



A Sysmex Group Company



Gebruiksaanwijzing

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

MLL (KMT2A) Breakapart Probe



ALLEEN VOOR PROFESSIONEEL GEBRUIK



Meer informatie en andere talen zijn beschikbaar via ogt.com/IFU

Gebruiksdoel

De CytoCell® MLL (KMT2A) Breakapart Probe is een kwalitatieve, niet-geautomatiseerde, fluorescentie-*in situ*hybridisatietest (FISH) die wordt gebruikt voor het detecteren van chromosoomherschikkingen in het gebied 11q23.3 op chromosoom 11 in een Carnoy's oplossing (3:1 methanol/azijnzuur) met gefixeerde hematologisch verkregen celsuspensies van patiënten die vermoedelijk acute myeloïde leukemie (AML), myelodysplastisch syndroom (MDS) of acute lymfoblastische leukemie (ALL) hebben of daarmee zijn gediagnosticeerd.

Gebruiksaanwijzing

Dit hulpmiddel is ontworpen als aanvulling op andere klinische en histopathologische tests in erkende diagnostische en klinische zorgtrajecten waarbij het belangrijk is om de herschikingsstatus van *MLL* (*KMT2A*) te weten voor de klinische behandeling.

Beperkingen

Dit hulpmiddel is ontworpen om herschikkingen met breekpunten te detecteren in het gebied dat wordt begrensd door de rode en groene klonen in deze sondeset, inclusief het gen *MLL* (*KMT2A*). Breekpunten buiten dit gebied, of herschikkingen die geheel binnen dit gebied liggen, worden mogelijk niet gedetecteerd door dit hulpmiddel.

Dit hulpmiddel is niet bedoeld voor: gebruik als enig of aanvullend diagnostisch criterium, prenatale tests, screening op basis van populatie, 'near-patient' tests of zelftests.

Dit hulpmiddel is niet gevalideerd voor monstertypes, ziektypen of doeleinden die niet worden gespecificeerd in het gebruiksdoel.

Het is bedoeld als aanvulling op andere diagnostische laboratoriumtests en er mag geen therapeutische actie worden ondernomen op basis van enkel het FISH-resultaat.

De rapportage en interpretatie van FISH-resultaten moet worden uitgevoerd door gekwalificeerd personeel, consistent zijn met professionele praktijknormen en er moet rekening worden gehouden met andere relevante testresultaten en klinische en diagnostische informatie.

Dit hulpmiddel is alleen voor professioneel gebruik in laboratoria

De prestaties van het hulpmiddel worden mogelijk beïnvloed als het protocol niet wordt opgevolgd. Dit kan ook leiden tot fout-positieve/negatieve resultaten.

Testprincipes

Fluorescentie-*in situ*hybridisatie (FISH) is een techniek waarmee DNA-sequenties kunnen worden gedetecteerd op metafase chromosomen of in interfase nuclei van gefixeerde cytogenetische monsters. De techniek maakt gebruik van DNA-sondes die hybridiseren tot gehele chromosomen of enkele unieke sequenties en is een krachtige aanvulling op cytogenetische analyse met G-banding. Deze techniek kan nu worden toegepast als essentieel onderzoekshulpmiddel voor prenatale en hematologische chromosoomanalyse en chromosoomanalyse van solide tumoren. Doel-DNA is, na fixatie en denaturatie, beschikbaar voor vasthechting aan een

soortgelijk gedenatureerde en fluorescent gelabelde DNA-sonde, die een complementaire sequentie bevat. Na de hybridisatie worden niet-gebonden en niet-specifiek gebonden DNA-sondes verwijderd en wordt het DNA tegengekleurd ter visualisatie. Fluorescentiemicroscopie maakt vervolgens de visualisatie van de gehybridiseerde sonde op het doelmateriaal mogelijk.

Sonde-informatie

Het gen *KMT2A* (lysine methyltransferase 2A) op 11q23.3 is vaak herschikt bij acute leukemieën, vooral bij leukemie bij baby's en bij secundaire leukemie, na behandeling met DNA-topoisomerase II-inhibitoren¹.

Het *KMT2A*-gen is zeer homolog met het drosophila trithorax-gen en codeert voor een histon-methyltransferase, dat functioneert als een epigenetische transcriptieregulator. *KMT2A*-translocaties leiden tot de productie van een chimerisch eiwit waarin de aminoterminus van *KMT2A* is gefuseerd met de carboxylterminus van het fusiepartnergen. Het functionele eiwit speelt een cruciale rol bij embryo-ontwikkeling en hematopoëse^{1,2,3,4}.

Er worden *KMT2A*-herschikkingen gedetecteerd bij ongeveer 80% van alle baby's met acute lymfoblastische leukemie (ALL) en bij 5-10% van alle kinderen en volwassenen met ALL^{3,4}. Ze worden ook waargenomen bij 60% van alle baby's met acute myeloïde leukemie (AML) en bij 3% van alle de novo en 10% van alle therapiegerelateerde AML-gevallen bij volwassenen^{3,5}. Er zijn tot op heden meer dan 70 partners geïdentificeerd. De meest voorkomende translocaties zijn *MLL::AFF1*; t(4;11)(q21;q23.3), *MLL::MLLT4*; t(6;11)(q27;q23.3), *MLL::MLLT3*; t(9;11)(p22;q23.3) en *MLL::MLLT1*; t(11;19)(q23.3;p13.3)¹.

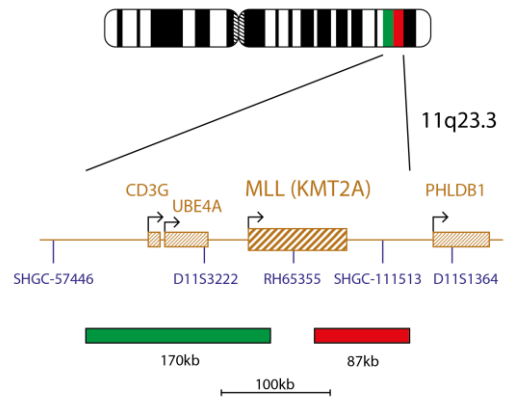
Vroeger werden *KMT2A*-herschikkingen bij acute leukemie geassocieerd met een slechtere afloop, maar recente onderzoeken hebben aangetoond dat de prognose zeer afhankelijk is van de fusiepartner en kan verschillen bij kinderen en volwassenen¹.

Sondespecificatie

MLL, 11q23.3, rood

MLL, 11q23.3, groen

CMP-H036 v006.00



Het MLL-product bestaat uit een 87kb-sonde, rood gemarkeerd, die een gebied telomerisch van het gen *MLL* (*KMT2A*) beslaat, inclusief de marker SHGC-111513, en een groene sonde die een gebied van 170kb centromerisch van het *MLL*-gen beslaat dat de *CD3G*- en *UBE4A*-genen omvat.

Geleverde materialen

Sonde: 50 µl per buisje (5 tests) of 100 µl per buisje (10 tests).

De sondes worden gemengd geleverd in een hybridisatieoplossing (< 65% formamide; < 20 mg dextraansulfaat; < 10% van 20x zout-natriumcitraat (SSC)) en zijn klaar voor gebruik.

Tegenkleuring: 150 µl per buisje (15 tests).

De tegenkleuring is DAPI Antifade ES (0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindool) in een inbedmiddel op basis van glycerol).

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen


1. Voor *in-vitro*diagnostiek. Alleen voor professioneel gebruik in laboratoria.
2. De sondemengsels bevatten formamide. Dit is een teratogeen; vermijd het inademen van de dampen en huidcontact. Wees voorzichtig; draag handschoenen en een labjas.
3. Voorzichtigheid is geboden met de DAPI; draag handschoenen en een labjas.
4. Niet gebruiken als de buisjes zijn beschadigd of als de inhoud van de buisjes op wat voor manier dan ook is aangetast.
5. Houd u aan uw lokale regelgeving en raadpleeg de aanbevelingen in het veiligheidsinformatieblad om te bepalen hoe u dit product veilig kunt afvoeren. Dit geldt ook voor de inhoud van beschadigde testsets.
6. Voer alle gebruikte reagentia en alle overige besmette wegwerpmaterialen af volgens de procedures voor (mogelijk) infectieus afval. Elk laboratorium is ervoor verantwoordelijk dat vast en vloeibaar afval wordt verwerkt in overeenstemming met de desbetreffende eigenschappen en de mate van gevaar die ze vormen en om ze te behandelen en af te (laten) voeren in overeenstemming met alle geldende wet- en regelgeving.
7. Gebruikers moeten de kleuren rood, blauw, en groen kunnen onderscheiden.

- De prestaties van het hulpmiddel worden mogelijk beïnvloed als het beschreven protocol niet wordt opgevolgd en de voorgeschreven reagentia niet worden gebruikt. Dit kan ook leiden tot fout-positieve/negatieve resultaten.
- De sonde moet niet worden verdund of gemengd met andere sondes.
- De prestaties worden mogelijk beïnvloed als er geen sonde van 10 µl wordt gebruikt tijdens het pre-denaturatiestadium van het protocol. Dit kan ook leiden tot fout-positieve/negatieve resultaten.
- Alle producten moeten voor gebruik worden gevalideerd.
- Er dienen interne inspecties plaats te vinden met gebruik van gezonde celpopulaties in testmonsters.

Temperatuurdefinities

- 20 °C / Bevroren / In de vriezer: -25 °C tot -15 °C
- 37 °C: +37 °C ± 1 °C
- 72 °C: +72 °C ± 1 °C
- 75 °C: +75 °C ± 1 °C
- Kamertemperatuur (KT): +15 °C tot +25 °C

Opslag en beheer

 De set moet worden bewaard in een vriezer bij -25 °C tot -15 °C tot de vervaldatum die is aangegeven op het setlabel. De sonde en buisjes met tegenkleuring moeten in het donker worden bewaard.



De FISH sonde, DAPI Antifade ES-tegenkleuring, en hybridisatieoplossing blijven stabiel gedurende de gehele vries-dooi-cyclus die bij normaal gebruik wordt ervaren (waarbij een cyclus bestaat uit het verwijderen van het buisje uit en vervangen in de vriezer) - 5 cycli voor het 50 µl (5 tests) buisje van de FISH sonde, 10 cycli voor het 100 µl (10 tests) buisje van de FISH sonde en 15 cycli voor het 150 µl (15 tests) buisje van tegenkleuring. Blootstelling aan licht dient zoveel mogelijk te worden vermeden. Bewaar de componenten in de bijgeleverde lichtdichte doos. Componenten die onder andere omstandigheden dan vermeld op het etiket worden gebruikt en opgeslagen, presteren mogelijk niet zoals verwacht en kunnen de testresultaten negatief beïnvloeden. Voorkom onnodige blootstelling aan licht en temperatuurschommelingen.

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Benodigde gekalibreerde apparatuur:

- Verwarmingssplaat (met een vaste plaat en nauwkeurige temperatuurbediening tot maximaal 80 °C)
- Gekalibreerde micropipetten en tips met variabel volume van 1 µl - 200 µl
- Waterbad met nauwkeurige temperatuurbediening op 37 °C en 72 °C
- Microcentrifugebuisjes (0,5 ml)
- Fluorescentiemicroscop (zie de paragraaf Aanbevelingen fluorescentiemicroscop)
- Fasecontrastmicroscop
- Schone Coplin-potjes van plastic, keramiek of hittebestendig glas
- Tang
- Gekalibreerde pH-meter (of pH-indicatorstrips die pH 6,5 - 8,0 kunnen meten)
- Bevochtigde container
- Immersie-olie van fluorescentieniveau voor microscoplenzen
- Werkbladcentrifuge
- Objectglasjes
- Afdekglasjes van 24x24 mm
- Timer
- 37 °C-incubator
- Rubberen lijmoplossing
- Vortexmenger
- Maatcilinders
- Magneetroerder
- Gekalibreerde thermometer

Optionele maar niet meegeleverde apparatuur

- Cytogenetische droogkamer

Benodigde maar niet meegeleverde reagentia

- 20x SSC-oplossing (zout-natriumcitraat)
- 100% ethanol
- Tween-20
- 1M natriumhydroxide (NaOH)
- 1M zoutzuur (HCl)
- Gezuiverd water

Aanbevelingen fluorescentiemicroscop

Gebruik een kwiklamp van 100 W of gelijkwaardig en planapochromatische objectieven voor olie-immersie van 60/63x of 100x voor optimale visualisatie. De fluoroforen die in deze sondeset worden gebruikt, worden geëxciteerd en uitgezonden bij de volgende golflengtes:

Fluorofoor	Excitatie _{max} [nm]	Emissie _{max} [nm]
Groen	495	521
Rood	596	615

Zorg ervoor dat de juiste excitatie- en emissiefilters die de bovenstaande golflengtes beslaan op de microscop worden aangebracht. Gebruik een drievoudige bandpassfilter voor DAPI/het groene spectrum/het rode spectrum of een tweevoudige bandpassfilter voor het groene spectrum/rode spectrum voor optimale gelijktijdige visualisatie van de groene en rode fluoroforen.

Controleer de fluorescentiemicroscop voorafgaand aan gebruik op een juiste werking. Gebruik immersie-olie die geschikt is voor fluorescentiemicroscopie en is geformuleerd voor lage automatische fluorescentie. Vermijd het mengen van DAPI Antifade met microscopimmersion-olie, omdat dit signalen kan verstoren. Volg de richtlijnen van de fabrikant wat betreft de levensduur van de lamp en de filters.

Monstervoorbereiding

De set is ontworpen voor gebruik met Carnoy's oplossing (3:1 methanol/azijnzuur) met gefixeerde hematologisch verkregen celsuspensies van patiënten die vermoedelijk acute myeloïde leukemie (AML), myelodysplastisch syndroom (MDS) of acute lymfoblastische leukemie (ALL) hebben of daarmee zijn gediagnosticeerd, geprepareerd volgens de richtlijnen van het laboratorium of de instelling. Bereid aan de lucht gedroogde monsters voor op objectglasjes volgens standaard cytogenetische procedures. De AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* bevat aanbevelingen voor monsterverzameling, -kweken, -afname en voor het maken van objectglasjes⁶.

Oplossingsvoorbereiding

Ethanoloplossingen

Verdun 100% ethanol met gezuiverd water volgens de volgende verhoudingen en meng grondig:

- 70% ethanol - 7 delen 100% ethanol op 3 delen gezuiverd water
- 85% ethanol - 8,5 delen 100% ethanol op 1,5 delen gezuiverd water

Bewaar de oplossingen maximaal 6 maanden op kamertemperatuur in een luchtdichte container.

2xSSC-oplossing

Verdun 1 deel 20xSSC-oplossing met 9 delen gezuiverd water en meng grondig. Controleer de pH-waarde en breng deze met NaOH of HCl naar pH 7,0 indien nodig. Bewaar de oplossing maximaal 4 weken op kamertemperatuur in een luchtdichte container.

0,4xSSC-oplossing

Verdun 1 deel 20xSSC-oplossing met 49 delen gezuiverd water en meng grondig. Controleer de pH-waarde en breng deze met NaOH of HCl naar pH 7,0 indien nodig. Bewaar de oplossing maximaal 4 weken op kamertemperatuur in een luchtdichte container.

Oplossing 2xSSC; 0,05% Tween-20

Verdun 1 deel 20xSSC-oplossing met 9 delen gezuiverd water. Voeg 5 µl Tween-20 per 10 ml toe en meng grondig. Controleer de pH-waarde en breng deze met NaOH of HCl naar pH 7,0 indien nodig. Bewaar de oplossing maximaal 4 weken op kamertemperatuur in een luchtdichte container.

FISH-protocol

(Opmerking: zorg ervoor dat de sonde en tegenkleuring zo min mogelijk worden blootgesteld aan laboratoriumlampen).

Voorbereiding objectglasjes

- Plaats het celmonster op een glazen objectglasje. Laat het opdrogen. **(Optioneel, bij gebruik van een cytogenetische droogkamer:** De kamer moet voor optimale bevlekking van het celmonster ongeveer 25 °C zijn en een luchtvochtigheid van 50% hebben. Gebruik een zuurkast als er geen cytogenetische droogkamer beschikbaar is).
- Dompel het glaasje 2 minuten onder in 2xSSC op kamertemperatuur (KT) zonder het te bewegen.
- Droog in een ethanolserie (70%, 85% en 100%), elk gedurende 2 minuten, op KT.
- Laat het opdrogen.

Pre-denaturatie

- Haal de sonde uit de vriezer en laat deze op KT komen. Centrifugeer de buisjes kort voorafgaand aan gebruik.
- Zorg er met een pipet voor dat de sondeoplossing gelijkmatig is vermengd.
- Verwijder 10 µl sonde per test en breng dit over naar een microcentrifugebuisje. Plaats de overgebleven sonde snel terug in de vriezer.
- Plaats de sonde en het monsterglasje op een verwarmingsplaat van 37 °C (+/- 1 °C) gedurende 5 minuten om voor te verwarmen.
- Plaats 10 µl sondemengsel op het celmonster en plaats voorzichtig een afdekglasje. Dicht het af met rubberen lijmoplossing en laat de lijm volledig opdrogen.

Denaturatie

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

Hybridisatie

- Plaats het glaasje gedurende de nacht in een vochtige en luchtdichte container bij 37 °C (+/- 1 °C).

Post-hybridisatie spoelbeurten

- Haal de DAPI uit de vriezer en laat deze op KT komen.
- Verwijder het afdekglasje en alle sporen van lijm voorzichtig.
- Dompel het glaasje gedurende 2 minuten onder in 0,4xSSC (pH 7,0) bij 72 °C (+/- 1 °C) zonder het te bewegen.
- Laat het glaasje afdruppen en dompel het 30 seconden onder in 2xSSC; 0,05% Tween-20 op KT (pH 7,0) zonder het te bewegen.
- Laat het glaasje afdruppen en breng 10 µl DAPI Antifade aan op ieder monster.
- Bedek het met een afdekglasje, verwijder eventuele luchtballen en laat de kleur 10 minuten in het donker ontwikkelen.
- Bekijk met een fluorescentiemicroscop (zie **Aanbevelingen fluorescentiemicroscop**).

Proceduraanbevelingen

1. Verhitten of verouderen van de glaasjes kan de signaalfluorescentie verminderen.
2. Hybridisatiecondities kunnen nadelig worden beïnvloed door het gebruik van reagentia die niet door Cytocell Ltd. worden geleverd of aanbevolen.
3. Gebruik een gekalibreerde thermometer om de temperatuur van oplossingen, waterbaden en incubators te meten, omdat deze temperaturen van cruciaal belang zijn voor optimale productprestaties.
4. De spoelingsconcentraties, pH en temperaturen zijn belangrijk, omdat te lage naleving kan leiden tot het niet-specifiek binden van de sonde en te hoge naleving er toe kan leiden dat er geen signaal aanwezig is.
5. Niet-volledige denaturatie kan ertoe leiden dat er geen signaal aanwezig is en teveel denaturatie kan ook leiden tot niet-specifiek binden.
6. Teveel hybridisatie kan leiden tot aanvullende of onverwachte signalen.
7. Gebruikers dienen het protocol te optimaliseren voor de eigen monsters alvorens de test voor diagnostische doeleinden te gebruiken.
8. Suboptimale condities kunnen leiden tot niet-specifieke binding, wat verkeerd kan worden geïnterpreteerd als een sondesignaal.

Interpretatie van resultaten

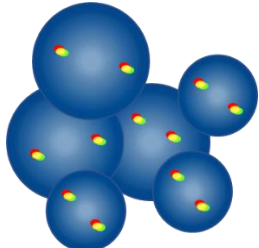
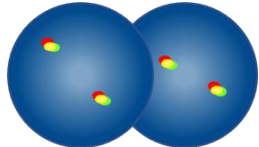
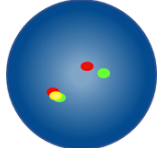
Glaasjeskwaliteit beoordelen

Het glaasje dient niet te worden geanalyseerd indien:

- De signalen te zwak zijn om in enkelvoudige filters te worden geanalyseerd - om door te kunnen gaan met de analyse moeten signalen helder, duidelijk en eenvoudig te evalueren zijn
- De analyse wordt belemmerd door een groot aantal samengeklonterde/overlappende cellen
- > 50% van de cellen niet zijn gehybridiseerd
- Er zich te veel fluorescente deeltjes bevinden tussen cellen en/of een fluorescente waas de signalen verstoort - in ideale glaasjes is de achtergrond donker of zwart en leeg
- De randen van de celkernen niet kunnen worden onderscheiden en niet intact zijn

Analyserichtlijnen

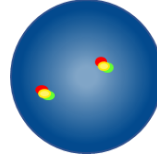
- Ieder monster dient door twee analisten te worden geanalyseerd en geïnterpreteerd. Eventuele verschillen moeten worden verholpen door een beoordeling door een derde analist
- Iedere analist dient voldoende gekwalificeerd te zijn volgens de erkende nationale standaarden
- Iedere analist dient onafhankelijk 100 kernen te noteren voor ieder monster. De eerste analist dient de analyse te starten vanaf de linkerzijde van het glaasje en de tweede analist vanaf de rechterzijde.
- Iedere analist dient zijn/haar resultaten vast te leggen op afzonderlijke bladen
- Analyseer alleen kernen die intact zijn en geen overlappende of opgepakte kernen of kernen die worden bedekt door cytoplasmatisch gruis of een hoge mate van autofluorescentie
- Vermijd gebieden met een overmaat aan cytoplasmatisch gruis of niet-specifieke hybridisatie
- Signaalintensiteit kan afwijken, zelfs binnen een enkele kern. Gebruik in dergelijke gevallen enkelvoudige filters en/of pas het brandpuntsvlak aan
- In suboptimale condities kunnen signalen diffuus worden weergegeven. Tel het als één signaal als twee signalen van dezelfde kleur elkaar raken, als de afstand tussen de signalen niet groter is dan twee signaalbreedtes of als de twee signalen zijn verbonden door een vage draad
- Tel het tijdens het analyseren van breakapartsondes met twee kleuren als een niet-herschikt/gefuseerd signaal als er tussen de rode en groene signalen een gat bestaat dat niet groter is dan 2 signaalbreedtes
- Analyseer een cel niet als u niet zeker bent of deze analyseerbaar is

Analyserichtlijnen	
	Niet tellen – nucleï liggen te dicht bij elkaar om grenzen te kunnen bepalen
	Overlappende nucleï niet tellen – niet alle gebieden van beide nucleï zijn zichtbaar
	Tel als twee fusiesignalen – het gat tussen het rode en groene signaal is minder dan twee signaalbreedtes



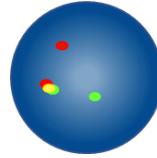
Verwachte resultaten

Verwacht normaal signaalpatroon



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

Verwacht abnormaal signaalpatroon



In een cel met een gebalanceerde *MLL (KMT2A)*-herschikking is het verwachte signaalpatroon een rode, een groene en een rood/groene fusie (1F1R1G).

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

Bekende relevante interferenties / interfererende substanties

Geen relevante interferenties / interfererende substanties bekend.

Bekende kruisreactiviteit

Geen bekende kruisreactiviteit.

Melden van ernstige incidenten

Voor een patiënt/gebruiker/derde in de Europese Unie en in landen met identieke regelgeving (Verordening (EU) 2017/746 betreffende medische hulpmiddelen voor in-vitrodiagnostiek); indien zich tijdens het gebruik van dit hulpmiddel of als gevolg daarvan een ernstig incident heeft voorgedaan, dient u dit te melden aan de fabrikant en aan uw nationale bevoegde autoriteit.

Ernstige incidenten in andere landen dient u te melden aan de fabrikant en, indien van toepassing, aan uw nationale bevoegde autoriteit.

Contactpersoon van de fabrikant: vigilance@ogt.com

Voor nationale bevoegde autoriteiten binnen de EU vindt u een lijst met meldpunten op:

https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

Specifieke prestatiekenmerken

Analytische specificiteit

Analytische specificiteit doelt op het percentage signalen dat met de juiste locus hybridiseert en niet met andere loci. De analytische specificiteit werd bepaald door het analyseren van in totaal 200 doelloei. 2 chromosomale loci van iedere 20 metafasecellen van 5 monsters werden geanalyseerd, wat 200 gegevenspunten opleverde. De analytische specificiteit werd berekend als het aantal FISH-signalen dat hybridiseerde met de juiste locus gedeeld door het totaal aantal gehybridiseerde FISH-signalen.

De analytische specificiteit van iedere sonde in de set werd berekend als het aantal metafase chromosomale FISH-signalen dat hybridiseerde met de juiste locus gedeeld door het totale aantal metafase chromosomale FISH-signalen dat hybridiseerde. Dit resultaat werd met 100 vermenigvuldigd, uitgedrukt als een percentage en gegeven met een 95%-betrouwbaarheidsinterval.

Tabel 1. Analytische specificiteit voor de MLL-(KMT2A) Breakapart Probe

Sonde	Doel	Aantal metafase chromosomale gehybridiseerd	Aantal juist gehybridiseerde loci	Analytische specificiteit (%)	95%-betrouwbaarheidsinterval (%)
MLL distaal, rood	11q23.3	200	200	100	98,12 - 100
MLL proximaal, groen	11q23.3	200	200	100	98,12 - 100

Analytische sensitiviteit

Analytische sensitiviteit is het percentage scoorbare interfasecellen met het verwachte normale signaalpatroon. Minimaal 200 interfasecellen werden geanalyseerd voor 25 in Carnoy's oplossing gefixeerde beenmergcelluspensies die karyotypisch normaal werden bevonden. Hierdoor werden minimaal 5000 nucleï gescoord voor ieder monstertype. De sensitiviteitsgegevens werden geanalyseerd aan de hand van het percentage cellen dat een normaal verwacht signaalpatroon liet zien en uitgedrukt als een percentage met een betrouwbaarheidsinterval van 95%.

Tabel 2. Analytische sensitiviteit voor de MLL-(KMT2A) Breakapart Probe

Aantal cellen met verwachte signaalpatronen	Totaal aantal cellen met signalen die gescoord kunnen worden	Analytische sensitiviteit (%)	95%-betrouwbaarheidsinterval (%)
4965	5000	99,3	99,08 - 99,52

Karakterisatie van normale drempelwaarden

De normale drempelwaarde, bij gebruik van FISH-sondes, is het maximumpercentage scoorbare interfasecellen met een specifiek abnormaal signaalpatroon waarbij een monster als normaal wordt beschouwd voor dat signaalpatroon.

De normale drempelwaarden werd bepaald aan de hand van monsters die negatief zijn voor de herschikking die de sonde moet detecteren en de bèta-inverse functie. Twee onafhankelijke analisten hebben de signaalpatronen van 100 interfase nucleï per monster vastgelegd, wat in totaal 200 patronen per monster opleverde.

De drempelwaarde werd bepaald aan de hand van de β-inverse (BETAINV) functie in MS Excel. De waarde werd berekend als het percentage interfasecellen dat een fout-positief signaalpatroon liet zien met behulp van de bovengrens van een eenzijdig 95%-betrouwbaarheidsinterval van de binomiale distributie bij een normaal patiëntmonster.

Tabel 3. Karakterisatie van normale drempelwaarden voor de MLL-(KMT2A) Breakapart Probe

Abnormaal signaalpatroon	Aantal geanalyseerde monsters om drempel te bepalen	Aantal geëvalueerde nucleï per monster	Max. aant. fout-positieve signaalpatronen	Normale drempelwaarde (%)
1R1G1F	1600	200	3	3,8

Laboratoria moeten de drempelwaarden verifiëren aan de hand van hun eigen gegevens.^{7,8}

Reproduceerbaarheid

Er is reproduceerbaarheidsonderzoek uitgevoerd om het volgende vast te stellen:

- Reproduceerbaarheid op 3 locaties op dezelfde dag (tussen monsters)
- Reproduceerbaarheid op 3 locaties op een andere dag (tussen dagen)
- Reproduceerbaarheid op 3 locaties op een andere dag (tussen locaties)
- Reproduceerbaarheid op één locatie tussen partijen (tussen partijen)

Reproduceerbaarheid werd bepaald door drie individuele laboratoria die zes blinde monsters hebben getest (twee negatief voor de herschikking, twee laag-positieve monsters met 1 tot 3 maal de drempel en twee hoog-positieve monsters met meer dan 45% van de cellen positief voor de herschikking). De analyse werd uitgevoerd met twee replica's van ieder monster in de loop van vijf niet opeenvolgende dagen.

Alle drie de locaties hebben tests op dezelfde en een andere dag en op verschillende locaties uitgevoerd met dezelfde sondepartij. Eén van de locaties heeft ook reproduceerbaarheidstests tussen partijen uitgevoerd met drie verschillende sondepartijen. De reproduceerbaarheid is berekend aan de hand van de overeenkomst tussen de variabelen die tijdens iedere test zijn onderzocht.

Tabel 4. Reproduceerbaarheid voor de MLL-(KMT2A) Breakapart Probe

Reproduceerbaarheidsonderzoek	Monster	Overeenkomst (%)
Dezelfde dag/andere dag/andere locatie	90% overeenstemming negatieve klasse	100%
	95% overeenstemming hoog-positieve klasse	100%
Andere partij	90% overeenstemming negatieve klasse	100%
	95% overeenstemming hoog-positieve klasse	100%

Klinische prestatie

Om er zeker van te zijn dat het product de beoogde herschikkingen detecteert, werd de klinische prestatie vastgesteld tijdens drie retrospectieve onderzoeken uitgevoerd op externe testlocaties. De onderzoeken hadden een gecombineerde steekproefomvang van vierhonderdachtentachtig (488) met achttien (18) positieve en vierhonderdzeventig (470) negatieve monsters verdeeld over alle locaties. De positieve status van elk monster is bevestigd middels een vergelijking met een commerciële sonde van een concurrent die dezelfde afwijkingen detecteert als de sondes die worden geëvalueerd of middels een vergelijking met G-banded karyotype.

De resultaten van deze tests werden geanalyseerd om waarden voor klinische sensitiviteit, klinische specificiteit en het percentage fout-positieven (FPR) voor positieve signalen te verkrijgen met behulp van een eendimensionale aanpak.

Tabel 5. Klinische prestaties voor de MLL-(KMT2A) Breakapart Probe

Variabele	Resultaat
Klinische sensitiviteit (TPR [true positive rate; percentage terecht positieven])	99,93%
Klinische specificiteit (TNR [true negative rate; percentage terecht negatieven])	99,97%
Percentage fout-positieven (FPR) = 1 – Specificiteit	0,03%

Samenvatting van veiligheid en prestaties (SSP)

De SSP wordt via de Europese database voor medische apparatuur (Eudamed) openbaar gemaakt waar deze is gelinkt met de Basic UDI-DI. Eudamed URL: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> Basic UDI-DI: 50558449LPH013J8

Indien Eudamed niet volledig functioneert, kan het SSP op verzoek openbaar toegankelijk worden gemaakt door een e-mail te sturen naar SSP@ogt.com.















Aanvullende informatie

Neem contact op met de afdeling Technische ondersteuning van CytoCell voor aanvullende productinformatie. T: +44(0) 1223 294048 E: techsupport@cytoCELL.com W: www.ogt.com

Referenties

1. 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; doi:10.1038/leu.2013.90
6. Arsham, MS., Barch, M.J. 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.

Verklaring van symbolen

EN ISO 15223-1:2021 - "Medische hulpmiddelen – Symbolen om te gebruiken met informatie die wordt geleverd door de fabrikant – Deel 1: Algemene eisen" (© International Organization for Standardization)		
Symbol	Titel	Referentienummer(s)
	nl: Fabrikant	5.1.1
	nl: Geautoriseerde vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap/Europese Unie	5.1.2
	nl: Houdbaarheidsdatum	5.1.4
	nl: Partijnummer	5.1.5
	nl: Catalogusnummer	5.1.6
	nl: Buiten bereik van zonlicht bewaren	5.3.2
	nl: Temperatuurgrens	5.3.7
	nl: Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	5.4.3
 ogt.com/IFU	nl: Raadpleeg de elektronische gebruiksaanwijzing	5.4.3
	nl: Let op	5.4.4
	nl: Medisch hulpmiddel voor <i>in-vitro</i> diagnostiek	5.5.1
	nl: Bevat voldoende voor <n> tests	5.5.5
	nl: Unieke hulpmiddel identificatiecode	5.7.10
EDMA-symbolen voor IVD-reagentia en -componenten, revisie oktober 2009		
Symbol	Titel	Referentienummer(s)
	nl: Inhoud (of bevat)	N.v.t.

Patenten en handelsmerken

CytoCell is een geregistreerd handelsmerk van CytoCell Limited.



CytoCell Limited
Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
VERENIGD KONINKRIJK

T: +44(0) 1223 294048
F: +44(0) 1223 294986
E: probes@cytoCell.com
W: www.ogt.com



Sysmex Europe SE
Bornbarch 1
22848 Norderstedt
DUITSLAND

T: +49 40 527260
W: www.sysmex-europe.com

Versiegeschiedenis gebruiksaanwijzing

V001.00 2023-01-11: Nieuwe IFU voor EU Verordening 2017/746.