



A Sysmex Group Company



Istruzioni per l'uso

REF: LPH 036-S / LPH 036

EV11 (MECOM) Breakpart Probe



SOLO PER USO PROFESSIONALE



www.cytoCELL.com

Ulteriori informazioni e altre lingue disponibili su www.ogt.com

Limitazioni

Il presente dispositivo è ideato per individuare riarrangiamenti con breakpoint nella regione coperta dai cloni rosso, verde e blu in questo set di sonde, la quale include la regione *EV11 (MECOM)*. Breakpoint esterni a questa regione o riarrangiamenti varianti interamente contenuti in questa regione potrebbero non venire rilevati da questo prodotto.

Il test non è destinato a: utilizzo come diagnostica indipendente, test prenatale, screening basato sulla popolazione, test vicino al paziente o autodiagnosi. Questo prodotto è solo per uso professionale di laboratorio; tutti i risultati devono essere interpretati da personale adeguatamente qualificato, prendendo in considerazione altri risultati di test pertinenti.

Questo prodotto non è stato convalidato per l'utilizzo su tipi di campioni o tipi di patologie diversi da quelli specificati nell'uso previsto.

La refertazione e l'interpretazione dei risultati della FISH devono essere coerenti con gli standard professionali della pratica medica e devono prendere in considerazione altre informazioni cliniche e diagnostiche. Questo kit 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 mancata aderenza al protocollo può incidere sulle prestazioni e portare a risultati falsi positivi/negativi.

Il kit non è stato convalidato per fini diversi dall'uso previsto dichiarato.

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 leucemia mieloide acuta (LMA) o sindrome mielodisplastica (SMD) confermate o sospette.

Indicazioni

Questo prodotto è ideato come aggiunta ad altri test clinici e istopatologici in percorsi di assistenza diagnostica e clinica riconosciuti, dove la conoscenza dello stato di traslocazione di *EV11 (MECOM)* sarebbe importante per la gestione clinica.

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 interfasici 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. L'utilizzo della microscopia a fluorescenza permette quindi la visualizzazione della sonda ibridata sul materiale bersaglio.

Informazioni sulla sonda

Nei tumori ematologici di origine mieloide, l'oncogene *MECOM (locus complesso di MDS1 e EV11)* nella regione 3q26.2 presenta spesso un riarrangiamento.

Il gene *MECOM* codifica per una proteina a dito di zinco che è espressa in modo inappropriato nelle cellule leucemiche di circa il 2-5% dei pazienti con LMA e SMD¹. L'espressione deregolata è spesso dovuta a un riarrangiamento cromosomico che coinvolge 3q26.2, nel quale le due aberrazioni più comuni sono t(3;3)(q21;q26.2) e inv(3)(q21q26.2)¹. I breakpoint per le traslocazioni e inversioni variano in modo considerevole.

I breakpoint di inversione sono localizzati in posizione centromerica rispetto al gene *MECOM*, comprendendo tale gene, e coprono una lunghezza di circa 600 kb. La maggior parte dei breakpoint nelle traslocazioni di 3q26.2 si trova in posizione telomerica rispetto al gene *MECOM* e copre una regione che include l'estremità telomerica del gene *MDS1* e del gene *MYNN*².

I riarrangiamenti cromosomici che coinvolgono la regione 3q26.2 sono associati a tumori mieloidi maligni, espressione aberrante del gene *MECOM*, con una prognosi sfavorevole e un decorso clinico aggressivo².

La LMA con aberrazione inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2) è un'entità patologica riconosciuta secondo la classificazione dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) delle neoplasie mieloidi e delle leucemie acute. Si tratta di una LMA trasformata o de novo con un decorso clinico molto aggressivo e aberrazioni che coinvolgono il gene *MECOM* nella regione 3q26.2 e il gene *RPN1* (riboforina 1) nella regione 3q21³.

È stato inoltre dimostrato che il gene *MECOM* subisce un riarrangiamento in malattie correlate alla terapia mediante traslocazione t(3;21)(q26.2;q22), con conseguente fusione *MECOM-RUNX1*^{3,4}.

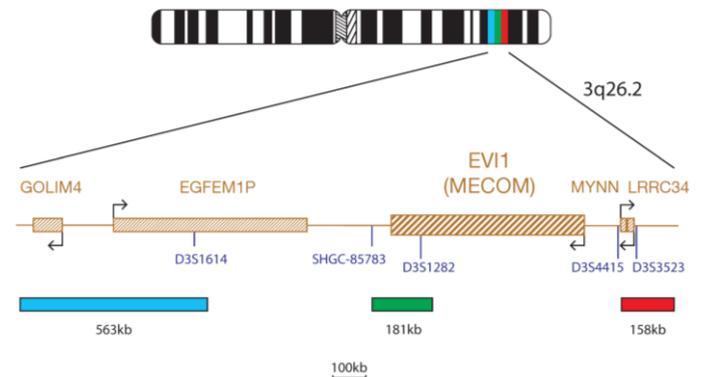
I riarrangiamenti di *MECOM* sono molto eterogenei e possono essere difficili da rilevare mediante la citogenetica convenzionale, rendendo la FISH uno strumento utile per la loro individuazione.

Specifiche della sonda

EV11, 3q26.2, rosso

EV11, 3q26.2, verde

EV11, 3q26.2, blu



La componente di colore rosso del mix della sonda EV11 consiste in una sonda di 158 kb telomerica rispetto al marcatore D3S4415 e include il gene *LRRC34*. La componente di colore verde copre una regione di 181 kb che include la parte centromerica del gene *EV11 (MECOM)*, estendendosi oltre il marcatore D3S1282. La componente di colore blu copre una regione di 563 kb centromerica rispetto al gene *EV11*, 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 (formammide, destrano solfato, citrato salino di sodio [SSC]) e sono pronte all'uso.

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

Il colorante di contrasto è DAPI Antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI [4,6-diamidino-2-fenilindolo]).

Avvertenze e precauzioni

1. Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale.
2. Quando si manipolano le sonde di DNA ed il colorante di contrasto DAPI è necessario indossare i guanti.
3. 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.
4. DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura; indossare guanti e un camice da laboratorio.
5. Smaltire tutti i materiali pericolosi nel rispetto delle linee guida dell'istituto relative allo smaltimento dei rifiuti pericolosi.
6. Gli operatori devono essere in grado di distinguere i colori rosso, blu e verde.
7. La mancata aderenza al protocollo descritto e ai reagenti può incidere sulle prestazioni e portare a risultati falsi positivi/negativi.
8. La sonda non deve essere diluita o miscelata con altre sonde.
9. 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.

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 rimane stabile nel corso dei cicli di congelamento-scongelo durante l'uso normale (dove un ciclo rappresenta la rimozione della sonda dal congelatore e la sua ricollocazione all'interno di quest'ultimo) ed è fotostabile fino a un massimo di 48 ore dopo essere stata esposta a condizioni di illuminazione continua. È necessario intraprendere ogni possibile sforzo per limitare l'esposizione a variazioni di luce e temperatura.

Apparecchiature e materiali necessari ma non forniti

È necessario utilizzare apparecchiature calibrate:

1. Piastra riscaldante (con una piastra solida e controllo accurato della temperatura fino a 80 °C)
2. Micropipette e puntali a volume calibrato variabile compreso tra 1 µl e 200 µl
3. Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 37 °C e 72 °C
4. Provette da microcentrifuga (0,5 ml)
5. Microscopio a fluorescenza (vedere la sezione Configurazione ottimale del microscopio a fluorescenza)
6. Microscopio a contrasto di fase
7. Contenitori di Coplin in plastica, ceramica o vetro resistente al calore
8. Pinzette
9. Misuratore di pH calibrato (o strisce indicatrici di pH capaci di misurare valori di pH da 6,5 a 8,0)
10. Contenitore umidificato
11. Olio per obiettivo a immersione del microscopio a fluorescenza
12. Centrifuga da banco
13. Vetrini da microscopia
14. Coprioggetto 24x24 mm
15. Timer
16. Incubatore a 37 °C
17. Colla per vetrini
18. Miscelatore a vortice
19. Cilindri graduati
20. Agitatore magnetico
21. Termometro calibrato

Apparecchiature opzionali non fornite

1. Camera di essiccazione per citogenetica

Reagenti necessari ma non forniti

1. Soluzione 20x di citrato salino di sodio (SSC)
2. Etanolo al 100%
3. Tween-20
4. Idrossido di sodio (NaOH) 1M
5. Acido cloridrico (HCl) 1M
6. 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 a immersione in olio 60/63x e 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

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 triplo filtro passabanda DAPI/spettro verde/spettro rosso o un doppio filtro passabanda spettro verde/spettro rosso per una visualizzazione simultanea ottimale dei fluorofori verdi e rossi. 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 concepito per l'utilizzo su sospensioni di cellule di derivazione ematologica, fissate in soluzione di Carnoy (metanolo/acido acetico 3:1) e preparate secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituto. Stendere i 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 vetrini⁵.

Preparazione della soluzione

Soluzioni di etanolo

Diluire l'etanolo al 100% con acqua purificata utilizzando i seguenti rapporti e miscelare accuratamente.

- Etanolo al 70%: 7 parti di etanolo al 100% per 3 parti di acqua purificata
 - Etanolo al 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 2xSSC

Diluire 1 parte di soluzione 20xSSC 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 0,4xSSC

Diluire 1 parte di soluzione 20xSSC 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 2xSSC, Tween-20 0,05%

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 di contrasto alle luci di laboratorio).

Preparazione del vetrino

1. Caricare il campione cellulare su un vetrino da microscopia. Lasciare asciugare il vetrino. (**Facoltativo, se si utilizza una camera di essiccazione per citogenetica:** i vetrini devono essere caricati utilizzando la 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).
2. Immergere il vetrino in 2xSSC per 2 minuti a temperatura ambiente (TA) senza agitare.
3. Disidratare in una serie crescente di etanolo (70%, 85% e 100%), 2 minuti a TA per ciascuna gradazione.
4. Lasciare asciugare il vetrino.

Pre-denaturazione

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

Denaturazione

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

Ibridazione

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

Lavaggi post-ibridazione

12. Rimuovere il DAPI dal congelatore e lasciarlo riscaldare a TA.
13. Rimuovere attentamente il coprioggetto e tutte le tracce di colla.
14. Immergere il vetrino in 0,4xSSC (pH 7,0) a 72 °C (+/- 1 °C) per 2 minuti, senza agitare.
15. Far sgocciolare il vetrino e immergerlo in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi senza agitare.
16. Far sgocciolare il vetrino e applicare 10 µl di DAPI Antifade su ciascun campione.
17. Coprire con un coprioggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere che si sviluppino il colore lasciando il vetrino al buio per 10 minuti.
18. Analizzare con un microscopio a fluorescenza (vedere **Configurazione ottimale del microscopio a fluorescenza**).

Stabilità dei vetrini allestiti

I vetrini allestiti restano analizzabili per un massimo di 1 mese se conservati al buio a temperatura pari o inferiore alla TA.

Raccomandazioni per l'uso

1. L'eccessivo riscaldamento o l'invecchiamento dei vetrini possono ridurre la fluorescenza del segnale
2. Le condizioni d'ibridazione possono 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 la temperatura delle soluzioni di lavaggio sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di ridotta stringenza possono

favorire un legame non specifico della sonda, mentre condizioni di elevata stringenza possono comportare l'assenza del segnale

5. La denaturazione incompleta può tradursi in una mancanza del segnale, mentre una denaturazione eccessiva può 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 fini diagnostici, è necessario ottimizzare il protocollo per i propri campioni
8. Condizioni sub-ottimali possono comportare un legame non specifico che può essere interpretato erroneamente come segnale della sonda

Interpretazione dei risultati

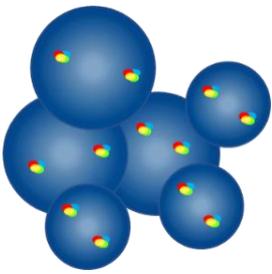
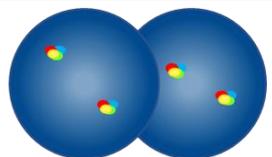
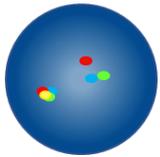
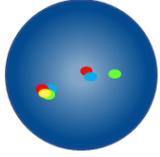
Valutazione della qualità dei vetrini

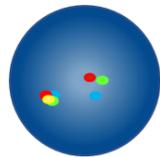
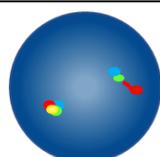
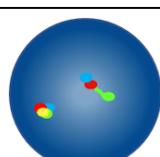
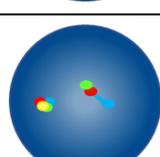
Il vetrino non deve essere analizzato se:

- 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 colore triplo, se vi è uno spazio tra i segnali rosso, verde e ciano a una distanza non più grande di due lunghezze del segnale, contare come segnale di non riarrangiamento/fusione
- In caso di dubbio se la cellula sia analizzabile o meno, non analizzarla

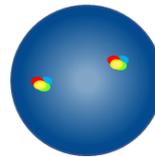
Linee guida per l'analisi	
	Non contare: nuclei troppo vicini per determinarne i confini
	Non contare nuclei che si sovrappongono: non sono visibili tutte le aree dei due nuclei
	Contare come 2 segnali di fusione: lo spazio tra il segnale rosso e il segnale verde/blu è minore di due lunghezze del segnale
	Contare come 2 segnali di fusione: lo spazio tra il segnale verde e il segnale rosso/blu è minore di due lunghezze del segnale

	Contare come 2 segnali di fusione: lo spazio tra il segnale blu e il segnale rosso/verde è minore di due lunghezze del segnale
	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 blu è diffuso

Risultati attesi

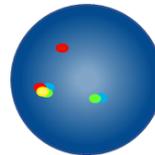
La strategia a tre colori mostra la presenza di una traslocazione o di un'inversione e consente di distinguere ciascun diverso tipo di riarrangiamento.

Profilo del segnale normale atteso

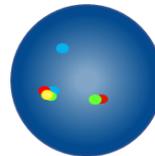


In una cellula normale, sono attesi due segnali rosso/verde/blu co-localizzati (2RVB).

Profili del segnale anormale atteso



In una cellula con traslocazione $t(3;nn)(q26.2;nn)$, il profilo del segnale atteso è un segnale rosso, un segnale di fusione verde/blu e un segnale di fusione rosso/verde/blu (1R, 1VB, 1RVB).



In una cellula con inversione $inv(3)(q21q26.2)$, il profilo del segnale atteso è un segnale di fusione rosso/verde, un segnale blu separato e un segnale di fusione rosso/verde/blu (1RV, 1B, 1RVB).

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

Reattività crociata nota

Nessuna reattività crociata nota.

Segnalazione di eventi avversi

Se si ritiene che il dispositivo abbia avuto un malfunzionamento o un deterioramento delle caratteristiche prestazionali che possono aver contribuito a un evento avverso (ad es., diagnosi ritardata o errata, trattamento ritardato o inappropriato), ciò deve essere segnalato immediatamente al fabbricante (email: vigilance@ogt.com).

Se pertinente, l'evento deve essere segnalato anche alla propria autorità nazionale competente. Un elenco di punti di vigilanza può essere reperito su: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Caratteristiche specifiche di prestazione

Specificità analitica

La specificità analitica è la percentuale di segnali di ibridazione al locus corretto e non ad altre regioni. La specificità analitica è stata stabilita analizzando un totale di 200 loci bersaglio. La specificità analitica è stata calcolata come il numero di segnali FISH di ibridazione al locus corretto diviso per il numero totale di segnali FISH di ibridazione.

Tabella 1. Specificità analitica per EV11 Breakapart Probe

Sonda	Locus bersaglio	N. di segnali di ibridazione al locus corretto	N. totale di segnali di ibridazione	Specificità (%)
Rosso EV11	3q26	200	200	100
Verde EV11	3q26	200	200	100
Blu EV11	3q26	200	200	100

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica è la percentuale di cellule in interfase valutabili che presentano il profilo del segnale normale atteso. La sensibilità analitica è stata stabilita analizzando cellule in interfase in differenti campioni normali. La sensibilità è stata calcolata come la percentuale di cellule valutabili che presentano il profilo del segnale atteso (con un intervallo di confidenza al 95%).

Tabella 2. Sensibilità analitica per EV11 Breakapart Probe

N. di cellule con profilo del segnale atteso	N. di cellule con segnali valutabili	Sensibilità (%)	Intervallo di confidenza al 95%
4.957	5.000	99,14	98,84 – 99,36

Caratterizzazione dei valori normali di cut-off

Il valore normale di cut-off, in relazione alle sonde FISH, è la percentuale massima di cellule in interfase valutabili che presentano uno specifico profilo del segnale anormale al di sotto della quale il campione è considerato normale per quel profilo del segnale.

Il valore normale di cut-off è stato stabilito utilizzando campioni negativi per lo specifico riarrangiamento rilevabile dalla sonda e la funzione beta inversa. Per ciascun campione, sono stati registrati i profili del segnale di 100 nuclei in interfase da parte di due analisti indipendenti, per un totale di 200 nuclei per campione.

Tabella 3. Caratterizzazione dei valori normali di cut-off per EV11 Breakapart Probe

Profilo del segnale anormale	Numero di campioni analizzati per generare il valore di cut-off	Numero di nuclei valutati per campione	N. massimo di profili del segnale falsi positivi	Valore normale di cut-off (%)
1R, 1VB, 1RVB	25	200	3	4
1RV, 1B, 1RVB	25	200	3	4

I laboratori devono verificare i valori di cut-off utilizzando i propri dati^{6, 7}.

Riproducibilità

La riproducibilità è stata stabilita da tre singoli laboratori che hanno analizzato sei campioni in cieco (due campioni negativi per il riarrangiamento, due campioni a bassa positività pari a 1-3 volte il valore di cut-off e due campioni a elevata positività contenenti più del 45% di cellule positive per il riarrangiamento). L'analisi è stata condotta utilizzando due replicati di ciascun campione nel corso di cinque giorni non consecutivi.

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

La riproducibilità è stata calcolata utilizzando l'accordo tra le variabili esaminate durante ciascun test.

Tabella 4. Riproducibilità e precisione per EV11 Breakapart Probe

Segnale	Studio di riproducibilità	Campione	Accordo (%)
Inversione (1RV, 1B, 1RVB)	Intra-giorno / inter-giorno / inter-sito	Negativo	100
		Altamente positivo	100
	Inter-lotto	Negativo	92
		Altamente positivo	100
Traslocazione (1R, 1VB, 1RVB)	Intra-giorno / inter-giorno / inter-sito	Negativo	100
		Altamente positivo	100
	Inter-lotto	Negativo	100
		Altamente positivo	100

Prestazione clinica

La prestazione clinica è stata stabilita utilizzando un gruppo rappresentativo di pazienti non selezionati inviati per LMA o SMD, con raccolta di 100 campioni dal sito. I tassi di incidenza dei riarrangiamenti rilevati dalla sonda sono stati confrontati con quelli raccolti da una revisione delle fonti in letteratura.

Per consentire questo confronto, l'intervallo di confidenza indicato in letteratura in una popolazione di dimensione pari a 100 campioni è stato calcolato come 1 – test delle proporzioni del campione con correzione di continuità.

Tabella 5. Prestazione clinica per EV11 Breakapart Probe

Riarrangiamento	Prevalenza			
	Revisione letteratura (%)	LCI 95% (%)	Studio clinico (%)	UCL 95% (%)
LMA con riarrangiamenti inv(3)/t(3;3)/MECOM	1,3	0,1	4	6,7
SMD con riarrangiamenti MECOM	0,4	0		5,3

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

- Soderholm *et al.*, Leukemia 1997;11:352-358
- Bobadilla *et al.*, Br J Haematol 2007;136:806-813
- Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
- Pedersen-Bjerggaard *et al.*, Leukemia 2008;22:240-248
- 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.

Guida ai simboli

REF	it: Numero di catalogo
	it: Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
	it: Codice lotto
	it: Consultare le istruzioni per l'uso
	it: Fabbricante
	it: Data di scadenza
	it: Limite di temperatura
	it: Tenere lontano dalla luce del sole
	it: Contenuto sufficiente per <n> test
	it: Contenuto

Brevetti e marchi commerciali

CytoCell è un marchio commerciale registrato di CytoCell Ltd.



CytoCell Ltd.
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.oqt.com