97,59–98,25 %)

### Charakterisierung der normalen Cut-off-Werte

Der normale Cut-off-Wert wird definiert als der Prozentsatz der Zellen, die ein falsch positives Signalmuster aufweisen, bei dem eine Person als gesund angesehen wird und das nicht mit einer klinischen Diagnose übereinstimmt. Es wurden mindestens 200 Zellen in der Interphase für jede der fixierten Zellsuspensionen aus Knochenmarksproben analysiert, sodass für jeden Probentyp mindestens 5.000 Kerne ausgewertet werden.

Der Cut-off-Wert wurde mit der Funktion  $\beta$ -inverse (BETAINV) in MS Excel ermittelt. Er wurde berechnet als Prozentsatz der Zellen in der Interphase, die ein falsch positives Signalmuster unter Verwendung der oberen Grenze eines einseitigen Konfidenzintervalls von 95 % der Binomialverteilung in einer normalen Patientenprobe aufweisen.

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

Probentyp	Cut-off Ergebnis
Knochenmark	3,08 %

Labore müssen die Cut-off-Werte anhand eigener Daten überprüfen<sup>10, 11</sup>.

### Genauigkeit

Die Genauigkeit dieses Produkts wurde in Bezug auf die Genauigkeit innerhalb eines Tages (Probe zu Probe), an verschiedenen Tagen (Tag zu Tag) und innerhalb einer Charge an einem einzigen Standort (Charge zu Charge) gemessen.

Zur Beurteilung der Genauigkeit dieses Produkts wurden 2 Proben verwendet: 1 negative Knochenmarkspröbe und 1 schwach positive Knochenmarkspröbe.

Um die Genauigkeit innerhalb eines Tages und an verschiedenen Tagen zu ermitteln, wurden die Proben an 5 nicht aufeinanderfolgenden Tagen ausgewertet, und um die Genauigkeit von Charge zu Charge zu bestimmen, wurden 3 Produktchargen an 4 Duplikaten derselben Proben bewertet. Die Ergebnisse wurden als allgemeine Übereinstimmung mit der prognostizierten negativen Klasse (für die negativen Proben) präsentiert.

Tabelle 4 Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der CBF Breakapart Probe

Variable	Probentyp	Übereinstimmung
Reproduzierbarkeit innerhalb eines Tages (Probe zu Probe) und an verschiedenen Tagen (Tag zu Tag)	Negatives Knochenmark	100 %
	Schwach positives Knochenmark	100 %

Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge	Negatives Knochenmark	100 %
	Schwach positives Knochenmark	100 %

### Klinische Leistung

Um sicherzustellen, dass das Produkt beabsichtigte Neuordnungen erkennt, wurde die klinische Leistung in zwei retrospektiven Studien bestimmt, die an externen Prüfstellen an repräsentativen Proben der für das Produkt vorgesehenen Population unter Verwendung von 3:1 Methanol/Essigsäure-fixiertem Material aus hämatologisch gewonnenen Proben durchgeführt wurden. Der Gesamtprobenumfang der Studien betrug 113 Proben, davon 20 positive und 93 negative Proben. Alle Proben wurden anonymisiert und randomisiert, um eine Verzerrung der Analyse zu vermeiden. Die Ergebnisse wurden mit dem bekanntesten Status der Probe verglichen.

Die Ergebnisse dieser Tests wurden analysiert, um mit einem eindimensionalen Ansatz klinische Sensitivität, klinische Spezifität und die Werte der Falsch-Positiv-Rate (FPR) für positive Signale zu bestimmen.

Tabelle 5 Klinische Leistung der CBF Breakapart Probe

Variable	Ergebnis
Klinische Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate, TPR)	99,42 %
Klinische Spezifität (Richtig-Negativ-Rate, TNR)	99,84 %
Falsch-Positiv-Rate (FPR=1-Spezifität)	0,16 %

### Zusätzliche Informationen

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

Tel.: +44 (0)1223 294048









E-Mail: [techsupport@cytocell.com](mailto:techsupport@cytocell.com)





Website: [www.oqt.com](http://www.oqt.com)

### Referenzen

- Huret JL. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 1999; 3(3):147–149.
- Swerdlow, et al. (eds.) WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Frankreich, 4. Ausgabe, IARC, 2017
- Hernández JM, et al. Haematologica. 2000; 85(5):481–5.
- Moreno-Miralles I, et al. J Biol Chem. 2005;280(48):40097–103.
- Grimwade D, et al. Blut. 2010;116(3):354–365.
- Litzow MR. Haematologica. 2020;105(6):1475–77.
- Rao S. Blood. 2020;136(21):2361–2362.
- Zhen T, et al. Blut. 2020;136(21):2373–2385.
- Arsham MS, Barch MJ und Lawce HJ. (eds.) (2017) *Das 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, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16–23.

### Symbolerklärung

ISO 15223-1:2016 - Medizinprodukte - Bei Aufschriften von Medizinprodukten zu verwendende Symbole, Kennzeichnung und zu liefernde Informationen – Teil 1: Allgemeine Anforderungen" (© Internationale Organisation für Normung)		
Symbol	Titel	Referenznummer(n)
	de: Hersteller	5.1.1
	de: Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft	5.1.2
	de: Verfallsdatum	5.1.4
	de: Chargencode	5.1.5
	de: Katalognummer	5.1.6
	de: Vor Sonnenlicht schützen	5.3.2
	de: Temperaturgrenze	5.3.7
	de: Gebrauchsanweisung beachten	5.4.3

	<b>de:</b> Vorsicht	5.4.4
	<b>de:</b> Medizinprodukt für die <i>In-vitro</i> -Diagnostik	5.5.1
	<b>de:</b> Menge reicht für <n> Tests	5.5.5
<b>EDMA-Symbole für IVD-Reagenzien und Komponenten, Revision Oktober 2009</b>		
<b>Symbol</b>	<b>Titel</b>	<b>Referenznummer(n)</b>
	<b>de:</b> Inhalt (oder enthält)	n. z.

#### Patente und Warenzeichen

Cytocell ist ein eingetragenes Warenzeichen von Cytocell Limited.



#### **Cytocell Limited**

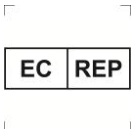
Oxford Gene Technology  
418 Cambridge Science Park  
Milton Road  
CAMBRIDGE  
CB4 0PZ  
Großbritannien

Tel.: +44 (0)1223 294048

Fax: +44 (0)1223 294986

E-Mail: [probes@cytocell.com](mailto:probes@cytocell.com)

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



#### **Sysmex Europe GmbH**

Bornbarch 1  
22848 Norderstedt  
DEUTSCHLAND

Tel.: +49 40 527260

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

#### **Anwendungshinweise Versionsübersicht**

V001.00 2021-10-01: Erstellung der Anwendungshinweise für ein neues Produkt