



A Sysmex Group Company



Istruzioni per l'uso (IFU)

REF: CE-LPH 036-S / CE-LPH 036

EV11 (MECOM) Breakpart Probe



SOLO PER USO PROFESSIONALE



Ulteriori informazioni e altre lingue disponibili su ogt.com/IFU

Uso previsto

CytoCell® EV11 (MECOM) Breakpart Probe è un test qualitativo, non automatizzato, d'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) utilizzato per rilevare riarrangiamenti cromosomici coinvolgenti la regione 3q26.2 sul cromosoma 3 in sospensioni cellulari di derivazione ematologica fissate in soluzione di Carnoy (metanolo/acido acetico 3:1) da pazienti con neoplasie mielodisplastiche (SMD) o leucemia mieloide acuta (LMA) con riarrangiamento di *MECOM* confermate o sospette.

Indicazioni per l'uso

Il presente dispositivo è ideato come aggiunta ad altri test clinici e istopatologici in percorsi diagnostici e di cura clinica riconosciuti, dove la conoscenza dello stato di riarrangiamento di *MECOM* sarebbe importante per la gestione clinica.

Limitazioni

Il presente dispositivo è ideato per rilevare riarrangiamenti con breakpoint nella regione coperta dai cloni rosso, verde e ciano in questo set di sonde, la quale include la regione *MECOM* (sonda verde), una regione telomerica rispetto al gene *MECOM* (sonda rossa) e una regione centromerica rispetto al gene *MECOM* (sonda ciano). I breakpoint esterni a queste regioni o riarrangiamenti varianti interamente contenuti in questa regione potrebbero non venire rilevati dal presente dispositivo.

Il presente dispositivo non è destinato all'utilizzo come diagnostica indipendente, test diagnostico di accompagnamento, test prenatale, screening basato sulla popolazione, analisi decentrate o autodiagnosi.

Il presente dispositivo non è stato convalidato per tipi di campione, tipi di patologie od obiettivi diversi da quelli specificati nell'uso previsto.

È concepito in aggiunta ad altri test diagnostici di laboratorio e l'azione terapeutica non deve essere messa in atto esclusivamente sulla base del risultato della FISH. La refertazione e l'interpretazione dei risultati della FISH devono essere eseguite da personale adeguatamente qualificato, devono essere coerenti con gli standard professionali della pratica medica e devono prendere in considerazione altri risultati di test rilevanti e informazioni cliniche e diagnostiche.

Il presente dispositivo è solo per uso professionale di laboratorio.

La mancata aderenza al protocollo può incidere sulle prestazioni e portare a risultati falsi positivi/negativi.

Principi del test

L'ibridazione *in situ* fluorescente (fluorescence in situ hybridization, FISH) è una tecnica che consente di rilevare sequenze di DNA su cromosomi in metafase o in nuclei interfasicci di campioni citogenetici fissati. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde di DNA in grado di ibridare cromosomi interi o singole sequenze uniche e rappresenta un potente strumento in aggiunta all'analisi citogenetica con bandeggio G. Tale tecnica può essere applicata oggi come strumento diagnostico essenziale nell'analisi cromosomica prenatale, ematologica e dei tumori solidi. Il DNA bersaglio, dopo fissazione e denaturazione, è disponibile per l'annealing con una sonda di DNA similmente denaturata, marcata con sostanza fluorescente, dotata di una sequenza complementare. Terminata l'ibridazione, la sonda di DNA non legata o legata in modo non specifico viene rimossa e il DNA viene colorato con un colorante di contrasto per essere visualizzato. L'utilizzo della microscopia a fluorescenza permette quindi la visualizzazione della sonda ibridata sul materiale bersaglio.

Informazioni sulla sonda

L'oncogene *MECOM* (locus complesso di MDS1 e EVI1) su 3q26.2 presenta spesso un riarrangiamento nei tumori ematologici di origine mieloide, tra cui neoplasie mielodisplastiche (SMD) e leucemia mieloide acuta (LMA) con riarrangiamento di *MECOM*. La sua espressione nelle cellule mieloidi neoplastiche altera la differenziazione mieloide, la regolazione del ciclo cellulare e le vie di segnalazione cellulare¹.

L'espressione deregolata è spesso dovuta a un riarrangiamento cromosomico che coinvolge 3q26.2, le due aberrazioni più comuni (~40%) essendo t(3;3)(q21;q26.2) e inv(3)(q21q26.2)¹. Sono stati descritti oltre 30 ulteriori riarrangiamenti di 3q26.2, molti dei quali caratterizzati a livello molecolare¹.

I breakpoint per le traslocazioni e inversioni variano in modo considerevole. I riarrangiamenti di *MECOM* sono molto eterogenei e possono essere difficili da rilevare mediante la citogenetica convenzionale, rendendo la FISH uno strumento utile per il loro rilevamento. Le regioni con breakpoint t(3;3)(q26.2;q26.2) varianti possono estendersi dal 3' prossimale di *MECOM* al 5' distale del promotore MDS1-EVI1, coperto dalla sonda verde. Pertanto, il profilo di segnale atteso per queste traslocazioni varia a seconda della posizione del breakpoint². L'esecuzione di test per i riarrangiamenti di *MECOM* è consigliata sia per SMD che per LMA³.

La LMA con riarrangiamento di *MECOM* è una malattia aggressiva con sopravvivenza scarsa indipendentemente dalla percentuale di blasti, senza alcuna differenza per quanto riguarda l'esito tra casi con inv(3)/t(3;3) rispetto a riarrangiamenti di *MECOM* con altri partner¹. La stratificazione del rischio per SMD incorpora variabili quali l'età, la gravità delle citopenie e i riscontri citogenetici¹.

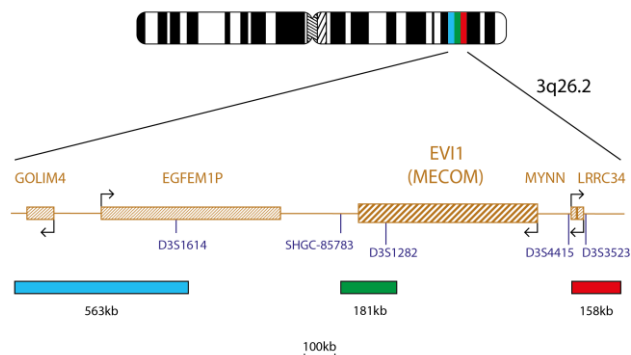
Specifiche della sonda

EV11, 3q26.2, rosso

EV11, 3q26.2, verde

EV11, 3q26.2, ciano

CMP-H021 v008.00



La componente di colore rosso del mix della sonda di EVI1 consiste di una sonda di 158 kb telomerica rispetto al marcatore D3S4415 che include il gene *LRRC34*. La componente di colore verde copre una regione di 181 kb che include la parte centromerica del gene *EVI1 (MECOM)* e al di là del marcatore D3S1282. La componente di colore ciano copre una regione di 563 kb centromerica rispetto al gene *EVI1*, che include il marcatore D3S1614.

Materiali forniti

Sonda: 50 µL per fiala (5 test) o 100 µL per fiala (10 test)

Le sonde sono fornite premiscelate nella soluzione d'ibridazione (formamide <65%; destrano solfato <20 mg; soluzione salina - citrato di sodio (SSC) 20x <10%) e sono pronte all'uso.

Colorante di contrasto: 150 µL per fiala (15 test)

Il colorante di contrasto è DAPI Antifade ES (DAPI (4,6-diammidino-2-fenilindolo) 0,125 µg/mL in mounting medium a base di glicerolo).

Avvertenze e precauzioni

1. Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale di laboratorio.
2. Le miscele di sonde contengono formamide, una sostanza teratogena; non respirare fumi ed evitare il contatto con la pelle. Maneggiare con cura; indossare guanti e un camice da laboratorio.
3. Maneggiare DAPI con cura; indossare guanti e un camice da laboratorio.
4. Non utilizzare se la fiala o le fiale sono danneggiate o se il contenuto è in qualche modo compromesso.
5. Attenersi ai regolamenti sullo smaltimento locali e alle raccomandazioni presenti nella Scheda di dati di sicurezza per garantire uno smaltimento sicuro del prodotto. Ciò si applica anche al contenuto di kit di test danneggiati.
6. Smaltire tutti i reagenti usati e i materiali monouso contaminati attenendosi alle procedure per i rifiuti infetti o potenzialmente infetti. È responsabilità di ciascun laboratorio maneggiare i rifiuti solidi e liquidi secondo la rispettiva natura e il livello di pericolosità, gestendoli e smaltendoli (o disponendone la gestione e lo smaltimento) nel rispetto dei regolamenti applicabili.
7. Gli operatori devono essere in grado di distinguere i colori rosso, blu e verde.
8. La mancata aderenza al protocollo descritto e ai reagenti può incidere sulle prestazioni e portare a risultati falsi positivi/negativi.
9. La sonda non deve essere diluita o miscelata con altre sonde.
10. Il mancato utilizzo di 10 µL di sonda durante la fase di pre-denaturazione del protocollo può incidere sulle prestazioni e portare a risultati falsi positivi/negativi.

11. Tutti i prodotti devono essere convalidati prima dell'uso.
12. I controlli interni devono essere eseguiti utilizzando popolazioni di cellule inalterate nei campioni di prova.

Definizioni delle temperature

- 20 °C / Congelato / In congelatore: da -25 °C a -15 °C
- 37 °C: +37 °C ± 1 °C
- 72 °C: +72 °C ± 1 °C
- 75 °C: +75 °C ± 1 °C
- Temperatura ambiente (TA): da +15 °C a +25 °C

Conservazione e manipolazione

 Conservare il kit in congelatore ad una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta del kit. Conservare le fiale della sonda e del colorante di contrasto al buio.



La sonda FISH, il colorante da contrasto DAPI Antifade ES e la soluzione d'ibridazione rimangono stabili durante i cicli di congelamento-scongelamento sperimentati durante l'uso normale (dove un ciclo rappresenta la rimozione della fiala dal congelatore e la sua ricollocazione all'interno di quest'ultimo): 5 cicli per la fiala da 50 µL (5 test) di FISH probe, 10 cicli per la fiala da 100 µL (10 test) di sonda FISH e 15 cicli per la fiala da 150 µL (15 test) di colorante di contrasto. L'esposizione alla luce deve essere ridotta al minimo ed evitata ove possibile. Conservare i componenti nel contenitore a tenuta di luce fornito. I componenti utilizzati e conservati in condizioni diverse da quelle indicate sull'etichetta potrebbero avere prestazioni diverse da quelle attese e influenzare negativamente i risultati del test. È necessario intraprendere ogni possibile sforzo per limitare l'esposizione alla luce e alle variazioni di temperatura.

Apparecchiature e materiali necessari ma non forniti

È necessario utilizzare apparecchiature calibrate:

- Piastra riscaldante (con una piastra solida e un controllo accurato della temperatura fino a 80 °C)
- Micropipette e puntali a volume calibrato variabile compreso tra 1 µL e 200 µL
- Bagno termostatico con controllo accurato della temperatura a 37 °C e 72 °C
- Provette da microcentrifuga (0,5 mL)
- Microscopio a fluorescenza (vedere la sezione Configurazione ottimale del microscopio a fluorescenza)
- Microscopio a contrasto di fase
- Contenitori di Coplin in plastica trasparente, ceramica o vetro resistente al calore
- Pinzette
- Misuratore di pH calibrato (o strisce indicatrici di pH capaci di misurare valori di pH da 6,5 a 8,0)
- Contenitore umidificato
- Olio per immersione per l'obiettivo del microscopio a fluorescenza
- Centrifuga da banco
- Vetrini da microscopia
- Coprioggetto 24x24 mm
- Timer
- Incubatore a 37 °C
- Colla per vetrini
- Miscelatore a vortice
- Cilindri graduati
- Agitatore magnetico
- Termometro calibrato

Apparecchiature opzionali non fornite

- Camera di essiccazione per citogenetica

Reagenti necessari ma non forniti

- Soluzione salina - citrato salino di sodio (SSC) 20x
- Etanolo al 100%
- Tween-20
- Iodossido di sodio (NaOH) 1M
- Acido cloridrico (HCl) 1M
- Acqua purificata

Configurazione ottimale del microscopio a fluorescenza

Per una visualizzazione ottimale si raccomanda di utilizzare una lampada a mercurio da 100 watt o un equivalente e obiettivi planari apocromatici a immersione in olio 60/63x o 100x. I fluorofori utilizzati in questo set di sonde si ecciteranno ed emetteranno luce alle seguenti lunghezze d'onda:

Fluoroforo	Eccitazione _{max} [nm]	Emissione _{max} [nm]
Ciano	418	467
Verde	495	521
Rosso	596	615

Assicurarsi che filtri di eccitazione ed emissione appropriati, che coprono le lunghezze d'onda elencate sopra, siano montati sul microscopio.

Utilizzare un filtro singolo passabanda spettro ciano per una visualizzazione ottimale dello spettro ciano o un triplo filtro passabanda spettro rosso/spettro verde/spettro ciano per una visualizzazione simultanea dei fluorofori verdi, rossi e ciano.

Controllare il microscopio a fluorescenza prima dell'uso per garantire che funzioni correttamente. Utilizzare olio per immersione adatto alla microscopia a

fluorescenza e formulato in modo da avere una bassa autofluorescenza. Evitare di miscelare DAPI Antifade con l'olio per immersione per microscopia onde evitare l'oscuramento dei segnali. Seguire le raccomandazioni del fabbricante in relazione alla vita della lampada e all'età dei filtri.

Preparazione del campione

Il kit è progettato per l'utilizzo su sospensioni cellulari di derivazione ematologica, fissate in soluzione di Carnoy (metanolo/acido acetico 3:1), da pazienti con leucemia mieloide acuta (LMA) o neoplasie mielodisplastiche (SMD) confermate o sospette, le quali sono preparate secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituto. Preparare campioni essiccati all'aria su vetrini da microscopia secondo le procedure citogenetiche standard. L'AGT Cytogenetics Laboratory Manual contiene raccomandazioni per il prelievo, la coltura, la raccolta di campioni e per l'allestimento di vetrini⁴.

Preparazione delle soluzioni

Soluzioni di etanolo

Diluire etanolo al 100% con acqua purificata utilizzando i seguenti rapporti e miscelare accuratamente:

- Etanolo all'70%: 7 parti di etanolo al 100% per 3 parti di acqua purificata
 - Etanolo all'85%: 8,5 parti di etanolo al 100% per 1,5 parti di acqua purificata
- Conservare le soluzioni per un massimo di 6 mesi a temperatura ambiente in un contenitore a chiusura ermetica.

Soluzione SSC 2x

Diluire 1 parte di soluzione SSC 20x con 9 parti di acqua purificata e miscelare accuratamente. Controllare il pH e correggere a pH 7,0 mediante NaOH oppure HCl come richiesto. Conservare la soluzione per un massimo di 4 settimane a temperatura ambiente in un contenitore a chiusura ermetica.

Soluzione SSC 0,4x

Diluire 1 parte di soluzione SSC 20x con 49 parti di acqua purificata e miscelare accuratamente. Controllare il pH e correggere a pH 7,0 mediante NaOH oppure HCl come richiesto. Conservare la soluzione per un massimo di 4 settimane a temperatura ambiente in un contenitore a chiusura ermetica.

Soluzione SSC 2x, Tween-20 0,05%

Diluire 1 parte di soluzione SSC 20x con 9 parti di acqua purificata. Aggiungere 5 µL di Tween-20 per 10 mL e miscelare accuratamente. Controllare il pH e correggere a pH 7,0 mediante NaOH oppure HCl come richiesto. Conservare la soluzione per un massimo di 4 settimane a temperatura ambiente in un contenitore a chiusura ermetica.

Protocollo FISH

(Nota: durante l'intera procedura limitare l'esposizione della sonda e del colorante di contrasto alle luci di laboratorio).

Preparazione dei vetrini

- Caricare il campione cellulare su un vetrino da microscopia di vetro. Lasciare asciugare il vetrino. (**Facoltativo, se si utilizza una camera di essiccazione per citogenetica:** la camera deve essere utilizzata a una temperatura di circa 25 °C e un'umidità del 50% per un caricamento ottimale del campione cellulare. Se non è disponibile una camera di essiccazione per citogenetica, utilizzare una cappa aspirante come alternativa).
- Immergere il vetrino in SSC 2x per 2 minuti a temperatura ambiente (TA) senza agitare.
- Disidratare in una serie crescente di etanolo (70%, 85% e 100%), 2 minuti a TA per ciascuna gradazione.
- Lasciare asciugare il vetrino.

Pre-denaturazione

- Rimuovere la sonda dal congelatore e lasciarla riscaldare a TA. Centrifugare brevemente le provette prima dell'uso.
- Assicurarsi che la soluzione della sonda venga miscelata in modo uniforme mediante una pipetta.
- Prelevare 10 µL di sonda per ogni test e trasferirli in una provetta da microcentrifuga. Riporre velocemente la sonda rimanente nel congelatore.
- Porre la sonda e il vetrino del campione a preriscaldare su una piastra riscaldante a 37 °C (+/- 1 °C) per 5 minuti.
- Caricare 10 µL della miscela di sonde sul campione cellulare e coprire delicatamente con un coprioggetto. Sigillare con colla per vetrini e far asciugare completamente.

Denaturazione

- Denaturare il campione e la sonda contemporaneamente riscaldando il vetrino su una piastra riscaldante a 75 °C (+/- 1 °C) per 2 minuti.

Ibridazione

- Posizionare il vetrino in un contenitore umido a prova di luce a 37 °C (+/- 1 °C) per una notte.

Lavaggi post-ibridazione

- Rimuovere il DAPI dal congelatore e lasciarlo riscaldare a TA.
- Rimuovere attentamente il coprioggetto e tutte le tracce di colla.
- Immergere il vetrino in SSC 0,4x (pH 7,0) a 72 °C (+/- 1 °C) per 2 minuti, senza agitare.
- Far sgocciolare il vetrino e immergerlo in SSC 2x, Tween-20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi senza agitare.
- Far sgocciolare il vetrino e applicare 10 µL di DAPI Antifade su ciascun campione.
- Coprire con un coprioggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere che si sviluppi il colore lasciando il vetrino al buio per 10 minuti.

18. Analizzare con un microscopio a fluorescenza (vedere **Configurazione ottimale del microscopio a fluorescenza**).

Raccomandazioni per l'uso

- 1. L'eccessivo riscaldamento o l'invecchiamento dei vetrini potrebbe ridurre la fluorescenza del segnale.
- 2. Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti differenti rispetto a quelli forniti o raccomandati da Cytocell Ltd.
- 3. Utilizzare un termometro calibrato per la misura delle temperature delle soluzioni, dei bagni termostati e degli incubatori, in quanto queste temperature sono di importanza critica per le prestazioni ottimali del prodotto.
- 4. Le concentrazioni, il pH e le temperature della soluzione di lavaggio sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame non specifico della sonda e condizioni di stringenza troppo elevate possono condurre alla mancanza del segnale.
- 5. La denaturazione incompleta può tradursi in una mancanza del segnale, mentre una denaturazione eccessiva può anche tradursi in un legame non specifico.
- 6. Come esito di una sovra-ibridazione, possono verificarsi segnali aggiuntivi o imprevisti.
- 7. Prima di utilizzare il test per obiettivi diagnostici, è necessario ottimizzare il protocollo per i propri campioni.
- 8. Condizioni sub-ottimali possono avere come esito un legame non specifico che può essere interpretato erroneamente come segnale di sonda.

Interpretazione dei risultati

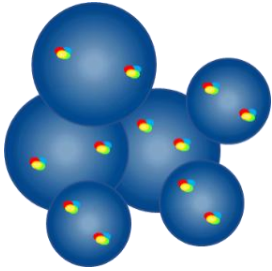
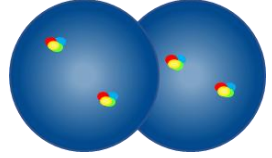
Valutazione della qualità dei vetrini

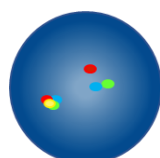
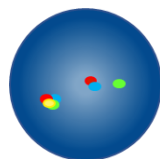
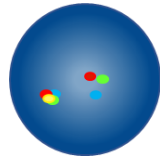
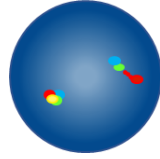
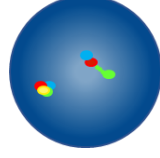
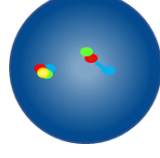
Il vetrino non deve essere analizzato se:

- I segnali sono troppo deboli da analizzare in filtri singoli; al fine di procedere con l'analisi, i segnali devono essere intensi, distinti e facilmente valutabili
- Sono presenti numerose cellule aggregate/sovrapposte che impediscono l'analisi
- L'ibridazione non è avvenuta in >50% delle cellule
- È presente un eccesso di particelle fluorescenti tra le cellule e/o una foschia fluorescente che interferisce con i segnali; in vetrini ottimali lo sfondo deve apparire scuro o nero e pulito
- I confini dei nuclei cellulari non possono essere distinti e non sono integri

Linee guida per l'analisi

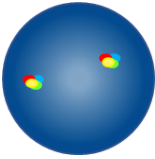
- Ogni campione deve essere analizzato e interpretato da due analisti. Eventuali discrepanze devono essere risolte mediante valutazione da parte di un terzo analista
- Ciascun analista deve essere adeguatamente qualificato secondo gli standard nazionali riconosciuti
- Ciascun analista deve valutare indipendentemente 100 nuclei per ciascun campione. Il primo analista deve iniziare l'analisi dal lato sinistro del vetrino e il secondo analista dal lato destro
- Ciascun analista deve documentare i propri risultati in fogli separati
- Analizzare solo nuclei integri, non sovrapposti o stipati, né coperti da detriti citoplasmatici o da un elevato grado di autofluorescenza
- Evitare le aree in cui è presente un eccesso di detriti citoplasmatici o di ibridazione non specifica
- L'intensità del segnale può variare, anche per un singolo nucleo. In tali casi, utilizzare filtri singoli e/o correggere il piano focale
- In condizioni sub-ottimali, i segnali possono apparire diffusi. Se due segnali dello stesso colore si toccano o se la distanza tra gli stessi non è maggiore di due larghezze del segnale, o quando vi è un filamento debole che connette i due segnali, contare come un segnale
- Quando si analizzano sonde breakapart a tre colori, se vi è uno spazio tra qualsiasi dei 3 segnali (rosso, verde, ciano) a distanza non maggiore di 2 lunghezze di segnale, contare come segnale non riarrangiato/fuso
- In caso di dubbio relativamente all'analizzabilità di una cellula, non analizzarla

Linee guida per l'analisi	
	Non contare: nuclei troppo vicini per determinarne i confini
	Non contare nuclei che si sovrappongono: non sono visibili tutte le aree dei due nuclei

	Contare come 2 segnali di fusione: lo spazio tra il segnale rosso e quello verde/ciano è minore di due lunghezze della sonda
	Contare come 2 segnali di fusione: lo spazio tra il segnale verde e quello rosso/ciano è minore di due lunghezze della sonda
	Contare come 2 segnali di fusione: lo spazio tra il segnale ciano e quello rosso/verde è minore di due lunghezze della sonda
	Contare come 2 segnali di fusione: nella fusione in alto a destra il segnale rosso è diffuso
	Contare come 2 segnali di fusione: nella fusione in alto a destra il segnale verde è diffuso
	Contare come 2 segnali di fusione: nella fusione in alto a destra il segnale ciano è diffuso

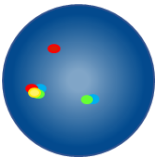
Risultati attesi

Profilo di segnale normale atteso

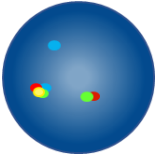


In una cellula normale, sono attesi due segnali di fusione rosso/verde/ciano (2RVC).

Profili di segnale anomalo attesi



In una cellula con t(3;3)(q21;26.2) o t(3;v)(q26.2;v), con breakpoint distali rispetto alla sonda verde, il profilo di segnale atteso sarà un segnale di fusione rosso/verde/ciano, una fusione verde/ciano e un segnale rosso (1RVC1VC1R).



In una cellula con inv(3)(q21q26.2) or a t(3;v)(q26.2;v), con breakpoint prossimali rispetto alla sonda verde, il profilo di segnale atteso sarà un segnale di fusione rosso/verde/ciano, una fusione rosso/verde e un segnale ciano (1RVC1RV1C).

Altri profili di segnale sono possibili in campioni aneuploidi/non bilanciati.

Interferenze rilevanti / sostanze interferenti note

Non sono note interferenze rilevanti / sostanze interferenti.

Nessuna reattività crociata nota.

Segnalazione di incidenti gravi

Per un paziente/utilizzatore/terza parte nell'Unione europea e nei Paesi con un regime normativo identico (Regolamento (UE) 2017/746 sui dispositivi medico-diagnostici *in vitro*); se durante l'utilizzo del presente dispositivo o in seguito al suo utilizzo si verificasse un incidente grave, si prega di segnalarlo al fabbricante o alla propria Autorità nazionale competente.
Per gli incidenti gravi verificatisi in altri Paesi, si prega di segnalarli al fabbricante e, se applicabile, alla propria Autorità nazionale competente.
Contatto di vigilanza del fabbricante: vigilance@ogt.com
Per le Autorità nazionali competenti europee, è possibile trovare un elenco dei punti di contatto di vigilanza all'indirizzo: https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

Caratteristiche specifiche di prestazione

Specificità analitica

La specificità analitica è definita come la percentuale di segnali che si ibridano al locus corretto e in nessun'altra localizzazione. Sono stati analizzati due loci cromosomici in ciascuna delle venti cellule in metafase provenienti da cinque campioni, ottenendo 200 punti di dati per componente. È stata mappata la localizzazione di ciascuna sonda ibridata ed è stato registrato il numero di segnali FISH di cromosomi in metafase che si sono ibridati al locus corretto.

La specificità analitica di ciascuna sonda nel kit è stata calcolata come il numero di segnali FISH di cromosomi in metafase che si sono ibridati al locus corretto diviso per il numero totale di segnali FISH ibridati di cromosomi in metafase, tale risultato è stato moltiplicato per 100, espresso come percentuale e dato con un intervallo di confidenza al 95%.

Tabella 1. Specificità analitica per EVI1 (MECOM) Breakapart Probe

Bersaglio	Numero di cromosomi in metafase ibridati	Numero di loci correttamente ibridati	Specificità analitica	Intervallo di confidenza al 95%
3q26.2	200	200	100%	98,12%-100%
3q26.2	200	200	100%	98,12%-100%
3q26.2	200	200	100%	98,12%-100%

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica è la percentuale di cellule in interfase valutabili che presentano il profilo di segnale normale atteso. È stato analizzato un minimo di 200 cellule in interfase per ciascuna delle 25 sospensioni cellulari fissate da midollo osseo ritenute negative per un riarrangiamento di *MECOM*, ottenendo come minimo la valutazione di 5.000 nuclei per ciascun tipo di campione. I dati relativi alla sensibilità sono stati analizzati in base alla percentuale di cellule che mostravano un profilo di segnale atteso normale ed espressi come percentuale con un intervallo di confidenza al 95%.

Tabella 2. Sensibilità analitica per EVI1 (MECOM) Breakapart Probe

Tipo di campione	Criteri di sensibilità	Risultato di sensibilità
Midollo osseo	>95%	99,14% (98,89%-99,39%)

Caratterizzazione dei valori di cut-off di normalità

Il cut-off di normalità è definito come la percentuale di cellule che mostrano un profilo di segnale falso positivo a cui un individuo sarebbe considerato normale e non coerente con una diagnosi clinica. È stato analizzato un minimo di 200 cellule in interfase in ciascuno di 25 campioni di midollo osseo ritenuti negativi per un riarrangiamento di *MECOM*, ottenendo come minimo la valutazione di 5.000 nuclei per ciascun tipo di campione.

Il valore di cut-off è stato determinato utilizzando la funzione β -inversa (BETAINV) in MS Excel. È stato calcolato come la percentuale di cellule in interfase che mostra un profilo di segnale falso positivo utilizzando il limite superiore di un intervallo unilaterale di confidenza al 95% della distribuzione binomiale in un campione di pazienti normali.

Tabella 3. Caratterizzazione dei valori di cut-off di normalità per EVI1 (MECOM) Breakapart Probe

Tipo di campione	Risultato di cut-off
Midollo osseo	4%

I laboratori devono verificare i valori di cut-off utilizzando i propri dati^{5,6}.

Riproducibilità

Sono stati eseguiti studi di riproducibilità per stabilire:

- La riproducibilità intra-giorno (da campione a campione) presso 3 siti
- La riproducibilità inter-giorno (da giorno a giorno) presso 3 siti
- La riproducibilità inter-sito presso 3 siti (da sito a sito)
- La riproducibilità inter-lotto (da lotto a lotto) per sito singolo

La riproducibilità è stata stabilita da 3 singoli laboratori che hanno analizzato in totale 12 campioni in cieco, 6 per profilo di segnale (2 campioni negativi per il riarrangiamento, 2 campioni positivi bassi pari a 1-3 volte il valore di cut-off e 2 campioni positivi alti contenenti più del 45% di cellule positive per il riarrangiamento). L'analisi è stata condotta utilizzando 2 replicati di ciascun campione nel corso di 5 giorni non consecutivi.

Tutti e 3 i siti hanno condotto un'analisi intra-giorno, inter-giorno e inter-sito utilizzando lo stesso lotto di sonde e uno dei siti ha condotto inoltre un'analisi di riproducibilità inter-lotto utilizzando 3 lotti differenti di sonde.

I risultati sono stati presentati come l'accordo globale con la classe negativa prevista (per i campioni negativi) e la classe positiva prevista (per i campioni positivi).

Tabella 4a. Riproducibilità e precisione per EVI1 (MECOM) Breakapart Probe – Profilo di segnale con inversione

Variabile	Tipo di campione	Accordo
Riproducibilità intra-giorno (da campione a campione), inter-giorno (da giorno a giorno) e inter-sito (da sito a sito)	Midollo osseo negativo	100%
	Midollo osseo positivo basso	63%
	Midollo osseo positivo alto	100%
Riproducibilità inter-lotto (da lotto a lotto)	Midollo osseo negativo	92%
	Midollo osseo positivo basso	67%
	Midollo osseo positivo alto	100%

Tabella 4b. Riproducibilità e precisione per EVI1 (MECOM) Breakapart Probe – Profilo di segnale con traslocazione

Variabile	Tipo di campione	Accordo
Riproducibilità intra-giorno (da campione a campione), inter-giorno (da giorno a giorno) e inter-sito (da sito a sito)	Midollo osseo negativo	100%
	Midollo osseo positivo basso	98%
	Midollo osseo positivo alto	100%
Riproducibilità inter-lotto (da lotto a lotto)	Midollo osseo negativo	100%
	Midollo osseo positivo basso	100%
	Midollo osseo positivo alto	100%

È stato condotto un ulteriore studio di riproducibilità per integrare i risultati positivi bassi per il profilo di segnale con inversione, utilizzando 2 campioni con diversi livelli di bassa positività (valori di cut-off 2x e 4x) e 1 campione negativo per stabilire:

- La riproducibilità intra-giorno (da campione a campione) per sito singolo
- La riproducibilità inter-giorno (da giorno a giorno) per sito singolo
- La riproducibilità inter-operatore (da operatore a operatore) per sito singolo.

La riproducibilità è stata stabilita utilizzando 1 lotto della sonda e la valutazione è stata eseguita da 2 operatori diversi su 2 replicati di ciascun campione effettuando i test per 5 giorni non consecutivi.

I risultati sono stati presentati come l'accordo globale con la classe positiva prevista (per i campioni positivi).

Tabella 4c. Ulteriori dati a supporto della riproducibilità e precisione di EVI1 (MECOM) Breakapart Probe – Profilo di segnale con inversione

Variabile	Tipo di campione	Accordo
Riproducibilità intra-giorno (da campione a campione), inter-giorno (da giorno a giorno), intra-operatore (da operatore a operatore)	Midollo osseo positivo basso (cut-off 2x)	100%
	Midollo osseo positivo basso (cut-off 4x)	100%

Prestazioni cliniche

Per assicurarsi che il prodotto rilevi i riarrangiamenti desiderati, è stata stabilita la prestazione clinica nel corso di 3 studi su campioni rappresentativi della popolazione prevista per il prodotto: sospensioni cellulari di derivazione ematologica, fissate in soluzione di Carnoy (metanolo/acido acetico 3:1), da pazienti con leucemia mieloide acuta (LMA) o neoplasie mielodisplastiche (SMD) confermate o sospette. Gli studi disponevano di un campione combinato di centodiciotto (118) provini, con una popolazione bersaglio di sette (7) positivi per la traslocazione e centoundici (111) negativi per la traslocazione e un campione combinato di centodiciannove (119) provini comprendenti centoundici (111) campioni negativi per l'inversione e otto (8) campioni positivi per l'inversione. I risultati sono stati confrontati con lo stato noto del campione. È stato riscontrato che la concordanza/discordanza dei risultati soddisfaceva i criteri di accettabilità per questo studio.

I risultati di tali test sono stati analizzati al fine di fornire la sensibilità clinica, la specificità clinica e il valore del tasso di falsi positivi (false positive rate, FPR) per segnali positivi, utilizzando un approccio unidimensionale.

Tabella 5. Prestazione clinica per EVI1 (MECOM) Breakapart Probe – Traslocazione

Variabile	Risultato
Sensibilità clinica (tasso di veri positivi [true positive rate, TPR])	99,94%
Specificità clinica (tasso di veri negativi [true negative rate, TNR])	99,97%
Tasso di falsi positivi (FPR) = 1 – Specificità	0,03%

Tabella 6. Prestazione clinica per EVI1 (MECOM) Breakapart Probe – Inversione.

Variabile	Risultato
Sensibilità clinica (tasso di veri positivi [true positive rate, TPR])	96,26%
Specificità clinica (tasso di veri negativi [true negative rate, TNR])	99,28%
Tasso di falsi positivi (FPR) = 1 – Specificità	0,72%

Sintesi relativa alla sicurezza e alla prestazione (SSP)

La SSP sarà resa disponibile al pubblico tramite il database europeo sui dispositivi medici (Eudamed), dove è collegata all'UDI-DI di base.
URL di Eudamed: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>
UDI-DI di base: 50558449LPH036JL

Qualora Eudamed non fosse del tutto operativo, la SSP sarà resa disponibile al pubblico su richiesta tramite email all'indirizzo SSP@ogt.com.

Informazioni aggiuntive

Per informazioni aggiuntive sul prodotto contattare il Dipartimento di Assistenza Tecnica CytoCell.
Tel.: +44 (0)1223 294048
E-mail: techsupport@cytoCELL.com
Sito web: www.ogt.com

Bibliografia

1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Haematolymphoid tumours [Internet; beta version ahead of print]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2022 [cited 2023 December 21]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 11). Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>

2. Ottema et al. Atypical 3q26/MECOM rearrangements genocopy inv(3)/t(3;3) in acute myeloid leukemia. *Blood* (2020)136(2):224–234.

3. Rack et al., Leukemia (2019) 33:1851–1867

4. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.

5. 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.

6. Wiktor AE, Dyke DL 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.

Glossario dei simboli

EN ISO 15223-1:2021 - “Dispositivi medici - Simboli da usare con le informazioni fornite dal fabbricante - Parte 1: Requisiti generali” (© International Organization for Standardization)		
Simbolo	Titolo	Numero/i di riferimento
	it: Fabbricante	5.1.1
	it: Rappresentante autorizzato nella Comunità europea/Unione europea	5.1.2
	it: Data di scadenza	5.1.4
	it: Codice lotto	5.1.5
	it: Numero di catalogo	5.1.6
	it: Tenere lontano dalla luce del sole	5.3.2
	it: Limite di temperatura	5.3.7
	it: Consultare le istruzioni per l'uso	5.4.3
	it: Consultare le istruzioni per l'uso in formato elettronico	5.4.3
	it: Attenzione	5.4.4
	it: Dispositivo medico-diagnostico in vitro	5.5.1
	it: Contenuto sufficiente per <n> test	5.5.5
	it: Identificativo unico del dispositivo	5.7.10
Simboli EDMA per reagenti e componenti dell'IVD, revisione ottobre 2009		
Simbolo	Titolo	Numero/i di riferimento
	it: Contenuto (o contiene)	N/A

Brevetti e marchi commerciali

CytoCell è un marchio registrato di CytoCELL Limited.


CytoCELL Limited
Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
REGNO UNITO

Tel.: +44 (0)1223 294048
Fax: +44 (0)1223 294986
E-mail: probes@cytoCELL.com
Sito web: www.ogt.com


Sysmex Europe SE
Bornbarch 1
22848 Norderstedt
GERMANIA

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

Cronologia delle versioni delle IFU
V001 2023-07-25: Nuove IFU per il Regolamento (UE) 2017/746
V002 2025-08-29: Rimozione del marchio UKCA.