



A Sysmex Group Company



### Anwendungshinweise

REF: LPH 095 / LPH 095-S

## Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe



NUR FÜR DEN PROFESSIONELLEN GEBRAUCH



www.cytocell.com

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

### Verwendungszweck

Die CytoCell® Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe ist ein hochwertiger, nicht automatisierter Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungstest (FISH) zum Nachweis von chromosomalen Deletionen in den Regionen 5p15.3, 5q31.2 und 5q32-q33.1 auf Chromosom 5 in mit Carnoy'scher Lösung (3:1 Methanol/Essigsäure) fixierten, hämatologisch gewonnenen Zellsuspensionen von Patienten mit bestätigter oder vermuteter akuter myeloischer Leukämie (AML) oder dem myelodysplastischen Syndrom (MDS).

### Indikationen

Dieses Produkt wurde als Ergänzung zu anderen klinischen und histopathologischen Tests in anerkannten diagnostischen und klinischen Versorgungspfaden konzipiert, bei denen die Kenntnis des 5p15.3, 5q31.2 oder 5q32-q33.1 Deletionsstatus für das klinische Management relevant wäre.

### Einschränkungen

Dieses Produkt wurde entwickelt, um Genomverluste zu erkennen, die größer sind als die Regionen, die von den türkisen, roten und grünen Klonen in diesem Sondenset abgedeckt werden, dazu gehören auch die Regionen 5p15.3, 5q31.2 und 5q32-q33.1. Genomverluste außerhalb dieser Region oder Teilverluste dieser Region 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, 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 Probenmaterial visualisiert.

### Informationen zur Sonde

Deletionen des langen Armes des Chromosoms 5 zählen zu den häufigsten karyotypischen Anomalien beim myelodysplastischen Syndrom (MDS) und der akuten myeloischen Leukämie (AML) mit durch Myelodysplasie verursachten Änderungen<sup>1,2</sup>.

Eine Teilgruppe der MDS-Patienten, die neben del(5q) keine weiteren zytogenetischen Anomalien aufweist, oder mit einer einzigen zusätzlichen Anomalie, die nicht das Chromosom 7 betrifft, weist eine Reihe konsistenter klinischer Merkmale auf, die als 5q-Syndrom bezeichnet werden<sup>1</sup>. Es ist der einzige MDS-Subtyp, der im Klassifikationssystem der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zytogenetisch definiert ist. Dieses Krankheitsbild mit <5 % Blasten hat eine günstigere Prognose. Patienten mit del(5q), die andere zytogenetische Anomalien oder übermäßig viele Blasten aufweisen, haben jedoch eine geringere Überlebensrate<sup>2,3</sup>.

Im Gegensatz zu de novo MDS ist die Prognose von AML mit del(5q) im Allgemeinen ungünstig, insbesondere wenn sie Teil eines komplexen Karyotyps ist<sup>4</sup>. Die Deletion von 5q wird auch häufig bei behandlungsbedingtem t-MDS und t-AML beobachtet, bei denen die Prognose besonders schlecht ist<sup>1</sup>.

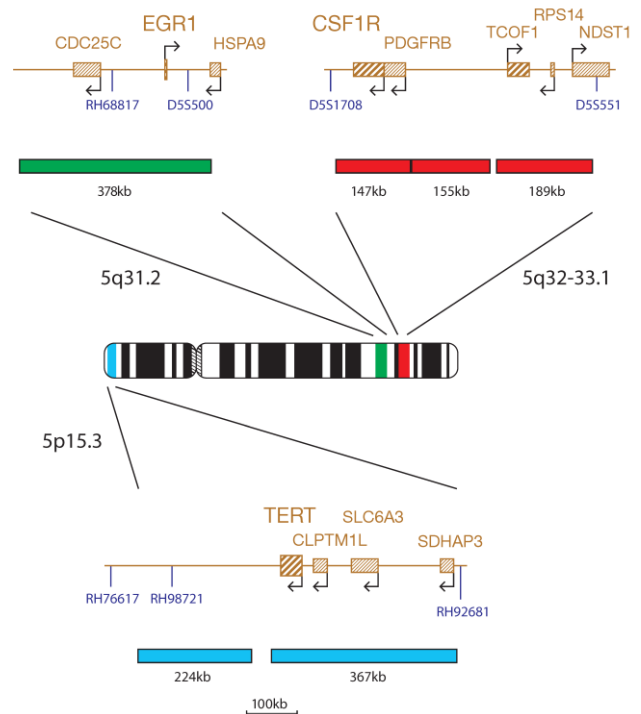
Für MDS und AML wurden zwei chromosomale Regionen auf Chromosom 5q abgebildet. Eine häufige deletierte Region bei 5q33 hängt mit dem 5q-Syndrom zusammen. Eine weitere, proximale Region, die sich bei 5q31 befindet, wurde mit einer aggressiveren Form von MDS und AML in Verbindung gebracht und tritt häufig im Zusammenhang mit zusätzlichen zytogenetischen Anomalien und einer schlechteren Prognose auf<sup>1,3,5</sup>.

Die CytoCell Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe erkennt Deletionen von EGR1 (frühe Wachstumsreaktion 1), einem Tumorsuppressorgen an 5q31. Es hat sich gezeigt, dass EGR1 durch Haploinsuffizienz zur Entstehung von MDS/AML führt<sup>6</sup>. Die Sonde weist auch Deletionen von RPS14 (ribosomales Protein S14) an 5q33.1 nach. Patienten mit MDS mit del(5q) sind haploinsuffizient für RPS14, was zu einer Beeinträchtigung der Ribosomenbiogenese führt und die Übersetzung von Genen und die Aktivierung von Proteinen beeinträchtigt, die an der Differenzierung und Apoptose beteiligt sind<sup>6</sup>. Die TERT-Gensonde (Telomerase Reverse Transkriptase) an 5p15.3 hilft, Fälle mit del(5q) von solchen mit Monosomie 5 zu unterscheiden.

### Spezifikation der Sonde

TERT, 5p15.3, Türkis  
EGR1, 5q31.2, Grün  
CSF1R, 5q32-33.1, Rot

CMP-H122 v001.00



Der Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe-Mix besteht aus drei unterschiedlichen Sonden. Die grüne Sonde (378kb) umfasst die Gene CDC25C und EGR1 sowie deren angrenzende Regionen, die die Marker RH68817 und D55500 enthalten. Der rote Sondensatz (147kb, 155kb und 189kb) befindet sich zwischen den Markern D551708 und D55511 und umfasst die Gene CSF1R, PDGFRB, TCOF1 und RPS14. Der türkise Sondensatz (224kb und 367kb) befindet sich zwischen den Markern RH76617 und RH92681 und umfasst die Gene TERT, CLPTM1L, SLC6A3 und SDHAP3.

### 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.
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 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:

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

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

1. Zytogenetische Trocknungskammer

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

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

#### Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Benutzen Sie eine 100 Watt Quecksilberlampe oder eine gleichwertige Lampe sowie 60/63x oder 100x Plan-Apochromate als Objektiv 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]
Türkis	418	467
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 einfachen Bandfilter für das türkise Spektrum für eine optimale Visualisierung des türkisen Spektrums oder einen dreifachen Bandfilter für das rote/grüne/türkise Spektrum zur gleichzeitigen Visualisierung der grünen, roten und türkisen Fluorophore.

Überprüfen Sie das Fluoreszenzmikroskop vor dem Gebrauch, um sich von seiner einwandfreien Funktion zu überzeugen. Verwenden Sie Immersionsöl, das für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet ist und aufgrund seiner Formulierung eine geringe Autofluoreszenz aufweist. Mischen Sie DAPI-Antifade nicht mit Mikroskop-Immersionen, da dadurch die Signale verdeckt werden können. Befolgen Sie hinsichtlich der Lebensdauer der Lampe und 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>7</sup>.

#### Vorbereitung der Lösung

##### Ethanolösungen

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

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

##### 2x SSC Lösung

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

##### 0,4x SSC Lösung

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

##### 2x SSC, 0,05 % Tween-20 Lösung

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

#### FISH-Protokoll

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

#### Vorbereitung des Objektträgers

1. Leuchten Sie die Zellprobe auf einem Objektträger aus Glas aus. Lassen Sie den Objektträger trocknen. (Optional, falls eine zytogenetische 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).
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

- 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 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

- 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 Sonden-signal interpretiert werden kann.

### Auswertung der Ergebnisse

#### Beurteilung der Objektträgerqualität

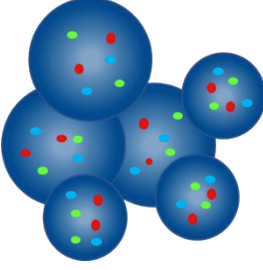
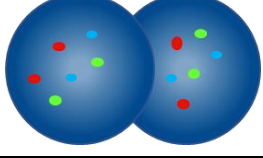
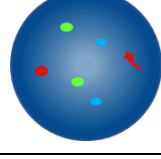
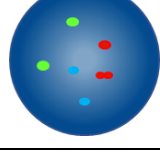
Der Objektträger sollte nicht analysiert werden, falls folgendes zutrifft:

- 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

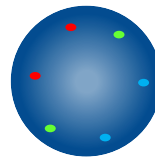
- Jede Probe sollte von zwei Analytikern analysiert und ausgewertet werden. Etwaige Unstimmigkeiten sind durch die Auswertung durch einen dritten Analytiker zu klären.
- Jeder Analytiker muss über eine angemessene Qualifikation verfügen, die den anerkannten nationalen Standards entspricht.
- Jeder Analytiker 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.
- 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 rote, zwei türkis- und zwei grüne Signale zählen – eines der beiden roten Signale ist diffus
	Als zwei rote, zwei türkis- und zwei grüne Signale zählen – die Lücke in einem roten Signal ist kleiner als zwei Signalbreiten

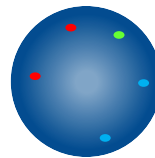
### Erwartete Ergebnisse

#### Erwartetes normales Signalmuster

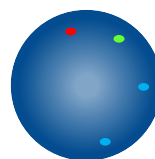


In einer normalen Zelle werden zwei türkis (A), zwei grüne (G) und zwei rote (R) Signale erwartet (2A2G2R).

#### Erwartete abnormale Signalmuster

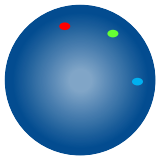


In einer Zelle mit einer hemizygoten Deletion von 5q31.2 entspricht das erwartete Signalmuster zwei türkis (A), einem grünen (G) und zwei roten (R) Signalen (2A1G2R).



In einer Zelle mit einer hemizygoten Deletion von 5q entspricht das erwartete Signalmuster zwei türkis (A), einem grünen (G) und einem roten (R) Signal (2A1G1R).





In einer Zelle mit Monosomie 5 entspricht das erwartete Signalmuster einem türkisen (A), einem grünen (G) und einem roten (R) Signal (1A1G1R).

Andere Signalmuster sind bei aneuploiden/unbalancierten Proben möglich.

#### Bekannte relevante Interferenzen/Störsbstanzien

Keine relevanten Interferenzen/Störsbstanzien 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. Sechs chromosomale Loci in jeder der zwanzig Metaphasezellen aus fünf Proben wurden analysiert, das ergibt 600 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 Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe

Ziel	Anzahl der hybridisierten Metaphase-Chromosomen	Anzahl der korrekt hybridisierten Loci	Analytische Spezifität	95 % Konfidenzintervall
5q32-33.1	200	200	100 %	98,12–100 %
5q31.2	200	200	100 %	98,12–100 %
5p15.33	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 Knochenmark 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 Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe

Probentyp	Sensitivitätskriterien	Sensitivitätsergebnis
Knochenmark	>95 %	98,9 % (98,50–99,30 %)

#### 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 Knochenmark 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 Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe

Probentyp	Signalmuster	Cut-off Ergebnis
Knochenmark	1A1G1R	2,34 %
	2A1G2R	2,34 %
	2A1G1R	6,26 %

Labore müssen die Cut-off-Werte anhand eigener Daten überprüfen<sup>8,9</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 4 Proben verwendet: 1 negative Knochenmarksprobe und 3 schwach positive Knochenmarksproben.

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 Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe

Variable	Probentyp	Übereinstimmung
Reproduzierbarkeit innerhalb eines Tages (Probe zu Probe) und an verschiedenen Tagen (Tag zu Tag)	Negatives Knochenmark	100 %
	Schwach positives Knochenmark (1A1G1R)	100 %
	Schwach positives Knochenmark (2A1G1R)	100 %
	Schwach positives Knochenmark (2A1G2R)	60 %
Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge	Negatives Knochenmark	100 %
	Schwach positives Knochenmark (1A1G1R)	100 %
	Schwach positives Knochenmark (2A1G1R)	100 %
	Schwach positives Knochenmark (2A1G2R)	58,3 %

#### Klinische Leistung

Um sicherzustellen, dass das Produkt beabsichtigte Neuordnungen erkennt, wurde die klinische Leistung in drei 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 durchgeführt. Die kombinierte Stichprobengröße für die drei Studien betrug 45 Proben, davon 13 positive und 32 negative Proben. Alle Proben wurden anonymisiert und randomisiert, um eine Verzerrung der Analyse zu vermeiden. Die Ergebnisse wurden mit dem bekannten 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 Del(5q) Plus Tri-Colour Deletion Probe

Variable	Ergebnis
Klinische Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate, TPR)	99,17 %
Klinische Spezifität (Richtig-Negativ-Rate, TNR)	99,65 %
Falsch-Positiv-Rate (FPR=1-Spezifität)	0,35 %

#### 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.ogt.com](http://www.ogt.com)

#### Referenzen

- Ebert BL. Best Pract Res Clin Haematol. 2010;23(4):457–461.
- Swerdlow, et al. (Hrsg.). WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Frankreich, 4. Ausgabe, IARC, 2017
- Fang J, Barker B, Bolanos L, et al. Cell Rep. 2014;8(5):1328–1338.
- Kanehira K, Ketterling RP, Van Dyke DL. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2010;14(3):314–316.
- Boulwood J, Pellagatti A, McKenzie ANJ, et al. Blut;116(26):5803–5811.
- Joslin JM, Fernald AA, Tennant TR, et al. Blood;110(2):719-726.
- Arsham, MS, Barch, MJ and Lawce HJ. (eds.) (2017) The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. Genet Med. 2011;13(7):667–675.
- Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. Genetics in

**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
	de: Vorsicht	5.4.4
	de: Medizinprodukt für die <i>In-vitro</i> -Diagnostik	5.5.1
	de: Menge reicht für <n> Tests	5.5.5
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 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