



A Sysmex Group Company



Istruzioni per l'uso (IFU)

RIF: CE-LPH 013-S / CE-LPH 013

MLL (KMT2A) Breakapart Probe



SOLO PER USO PROFESSIONALE



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

Uso previsto

Cytocell® MLL (KMT2A) Breakapart Probe è un test qualitativo, non automatizzato, d'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) utilizzato per rilevare riarrangiamenti cromosomici nella regione 11q23.3 sul cromosoma 11 in sospensioni cellulari derivate ematologicamente fissate in soluzione di Carnoy (metanolo/acido acetico 3:1) da pazienti con leucemia mieloide acuta (LMA), sindromi mielodisplastiche (SMD) o leucemia linfoblastica acuta (LLA) confermate o sospette.

Indicazioni per l'uso

Questo dispositivo è ideato come aggiunta ad altri test clinici e istopatologici in percorsi diagnostici e di cura clinica riconosciuti, dove la conoscenza dello stato dei riarrangiamenti di *MLL (KMT2A)* sarebbe importante per la gestione clinica.

Limitazioni

Il presente dispositivo è ideato per individuare riarrangiamenti con breakpoint nella regione coperta dai cloni rosso e verde in questo set di sonde, la quale include il gene *MLL (KMT2A)*. I breakpoint esterni a questa regione o riarrangiamenti varianti interamente contenuti in questa regione potrebbero non venire rilevati da questo dispositivo.

Il presente dispositivo non è destinato a: 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 interfascici di campioni citogenetici fissati. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde di DNA in grado di ibridare per 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 nei tumori solidi. Il DNA bersaglio, dopo fissazione e denaturazione, è disponibile per l'annealing per una sonda di DNA similmente denaturata, marcata con sostanza fluorescente, a 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 da contrasto. L'utilizzo della microscopia a fluorescenza permette quindi la visualizzazione della sonda ibridata sul materiale target.

Informazioni sulla sonda

Il gene *KMT2A* (lisina metiltransferasi 2A) localizzato in 11q23.3 è di solito riarrangiato nelle leucemie acute, specialmente nella leucemia infantile e nella leucemia secondaria, a seguito di trattamento con inibitori della DNA-topoisomerasi II¹.

Il gene *KMT2A* ha elevata omologia con il gene trithorax di *Drosophila* e codifica per una istone metiltransferasi, che agisce come regolatore epigenetico della trascrizione. Le traslocazioni di *KMT2A* hanno come esito la produzione di una proteina chimerica in cui la porzione ammino-terminale di *KMT2A* è fusa alla porzione carbossi-terminale del gene partner di fusione. La proteina funzionale ha un ruolo cruciale nello sviluppo dell'embrione e nell'ematopoiesi^{1,2,3,4}.

È possibile rilevare riarrangiamenti di *KMT2A* in circa l'80% dei neonati con leucemia linfoblastica acuta (LLA) e nel 5–10% delle LLA di età pediatrica e adulta^{3,4}. Possono inoltre essere rilevati nel 60% delle leucemie mieloidi acute (LMA) e nel 3% dei casi di LMA de novo e nel 10% dei casi di LMA correlati a terapia negli adulti^{3,5}. Al momento, sono stati individuati più di 70 partner e le traslocazioni più comuni sono *MLL::AFF1*; t(4;11)(q21;q23.3), *MLL::MLLT4*; t(6;11)(q27;q23.3), *MLL::MLLT3*; t(9;11)(p22;q23.3) e *MLL::MLLT1*; t(11;19)(q23.3;p13.3)¹.

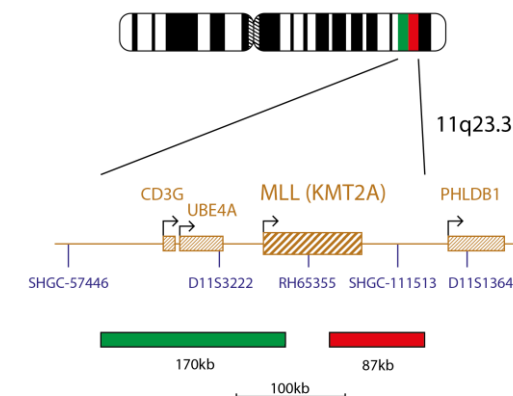
Storicamente, i riarrangiamenti di *KMT2A* nella leucemia acuta sono stati associati a un esito sfavorevole, ma studi recenti hanno dimostrato che la prognosi dipende in modo notevole dal partner di fusione e può differire tra bambini e adulti¹.

Specifiche della sonda

MLL, 11q23.3, rosso

MLL, 11q23.3, verde

CMP-H036 v006.00



Il prodotto MLL è costituito da una sonda di 87 kb, marcata in rosso, che copre una regione telomerica rispetto al gene *MLL (KMT2A)* che include il marcatore SHGC-111513, e da una sonda verde che copre una regione di 170 kb centromerica rispetto al gene *MLL* che si estende nei geni *CD3G* e *UBE4A*.

Materiali forniti

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

Le sonde sono fornite già mescolate nella soluzione d'ibridazione (formammide < 65%; destrano solfato < 20 mg; citrato salino di sodio (SSC) 20x < 10%) e sono pronte all'uso.

Colorante da contrasto: 150 µL per fiala (15 test).

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

Avvertenze e misure precauzionali

1. Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale di laboratorio.
2. I mix di sonde contengono formammide, 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 tecnica di sicurezza per garantire uno smaltimento sicuro del prodotto. Ciò si applica anche al contenuto del kit di test danneggiato.
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 mescolata con altre sonde.
10. Il mancato utilizzo di 10 µL di sonda durante lo stadio 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 (room temperature, RT): da +15 °C a +25 °C

Conservazione e utilizzo

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 i flaconcini 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-scongellamento 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 da 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 tutti gli sforzi per limitare l'esposizione a variazioni di luce e temperatura.

Apparecchiature e materiali necessari ma non forniti

È necessario utilizzare apparecchiature calibrate:

- Piastra riscaldante (con una piastra solida e controllo accurato della temperatura fino a 80 °C)
- Micropipette a volume calibrato variabile compreso tra 1 µL–200 µL
- Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 37 °C e 72 °C
- Provette da microcentrifuga (0,5 ml)
- Microscopio a fluorescenza (riferirsi alla sezione Configurazione ottimale del microscopio a fluorescenza)
- Microscopio a contrasto di fase
- Contenitori di Coplin in plastica, ceramica o vetro resistente al calore
- Pinzette
- Misuratore calibrato del pH (o strisce indicatrici del pH capace di misurare pH da 6,5 a 8,0)
- Contenitore umidificato
- Olio per lenti a immersione 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

- Stufa per asciugatura citogenetica

Reagenti necessari ma non forniti

- Soluzione 20x di citrato salino di sodio (SSC)
- 100% etanolo
- Tween-20
- 1M sodio idrossido (NaOH)
- 1M acido idroclorico (HCl)
- Acqua purificata

Configurazione ottimale del microscopio a fluorescenza

Per una visualizzazione ottimale della sonda si raccomanda di utilizzare una lampada a mercurio da 100 watt e obiettivi Plan Apochromat 60/63x e 100x. I fluorofori utilizzati in questa sonda ecciteranno ed emetteranno alle seguenti lunghezze d'onda:

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

Assicurare un'eccitazione appropriata e assicurarsi che i filtri di emissione che coprono le lunghezze d'onda elencate sopra siano adatti al microscopio. Utilizzare un filtro triplo bandpass DAPI/spettro verde/spettro rosso o un filtro dual spettro verde/spettro rosso per una visualizzazione simultanea dei fluorofori verdi e rossi.

Controllare il microscopio a fluorescenza prima dell'uso per garantire che stia funzionando correttamente. Utilizzare un olio a immersione adatto alla microscopia a fluorescenza e formulato per bassa autofluorescenza. Evitare di mescolare DAPI Antifade con l'olio a immersione per microscopio poiché questo oscurerà i 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 ematologicamente derivate, fissate in soluzione di Carnoy (metanolo/acido acetico 3:1) pazienti con leucemia mieloide acuta (LMA), sindromi mielodisplastiche (SMD) o leucemia linfoblastica acuta (LLA) confermate o sospette, le quali sono preparate secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituto. Stendere i campioni essiccati su vetrini da microscopia secondo le procedure citogenetiche standard. L'AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* contiene raccomandazioni per il prelievo, la coltura, la raccolta di esemplari e per la realizzazione di vetrini⁶.

Preparazione della soluzione

Soluzioni di etanolo

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

- 70% etanolo - 7 parti 100% etanolo per 3 parti di acqua purificata
 - 85% etanolo - 8,5 parti 100% etanolo 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 2xSSC

Diluire 1 parte di soluzione 20xSSC con 9 parti di acqua purificata e miscelare in modo accurato. 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 0,4xSSC

Diluire 1 parte di soluzione 20xSSC con 49 parti di acqua purificata e miscelare in modo accurato. 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 2xSSC, 0,05% Tween-20

Diluire 1 parte di soluzione 20xSSC 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 da contrasto alle luci di laboratorio).

Preparazione del vetrino

- Caricare il campione cellulare su un vetrino da microscopia. Lasciare asciugare il vetrino. (**Facoltativo, se si utilizza una stufa per asciugatura citogenetica:** La camera deve essere azionata a un'umidità di circa 25 °C e al 50% di umidità per una caricatura del campione cellulare ottimale. Se non è disponibile una stufa per citogenetica, utilizzare una cappa fumaria come alternativa).
- Immergere il vetrino in 2xSSC per 2 minuti a temperatura ambiente (TA) senza agitazione.
- Disidratare in una serie di etanolo (70%, 85% e 100%), ciascuna per 2 minuti a TA.
- 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 sia miscelata in modo uniforme mediante una pipetta.
- Prelevare 10 µL di sonda per ogni test e inserirli in una provetta da microcentrifuga. Riporre velocemente la sonda rimanente nel congelatore.
- Posizionare la sonda e il vetrino del campione a preriscaldare su una piastra riscaldante a 37 °C (+/- 1 °C) per 5 minuti.
- Caricare 10 µL del mix di sonde sul campione cellulare e coprire delicatamente con un coprioggetto. Sigillare con soluzione collante gommosa 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 su un contenitore umido a prova di luce a 37 °C (+/- 1 °C) durante la notte.

Lavaggi post-ibridazione

- Rimuovere il DAPI dal congelatore e lasciarlo riscaldare a temperatura ambiente.
- Rimuovere attentamente il coprioggetto e tutte le tracce di colla.
- Lavare il vetrino in 0,4xSSC (pH 7,0) a 72 °C (+/- 1 °C) per 2 minuti, senza agitazione.
- Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
- Scolare i vetrini e applicare 10 µL di DAPI antifade su ciascun campione.
- Coprire con un coprioggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
- Analizzare con un microscopio a fluorescenza (vedere **Configurazione ottimale del microscopio a fluorescenza**).

Raccomandazioni per l'uso

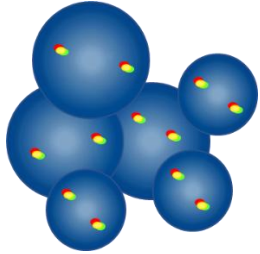
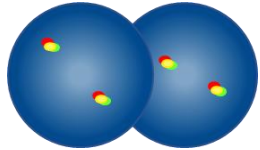
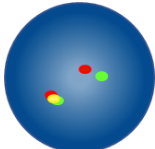
- 1. L'eccessivo riscaldamento o l'invecchiamento dei vetrini potrebbe ridurre la fluorescenza del segnale.
- 2. Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti differenti rispetto a quelli forniti o raccomandati da Cytocell Ltd.
- 3. L'utilizzo di un termometro calibrato è fortemente raccomandato per la misurazione delle temperature delle soluzioni, dei bagni termostatici e degli incubatori, in quanto queste temperature sono di fondamentale importanza per la performance ottimale del prodotto.
- 4. Le concentrazioni del lavaggio (stringenza), il pH e la temperatura 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.

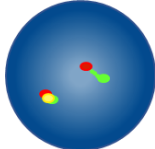
Interpretazione dei risultati
Valutazione della qualità dei vetrini

- 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 apparire brillanti, distinti e facilmente valutabili
 - Vi sono numerose cellule raggruppate/sovrapposte che impediscono l'analisi
 - > 50% delle cellule non è ibridato
 - Vi è un eccesso di particelle fluorescenti tra le cellule e/o una foschia fluorescente che interferisce con i segnali; in vetrini ottimali lo sfondo dovrebbe apparire scuro o nero e pulito
 - I confini del nucleo cellulare non possono essere distinti e non sono intatti

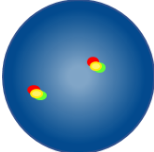
Linee guida di analisi

- 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 dare indipendentemente un punteggio a 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 intatti, non sovrapposti o affollati o nuclei coperti da detriti citoplasmatici o da un elevato grado di autofluorescenza
- Evitare aree dove vi è un eccesso di detriti citoplasmatici o ibridazione non specifica
- L'intensità del segnale può variare, anche con un singolo nucleo. In tali casi, utilizzare filtri singoli e/o correggere il piano focale
- In condizioni sub-ottimali, i segnali possono apparire confusi. Se due segnali dello stesso colore si toccano o la distanza tra di loro non è maggiore di due larghezze di segnale, o quando vi è un filamento debole che connette i due segnali, contare come un segnale
- Quando si analizzano sonde breakapart a due colori, se vi è uno spazio tra i segnali rosso e verde non più grande di 2 lunghezze di segnale, contare come segnale non riarrangiato/fuso
- In caso di dubbio se la cellula sia analizzabile o meno, non effettuare l'analisi.

Linee guida di analisi	
	Non contare - nuclei troppo vicini l'un l'altro per determinare confini
	Non contare nuclei che si sovrappongono - tutte le aree di entrambi i nuclei non sono visibili
	Contare come due segnali di fusione - lo spazio tra il segnale rosso e il segnale verde è minore di due lunghezze di segnale

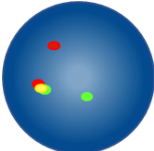
	Contare come due segnali di fusione - un segnale di fusione è diffuso
---	---

Risultati attesi
Modello di segnale normale atteso



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

Modello di segnale anormale atteso



In una cellula con riarrangiamento di MLL (KMT2A) bilanciato, il modello di segnale atteso sarà uno rosso, uno verde e una fusione rosso/verde (1F1R1V).

Altri modelli di segnale sono possibili in esemplari aneuploidi/non bilanciati.

Interferenze rilevanti note / sostanze interferenti
Non sono note interferenze rilevanti note / sostanze interferenti.

Reattività crociata nota
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 possibile, alla propria Autorità nazionale competente.
Contatto di vigilanza del fabbricante: vigilance@oqt.com
Per le Autorità nazionali competenti europee, è possibile trovare un elenco di punti 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 la percentuale di segnali che si ibridano al locus corretto e nessun'altra localizzazione. La specificità analitica è stata stabilita analizzando un totale di 200 loci bersaglio. Sono stati analizzati 2 loci cromosomici in ciascuna delle 20 cellule metafasiche provenienti da 5 campioni, ottenendo 200 punti di dati. La specificità analitica è stata calcolata come il numero di segnali FISH che si ibridano al locus corretto diviso per il numero totale di segnali FISH ibridati.

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 del 95%.

Tavola 1. Specificità analitica per MLL (KMT2A) Breakapart Probe

Sonda	Bersaglio	Numero di cromosomi in metafase ibridati	Numero di loci correttamente ibridati	Specificità analitica (%)	Intervallo di confidenza del 95% (%)
MLL Distale, Rosso	11q23.3	200	200	100	98,12–100
MLL prossimale, Verde	11q23.3	200	200	100	98,12–100

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica è la percentuale di cellule interfase cui è possibile fornire un punteggio con il modello di segnale normale atteso. È stato analizzato un minimo di 200 cellule in interfase per ciascuna delle 25 sospensioni cellulari di midollo osseo fissate in soluzione di Carnoy che sono state ritenute cariotipicamente normali, ottenendo come minimo la valutazione di 5000 nuclei per ciascun tipo di campione. I dati relativi alla sensibilità sono stati analizzati in base alla percentuale di cellule che mostra un modello di segnale atteso normale ed espressi come percentuale con un intervallo di confidenza del 95%.

Tavola 2. Sensibilità analitica per MLL (KMT2A) Breakapart Probe

Numero di cellule con modelli di segnale atteso	Numero totale di cellule con segnali valutabili	Sensibilità analitica (%)	Intervallo di confidenza del 95% (%)
4965	5000	99,3	99,08–99,52

Caratterizzazione dei valori normali di cut off

Il valore normale di cut off, in associazione con sonde FISH, è la percentuale massima di cellule interfase a cui è possibile fornire un punteggio con un modello di segnale anormale specifico in cui un campione è considerato normale per quel modello di segnale.

Il valore normale di cut off è stato stabilito mediante campioni negativi per il riarrangiamento che la sonda intende rilevare e la funzione beta inversa. Per ciascun campione, i modelli di segnale di 100 nuclei interfase sono stati registrati da due analisti indipendenti, con un totale di 200 per 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 modello di segnale falso positivo utilizzando il limite superiore di un intervallo unilaterale di confidenza del 95% della distribuzione binomiale in un campione normale di pazienti.

Tavola 3. Caratterizzazione dei valori normali di cut-off per MLL (KMT2A) Breakapart Probe

Modello di segnale anormale	Numero di campioni analizzati per generare cut off	Numero di nuclei valutati per campione	Numero massimo di modelli di segnale falsi positivi	Valore normale di cut off (%)
1R1V1F	1600	200	3	3,8

I laboratori devono verificare i valori di cut-off utilizzando i propri dati.^{7,8}

Riproducibilità

Sono stati eseguiti studi di riproducibilità per stabilire:

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

La riproducibilità è stata stabilita da tre singoli laboratori che hanno testato sei campioni in cieco (due negativi per il riarrangiamento, due campioni positivi bassi da 1 a 3 volte il cut off e due campioni positivi alti che contengono più del 45% di cellule positive per il riarrangiamento). L'analisi è stata condotta utilizzando due repliche di ciascun campione nel corso di cinque giorni non consecutivi.

Tutti i tre siti hanno condotto un'analisi intra-giorno, inter-giorno e inter-sito utilizzando lo stesso lotto di sonda, mentre uno dei centri ha condotto inoltre una riproducibilità inter-lotto utilizzando tre diversi lotti differenti di sonda. La riproducibilità è stata calcolata utilizzando l'accordo tra le variabili esaminate durante ciascun test.

Tavola 4. Riproducibilità per MLL (KMT2A) Breakapart Probe

Studio di riproducibilità	Campione	Accordo (%)
Intra-giorno/ inter-giorno / inter-sito	Classe di accordo negativo 90%	100%
	Classe di accordo altamente positivo 95%	100%
Inter-lotto	Classe di accordo negativo 90%	100%
	Classe di accordo altamente positivo 95%	100%

Prestazione clinica

Per assicurarsi che il prodotto rilevi i riarrangiamenti desiderati, è stata stabilita la prestazione clinica nel corso di tre studi retrospettivi condotti presso siti di analisi esterni. Gli studi avevano una dimensione dei campioni combinata di quattrocentottantotto (488), con diciotto (18) esemplari positivi e quattrocentosettanta (470) negativi su tutti i siti. Lo stato di positività di ciascun esemplare è stato confermato usando una sonda di confronto commerciale venduta da un fornitore concorrente che rileva le stesse anomalie delle sonde sotto esame, o mediante confronto con un cariotipo a bande G.

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 (FPR) per segnali positivi, utilizzando un approccio unidimensionale.

Tavola 5. Prestazione clinica per MLL (KMT2A) Breakapart Probe

Variabile	Risultato
Sensibilità clinica (tasso di veri positivi, TPR)	99,93%
Specificità clinica (tasso di veri negativi, TNR)	99,97%
Tasso di falsi positivi (FPR) = 1 - Specificità	0,03%

Riepilogo sulla sicurezza e le prestazioni (SSP)

L'SSP deve essere reso disponibile al pubblico tramite il database europeo sui dispositivi medici (Eudamed), dove esso è collegato al Basic UDI-DI. URL di Eudamed: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> Basic UDI-DI: 50558449LPH013J8

Qualora Eudamed non fosse del tutto operativo, l'SSP deve essere reso 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.
T: +44 (0)1223 294048
E-mail: techsupport@cytoCELL.com
Sito web: www.ogt.com

Bibliografia

- Tamai, Inokuchi, J Clin Exp Hematopathol 2010;50(2):91-98
- Wright, Vaughan, Critical Reviews in Oncology/Hematology 2014;91(3):283-291
- Van der Burg et al., Leukemia 2004;18(5):895-908
- Tomizawa, Pediatr Int 2015;57(8):811-819
- Grossman et al., Leukemia 28 March 2013; doi10.1038/leu.2013.90
- 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, 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.

Glossario dei simboli

EN ISO 15223-1:2021 - “Dispositivi medici - Simboli da usare con le informazioni fornite dal fabbricante - Parte 1: Requisiti generali” (© Organizzazione internazionale per la standardizzazione)		
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 del lotto	5.1.5
	it: Numero di catalogo	5.1.6
	it: Tenere lontano dalla luce	5.3.2
	it: Limite di temperatura	5.3.7
	it: Consultare le istruzioni per l'uso	5.4.3
 ogt.com/IFU	it: Consultare le istruzioni per l'uso in formato elettronico	5.4.3
	it: Attenzione	5.4.4
	it: Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>	5.5.1
	it: Contenuto 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: Contenuti (o contiene)	N/D

Brevetti e marchi registrati
CytoCell è un marchio registrato di Cytocell Limited.



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

T: +44 (0)1223 294048
F: +44 (0)1223 294986
E-mail: probes@cytocell.com
Sito web: www.ogt.com



Sysmex Europe SE
Bornbarch 1
22848 Norderstedt
GERMANIA

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

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