A Sysmex Group Company

CytoCell

Gebrauchsanweisung (IFU)

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

MLL (KMT2A) Breakapart Probe

CE IVD
2797

NUR FÜR DEN PROFESSIONELLEN GEBRAUCH

ogt.com/IFU

Weitere Informationen und andere Sprachen erhältlich unter ogt.com/ IFU

Verwendungszweck

Die CytoCell® MLL (KMT2A) Breakapart Probe ist ein hochwertiger, nicht automatisierter Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungstest (FISH) zum Nachweis von chromosomalen Neuanordnungen in der Region 11q23.3 auf Chromosom 11 in mit Carnoy'scher Lösung (3:1 Methanol/Essigsäure) fixierten, hämatologisch gewonnenen Zellsuspensionen von Patienten mit bestätigter oder vermuteter akuter myeloischer Leukämie (AML), myelodysplastischen Syndromen (MDS) oder myeloproliferativen Neoplasien (ALL).

Gebrauchshinweise

Dieses Produkt wurde als Ergänzung zu anderen klinischen und histopathologischen Tests in anerkannten diagnostischen und klinischen Versorgungspfaden konzipiert, bei denen die Kenntnis des *MLL (KMT2A)* Neuanordnungsstatus für das klinische Management relevant wäre.

Einschränkungen

Dieses Produkt wurde entwickelt, um Neuanordnungen mit Bruchstellen in der Region zu erkennen, die durch die roten und grünen Klone in diesem Sondenset gebunden wird, dazu gehört auch das *MLL (KMT2A)* Gen. Bruchstellen außerhalb dieser Region oder abweichende Neuanordnungen, die komplett in dieser Region enthalten sind, können mit diesem Produkt nicht erkannt werden.
Dieses Produkt ist nicht für die eigenständige Diagnostik, begleitende Diagnostik, Pränataldiagnostik, das populationsbasierte Screening, patientennahe Untersuchungen oder Selbsttests geeignet.
Dieses Produkt wurde ausschließlich für die Probentypen, Krankheitstypen oder Zwecke validiert, die unter „Verwendungszweck" aufgeführt sind.
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 geschultem Personal durchgeführt werden, den professionellen Praxisstandards entsprechen und weitere relevante Testergebnisse sowie klinische und diagnostische Informationen berücksichtigen.
Dieses Produkt ist nur für den professionellen Gebrauch im Labor vorgesehen.
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, fluoreszierend markierte DNA-Sonde zur Verfügung, die eine komplementäre Sequenz aufweist. Nach der Hybridisierung wird die ungebundene und unspezifisch gebundene DNA-Sonde entfernt und zwecks Visualisierung eine Gegenfärbung der DNA vorgenommen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wird dann die hybridisierte Sonde im Zielmaterial visualisiert.

Informationen zur Sonde

Das *KMT2A*-Gen (Lysin-Methyltransferase 2A) an 11q23.3 ist üblicherweise bei akuten Leukämien, insbesondere bei Säuglingsleukämie und bei sekundärer Leukämie, nach Behandlung mit DNA-Topoisomerase-II-Inhibitoren neu angeordnet[1].

Das *KMT2A*-Gen weist eine große Homologie mit dem Drosophila-Trithorax-Gen auf und kodiert eine Histon-Methyltransferase, die als epigenetischer Transkriptionsregulator dient. *KMT2A*-Translokationen führen zur Produktion eines chimären Proteins, bei dem der aminoterminale Teil von *KMT2A* mit dem carboxyterminalen Teil des Fusionspartnergens fusioniert ist. Das funktionelle Protein spielt eine entscheidende Rolle bei der Embryonalentwicklung und Hämatopoese[1,2,3,4].

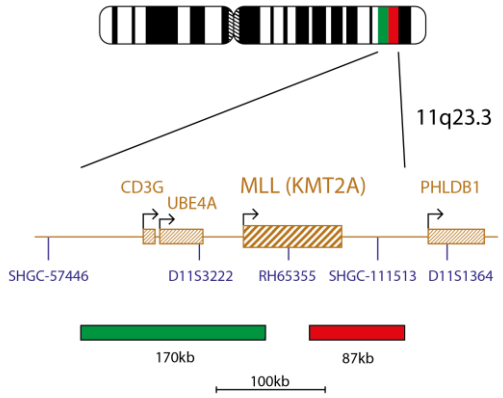
KMT2A-Neuanordnungen können bei ca. 80 % der Säuglinge mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) und bei 5 – 10 % der pädiatrischen und erwachsenen ALLs nachgewiesen werden[3,4]. Sie finden sich auch bei 60 % der akuten myeloischen Leukämien bei Säuglingen (AML), 3 % aller de novo und 10 % der therapiebedingten AML bei Erwachsenen[3,5]. Bis heute wurden mehr als 70 Partner identifiziert, zu den häufigsten Translokationen gehören *MLL::AFF1*; t(4;11)(q21;q23.3), *MLL::MLLT4*; t(6;11)(q27;q23.3), *MLL::MLLT3*; t(9;11)(p22;q23.3) und *MLL::MLLT1*; t(11;19)(q23.3;p13.3)[1].

Bisher wurden *KMT2A*-Neuanordnungen bei akuter Leukämie mit einem schlechteren Outcome in Verbindung gebracht, aktuelle Studien zeigen jedoch, dass die Prognose stark vom Fusionspartner abhängt und bei Kindern und Erwachsenen unterschiedlich sein kann[1].

Spezifikation der Sonde

MLL, 11q23.3, rot
MLL, 11q23.3, grün

CMP-H036 v006.00



Das MLL-Produkt besteht aus einer rot markierten 87kb-Sonde, die eine telomerische Region bis zum *MLL*-(*KMT2A*-)Gen einschließlich des Markers SHGC-111513 abdeckt, und einer grünen Sonde, die eine 170kb centromerische Region bis zum *MLL*-Gen abdeckt, welche die Gene *CD3G* und *UBE4A* beinhaltet.

Bereitgestelltes Material

Sonde: 50 µl pro Ampulle (5 Tests) oder 100 µl pro Ampulle (10 Tests).
Die Sonden werden in Hybridisierungslösung (< 65 % Formamid, < 20 mg Dextransulfat, < 10 % des 20x Salz-Natriumcitrat (SSC)) vorgemischt bereitgestellt und sind gebrauchsfertig.

Gegenfärbung: 150 µl pro Ampulle (15 Tests).
Für die Gegenfärbung wird DAPI Antifade ES verwendet (0,125 µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) in Glycerol-basiertem Fixiermittel).

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. Gehen Sie beim Umgang mit DAPI vorsichtig vor; tragen Sie Handschuhe und einen Laborkittel.
4. Verwenden Sie keine Ampulle/n, die auf irgendeine Weise beschädigt oder kompromittiert 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 Testkit-Inhalte.
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 ihrem Gefährlichkeitsgrad zu

handhaben und sie gemäß den geltenden Vorschriften zu behandeln und zu entsorgen (oder behandeln und entsorgen zu lassen).
7. Die Nutzer müssen in der Lage sein, zwischen den Farben Rot, Blau und Grün zu unterscheiden.
8. Die Nichteinhaltung des vorgegebenen Protokolls oder die Nichtnutzung der Reagenzien kann sich nachteilig auf die Leistung auswirken und zu falsch positiven/negativen Ergebnissen führen.
9. Die Sondenflüssigkeit sollte nicht verdünnt oder mit anderen Sondenflüssigkeiten gemischt werden.
10. 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.
11. Alle Produkte sind vor dem Gebrauch zu validieren.
12. 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 ist bei Temperaturen zwischen -25 ºC und -15 ºC in einem Gefrierschrank aufzubewahren, bis das Ablaufdatum, das auf dem Etikett des Kits angegeben ist, erreicht wurde. Die Sonde und die Ampullen mit der Gegenfärbung sind im Dunkeln zu lagern.

Die FISH-Sonde, DAPI-Antifade-ES-Gegenfärbelösung und Hybridisierungslösung bleiben während der Frost-Tau-Zyklen, die im regulären Gebrauch auftreten, stabil (dabei besteht ein Zyklus jeweils aus der Entnahme der Ampulle aus dem Gefrierschrank und dem Austausch der Ampulle im Gefrierschrank) – 5 Zyklen für die 50-µl-Ampulle der FISH-Sonde (5 Tests), 10 Zyklen für die 100-µl-Ampulle der FISH-Sonde (10 Tests) und 15 Zyklen für die 150-µl-Ampulle der Gegenfärbelösung (15 Tests). 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:
1. Heizplatte (mit einer festen Platte und einer präzisen Temperaturregelung bis 80 °C)
2. Kalibrierte Mikropipetten und Spitzen mit variablem Volumen von 1 µl – 200 µl
3. Wasserbad mit präziser Temperaturregelung bei 37 ºC und 72 ºC
4. Mikrozentrifugenröhrchen (0,5 ml)
5. Fluoreszenzmikroskop (bitte beachten Sie dazu den Abschnitt „Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop“)
6. Phasenkontrastmikroskop
7. Saubere Coplin-Gefäße aus Kunststoff, Keramik oder hitzebeständigem Glas
8. Pinzette
9. Kalibriertes pH-Messgerät (oder pH-Indikatorstreifen für die Messung von pH-Werten zwischen 6,5 – 8,0)
10. Befeuchteter Behälter
11. Immersionsöl für das Objektiv des Fluoreszenz-Mikroskops
12. Laborzentrifuge
13. Objektträger
14. 24 x 24 mm Deckgläser
15. Zeitmesser
16. 37 °C Inkubator
17. Kleber auf Gummibasis
18. Vortexmischer
19. Messzylinder
20. Magnetrührer
21. Kalibriertes Thermometer

Optionale Ausrüstung, die nicht zum Lieferumfang gehört
1. Zytogenetische Trocknungskammer

Benötigte Reagenzien, die nicht zum Lieferumfang gehören
1. 20x Kochsalz-Natriumcitrat-(SSC-)Lösung
2. 100 % Ethanol
3. Tween-20
4. 1M Natriumhydroxid (NaOH)
5. 1M Salzsäure (HCl)
6. Destilliertes Wasser

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

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

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

Überprüfen Sie das Fluoreszenzmikroskop vor dem Gebrauch, um sich von seiner einwandfreien Funktion zu überzeugen. Verwenden Sie Immersionsöl, das für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet ist und aufgrund seiner Formulierung eine geringe Autofluoreszenz aufweist. Mischen Sie DAPI-Antifade nicht mit Mikroskop-Immersionsöl, 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 Zellsuspensionen von Patienten mit bestätigter oder vermuteter akuter myeloischer Leukämie (AML), myelodysplastischen Syndromen (MDS) oder akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) bestimmt, die mit 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[8].

Vorbereitung der Lösung
Ethanollösungen
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 Lösung 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 Gegenfärbelösung gegenüber den Laborlampen stets begrenzt ist.)

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

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

Denaturierung

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

Hybridisierung

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

Spülgänge nach der Hybridisierung

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

Empfehlungen zur Vorgehensweise

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

Auswertung der Ergebnisse

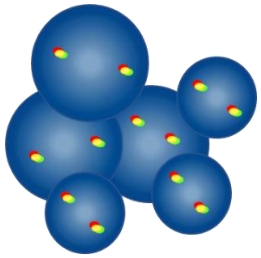
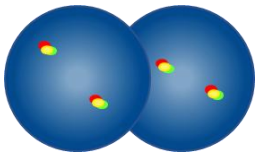
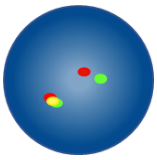
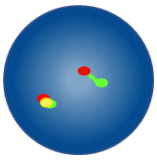
Beurteilung der Objektträgerqualität

Der Objektträger sollte nicht analysiert werden, falls Folgendes zutrifft:

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

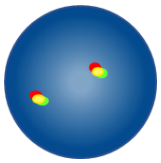
Analyseleitlinien

- Jede Probe sollte von zwei Analytikern analysiert und ausgewertet werden. Etwaige Unstimmigkeiten sind durch die Auswertung durch einen dritten Analytiker zu klären
- Jeder Analytiker muss über eine angemessene Qualifikation verfügen, die den anerkannten nationalen Standards entspricht.
- Jeder Analytiker sollte unabhängig voneinander 100 Kerne für jede Probe bewerten. Der erste Analytiker sollte mit seiner Analyse auf der linken Seite des Objektträgers beginnen, der zweite Analytiker auf der rechten Seite.
- Jeder Analytiker sollte seine Ergebnisse in separaten Tabellen dokumentieren.
- Analysieren Sie nur intakte Kerne, keine überlappenden oder überfüllten Kerne und keine Kerne, die mit zytoplasmatischen Ablagerungen bedeckt sind oder einen hohen Autofluoreszenzgrad aufweisen.
- Meiden Sie Bereiche, in denen übermäßige zytoplasmatische Ablagerungen oder unspezifische Hybridisierung vorhanden sind.
- Die Signalintensität kann variieren, das gilt auch für einzelne Kerne. Verwenden Sie in solchen Fällen Einzelfilter und/oder passen Sie die Bildebene entsprechend an.
- Unter suboptimalen Bedingungen können Signale diffus erscheinen. Wenn sich zwei Signale der gleichen Farbe berühren oder der Abstand zwischen ihnen nicht größer als zwei Signalbreiten ist, oder wenn ein schwacher Strang vorhanden ist, der die beiden Signale verbindet, zählen diese beiden Signale jeweils als ein Signal.
- Wenn bei der Analyse von zweifarbigen Break-apart-Sonden ein Abstand zwischen dem roten und grünen Signal nicht größer als 2 Signalbreiten ist, so wird dies als nicht neu angeordnetes/fusioniertes Signal gedeutet.
- Falls Sie Zweifel haben, ob eine Zelle für die Analyse in Frage kommt oder nicht, analysieren Sie diese Zelle nicht.

Analyseleitlinien	
	Nicht zählen – Kerne sind zu nah beieinander, um die Grenzen zu bestimmen
	Überlappende Kerne nicht zählen – es sind nicht alle Bereiche beider Kerne sichtbar
	Als zwei Fusionssignale zählen – der Abstand zwischen dem roten und grünen Signal beträgt weniger als zwei Signalbreiten
	Als zwei Fusionssignale zählen – ein Fusionssignal ist diffus

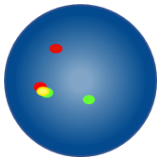
Erwartete Ergebnisse

Erwartetes normales Signalmuster



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

Erwartetes abnormales Signalmuster



In einer Zelle mit balancierter *MLL-(KMT2A-)*Neuanordnung entspricht das erwartete Signalmuster einem roten, einem grünen und einem rot/grünen Fusionssignal (1F1R1G).

Andere Signalmuster sind bei aneuploiden/unbalancierten Proben möglich.

Bekannte relevante Interferenzen / Störsubstanzen

Keine bekannten relevanten Interferenzen / Störsubstanzen.

Bekannte Kreuzreaktionen

Keine bekannten Kreuzreaktionen.

Meldung schwerer Störungen

Bei einem Patienten, einem Benutzer oder einer Drittpartei in der Europäischen Union und in Ländern mit identischen regulatorischen Bestimmungen (EU-Verordnung 2017/746 zu Medizinprodukten für die *In-vitro*-Diagnostik) gilt: Falls es während der Verwendungen dieses Produkts oder aufgrund der Verwendung dieses Produkts zu einer schweren Störung kommt, dann melden Sie diese bitte dem Hersteller und der in Ihrem Land zuständigen Behörde.
Bei schweren Störungen in anderen Ländern gilt: Melden Sie die Störung bitte dem Hersteller und, sofern zutreffend, der in dem Land zuständigen Behörde.
Ansprechpartner des Herstellers für Vigilanz: vigilance@ogt.com
Eine Liste der für Vigilanz zuständigen Ansprechpartner für die Behörden der EU-Mitgliedsländer finden Sie unter:
https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

Spezifische Leistungsmerkmale

Analytische Spezifität

Analytische Spezifität bezeichnet den Prozentsatz der Signale, die im richtigen Locus und an keinem anderen Ort hybridisiert wurden. Die analytische Spezifität wurde durch die Analyse von insgesamt 200 Zielloci ermittelt. Es wurden 2 chromosomale Loci in jeder der 20 Metaphasezellen aus 5 Proben analysiert, das ergibt 200 Datenpunkte. Die analytische Spezifität wurde berechnet, indem die Anzahl der FISH-Signale, die an den richtigen Locus hybridisiert wurden, durch die Gesamtzahl der hybridisierten FISH-Signale dividiert wurde.

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 MLL-(KMT2A-)Breakapart-Probe

Sonde	Ziel	Anzahl der hybridisierten Metaphase-Chromosomen	Anzahl der korrekt hybridisier-ten Loci	Analytische Spezifität (%)	95 % Konfidenzin-tervall (%)
MLL Distal, rot	11q23.3	200	200	100	98,12 – 100
MLL proximal, grün	11q23.3	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. Für jede der 25 mit Carnoy'scher Lösung fixierten Zellsuspensionen aus Knochenmark, die als karyotypisch normal eingestuft wurden, wurden mindestens 200 Interphase-Zellen analysiert, so dass für jeden Probentyp mindestens 5000 Zellkerne ausgewertet wurden. 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 MLL-(KMT2A-)Breakapart-Probe

Anzahl der Zellen mit erwarteten Signalmustern	Gesamtzahl der Zellen mit auswertbaren Signalen	Analytische Sensitivität (%)	95 % Konfidenzintervall (%)
4965	5000	99,3	99,08 – 99,52

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

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

Der Cut-off-Wert wurde mit der Funktion β-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 MLL-(KMT2A-)Breakapart-Probe

Abnormales Signalmuster	Anzahl der Proben, die zur Generierung des Cut-off-Werts untersucht wurden	Anzahl der bewerteten Kerne pro Probe	Max. Anzahl der falsch positiven Signalmuster	Normaler Cut-off-Wert (%)
1R1G1F	1600	200	3	3,8

Labore müssen die Cut-off-Werte anhand eigener Daten überprüfen.[7,8]

Reproduzierbarkeit
Studien zur Reproduzierbarkeit wurden durchgeführt, um folgende Werte zu ermitteln:

- Reproduzierbarkeit innerhalb eines Tages (Probe zu Probe) an 3 Standorten
- Reproduzierbarkeit an verschiedenen Tagen (Tag zu Tag) an 3 Standorten
- Reproduzierbarkeit zwischen den 3 Standorten (Standort zu Standort)
- Reproduzierbarkeit innerhalb der Charge (Charge zu Charge) an einem einzigen Standort

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

Alle drei Standorte führten Tests innerhalb eines Tages, an mehreren Tagen und innerhalb des Standorts mit der gleichen Sondencharge durch, während einer der Standorte auch die Reproduzierbarkeit innerhalb der Charge mit drei verschiedenen Sondenchargen untersuchte. Die Reproduzierbarkeit wurde anhand der Übereinstimmung zwischen den Variablen berechnet, die bei jedem Test untersucht wurden.

Tabelle 4 Reproduzierbarkeit der MLL-(KMT2A-)Breakapart-Probe

Studie zur Reproduzierbarkeit	Probe	Übereinstimmung (%)
Innerhalb des Tages / an verschiedenen Tagen / innerhalb des Standorts	90 % Übereinstimmung Negative Klasse	100 %
	95 % Übereinstimmung Stark positive Klasse	100 %
Innerhalb der Charge	90 % Übereinstimmung Negative Klasse	100 %
	95 % Übereinstimmung Stark positive Klasse	100 %

Klinische Leistung
Um sicherzustellen, dass das Produkt die beabsichtigten Neuanordnungen aufspürt, wurde die klinische Leistung im Rahmen von drei retrospektiven Studien an externen Testzentren ermittelt. Die Studien hatten eine kombinierte Stichprobengröße von vierhundertachtundachtzig (488), mit achtzehn (18) positiven und vierhundertsiebzig (470) negativen Proben an allen Standorten. Der Positivitätsstatus jeder Probe wurde entweder mit einer kommerziellen Vergleichssonde eines konkurrierenden Anbieters, die dieselben Anomalien wie die untersuchten Sonden nachweist, oder durch einen Vergleich mit dem Karyotyp der G-Bänderung bestätigt.

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 MLL-(KMT2A-)Breakapart-Probe

Variable	Ergebnis
Klinische Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate, TPR)	99,93 %
Klinische Spezifität (Richtig-Negativ-Rate, TNR)	99,97 %
Falsch-Positiv-Rate (FPR) = 1 – Spezifität	0,03 %

Zusammenfassung von Sicherheit und Leistung (SSP)
Die SSP wird der Öffentlichkeit über die europäische Datenbank für Medizinprodukte (Eudamed) zugänglich gemacht, wo sie mit der Basis-UDI-DI verknüpft ist.
Eudamed URL: https://ec.europa.eu/tools/eudamed
Basis-UDI-DI: 50558449LPH013J8

Wenn Eudamed nicht voll funktionsfähig ist, wird der SSP der Öffentlichkeit auf Anfrage per E-Mail an SSP@ogt.com zur Verfügung gestellt.

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
Website: www.ogt.com

Referenzen

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.

Symbolerklärung

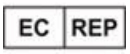
EN ISO 15223-1:2021 - „Medizinprodukte - Symbole, die in Verbindung mit vom Hersteller bereitzustellenden Informationen zu verwenden sind - Teil 1: Allgemeine Anforderungen“ (© Internationale Organisation für Normung)		
Symbol	**Titel**	**Referenznummer(n)**
	de: Hersteller	5.1.1
	de: Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft/Europäischen Union	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
ogt.com/IFU	**de:** Elektronische Gebrauchsanweisung beachten	5.4.3
	de: Vorsicht	5.4.4
	de: Medizinprodukt für die *In-vitro*-Diagnostik	5.5.1
	de: Menge reicht für <n> Tests	5.5.5
	de: Eindeutige Gerätekennung	5.7.10

EDMA-Symbole für IVD-Reagenzien und Komponenten, Revision Oktober 2009		
Symbol	**Titel**	**Referenznummer(n)**
	de: Inhalt (oder enthält)	n. z.

Patente und Warenzeichen
Cytocell ist eine eingetragene Marke 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
Web: www.ogt.com



Sysmex Europe SE
Bornbarch 1
22848 Norderstedt
DEUTSCHLAND

Tel.: +49 40 527260
Web: www.sysmex-europe.com

Versionshistorie der Gebrauchsanweisung
V001.00 2023-01-11: Neue Gebrauchsanweisung für EU-Verordnung 2017/746
V002 2025-08-29: Entfernung der UKCA-Kennzeichnung.