A Sysmex Group Company

CytoCell

Istruzioni per l'uso (IFU)

REF: CE-LPH 052-S / CE-LPH 052

P53 (TP53)/ATM Combination Deletion Probe

CE 2797 IVD

SOLO PER USO PROFESSIONALE

ogt.com/IFU

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

Uso previsto

CytoCell® P53 (TP53)/ATM Combination Deletion Probe è un test qualitativo, non automatizzato d'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) utilizzato per rilevare delezioni cromosomiche nella regione 11q22.3 sul cromosoma 11 e nella regione 17p13 sul cromosoma 17 in sospensioni cellulari derivate ematologicamente fissate in soluzione di Carnoy (3:1 metanolo/acido acetico) provenienti da pazienti con leucemia linfocitica cronica (LLC) confermata o sospetta.

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, nei quali la conoscenza dello stato di delezione di *P53* (*TP53*) o *ATM* sarebbe importante per la gestione clinica.

Limitazioni

Il presente dispositivo è ideato per individuare perdite genomiche più grandi della regione coperta dai cloni rosso e verde in questo set di sonde, che include le regioni *TP53* e *ATM*. Perdite genomiche esterne a tale regione o perdite parziali di questa regione potrebbero non venire rilevate da questo 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 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 per essere visualizzato. L'utilizzo della microscopia a fluorescenza permette quindi la visualizzazione della sonda ibridata sul materiale bersaglio.

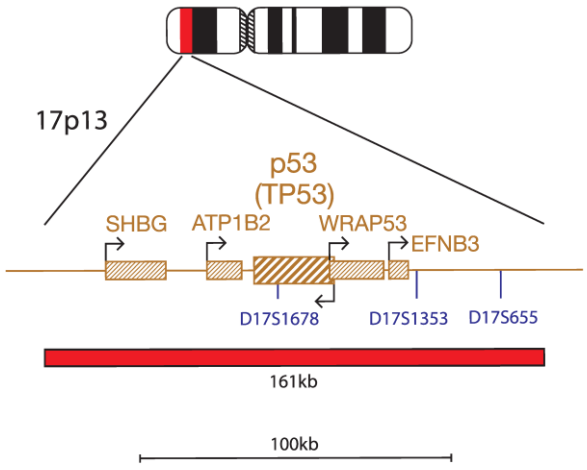
Informazioni sulla sonda

Il gene soppressore tumorale *TP53* (*proteina tumorale p53*) su 17p13 e il gene della protein-chinasi *ATM* (*serin-/treonin-chinasi ATM*) su 11q22.3, sono di frequente deleti nella leucemia linfocitica cronica (LLC). *TP53* è un importante gene soppressore di tumore; agisce come un potente fattore di trascrizione con ruolo fondamentale nella manutenzione della stabilità genetica[1]. La perdita di *TP53* viene segnalata nel 5-10% dei pazienti affetti da LLC ed è un biomarcatore prognostico sfavorevole che predice la resistenza alla chemioterapia[2,3,4]. *ATM* è un importante gene del checkpoint coinvolto nella gestione del danno cellulare[5]. La perdita di *ATM* viene segnalata nel 10-20% dei pazienti affetti da LLC[2]. Le delezioni di 11q e 17p rappresentano due delle più frequenti aberrazioni cromosomiche nella LLC; del(11q) rimuove *ATM*, mentre del(17p) comporta la perdita di *TP53*[4].

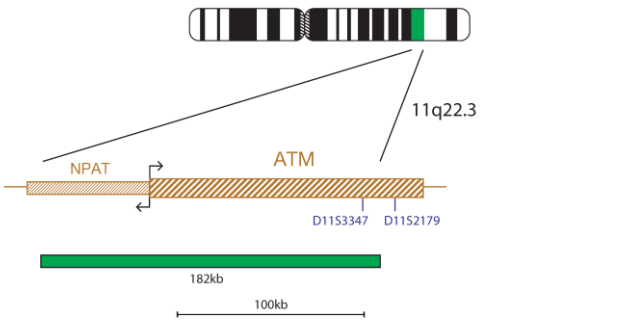
Specifiche della sonda

P53, 17p13, rosso
ATM, 11q22.3, verde

CMP-H040 V005.00



CMP-H041 v005.00



La componente P53 consiste di una sonda di 161 kb, marcata in rosso, che copre l'intero gene *P53* (*TP53*) e le regioni fiancheggianti. La componente ATM consiste di una sonda di 182 kb, marcata in verde, che copre l'estremità telomerica del gene *NPAT* e l'estremità centromerica del gene *ATM* al di là del marcatore D11S3347.

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 di 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 sonda FISH, 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:

1. Piastra riscaldante (con una piastra solida e un 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 termostatato 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 trasparente, 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 immersione per l'obiettivo 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 salina - citrato salino di sodio (SSC) 20x
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 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]
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 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.

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 ematologicamente derivate, fissate in soluzione di Carnoy (metanolo/acido acetico 3:1)
provenienti da pazienti con leucemia linfocitica cronica (LLC) confermata o sospetta, che 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 vetrini[6].

Preparazione delle soluzioni

Soluzioni di etanolo

Diluire 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 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

1. 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).
2. Immergere il vetrino in SSC 2x 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 della miscela 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 in 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 SSC 0,4x (pH 7,0) a 72 °C (+/- 1 °C) per 2 minuti, senza agitare.

15. Far sgocciolare il vetrino e immergerlo in SSC 2x, 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 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. L'utilizzo di un termometro calibrato è fortemente raccomandato per la misurazione delle temperature delle soluzioni, dei bagni termostatati e degli incubatori, in quanto queste temperature sono di fondamentale importanza per ottenere 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

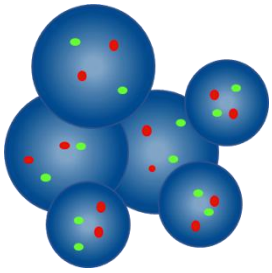
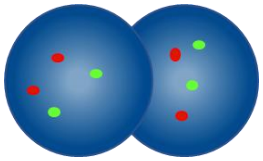
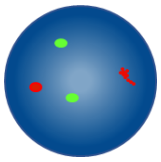
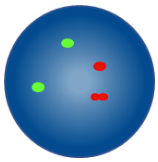
Valutazione della qualità dei vetrini

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

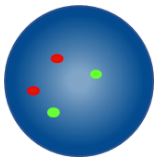
Linee guida per l'analisi

- 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
- 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 due segnali rossi e due segnali verdi: uno dei due segnali rossi è diffuso
	Contare come due segnali rossi e due segnali verdi: lo spazio in un segnale rosso è minore di due lunghezze di sonda

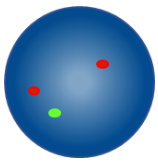
Risultati attesi

Profilo di segnale normale atteso

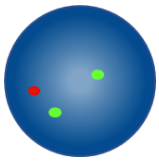


In una cellula normale, sono attesi due segnali rossi e due verdi (2R2V).

Profili di segnale anomalo attesi



In una cellula con una delezione di *ATM*, si prevedono due segnali rossi e un segnale verde (2R1V).



In una cellula con una delezione di *TP53*, si prevedono un segnale rosso e due segnali verdi (1R2V).

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

Interferenze rilevanti / sostanze interferenti note

Non sono note interferenze rilevanti / 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 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 quattro (4) loci cromosomici in ciascuna delle venti (20) cellule in metafase da ciascuno dei cinque (5) campioni cellulari maschili cariotipicamente normali fissati in metanolo/acido

acetico in un rapporto 3:1 da sangue periferico, ottenendo 400 punti di dati. 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 del 95%.

Tabella 1. Specificità analitica per P53 (TP53)/ATM Combination Deletion Probe

Bersaglio	Numero di cromosomi in metafase ibridati	Numero di loci correttamente ibridati	Specificità analitica	Intervallo di confidenza al 95%
17p13	200	200	100%	98,12%-100%
11q22.3	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 di midollo osseo ritenute negative per una delezione di *TP53 o ATM*, 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 P53 (TP53)/ATM Combination Deletion Probe

Tipo di campione	Criteri di sensibilità	Risultato di sensibilità
Midollo osseo	>95%	96,32% (95,59%-97,05%)

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 per ciascuna delle 25 sospensioni cellulari fissate di midollo osseo ritenute negative per una delezione di *TP53 o ATM*, 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 P53 (TP53)/ATM Combination Deletion Probe

Tipo di campione	Profilo d segnale	Risultato di cut-off
Midollo osseo	2R1V	3,78%
	1R2V	8,97%

I laboratori devono verificare i valori di cut-off utilizzando i propri dati[7,8].

Precisione
La precisione di questo prodotto è stata misurata in termini di precisione intra-giorno (da campione a campione), precisione inter-giorno (da giorno a giorno) e precisione per sito singolo inter-lotto (da lotto a lotto).

Per valutare la precisione di questo prodotto sono stati utilizzati tre (3) campioni: un campione di midollo osseo normale (mostrato da FISH come negativo per entrambe le delezioni di *TP53* e *ATM* prima dell'utilizzo in questo studio), un campione di midollo osseo con delezione positiva bassa di *ATM* (2R1V) e un campione di midollo osseo con delezione positiva bassa di *TP53* (1R2V). Ciascuno dei campioni di midollo osseo positivi bassi sono stati prodotti artificialmente usando una frazione di un campione di midollo osseo negativo e correggendola con un campione di midollo osseo positivo noto, allo scopo di creare campioni positivi bassi nell'intervallo di cut-off di 2-4x e mettere alla prova il cut-off stabilito.

Per stabilire la precisione inter-giorno e intra-giorno, i campioni sono stati valutati in dieci (10) giorni non consecutivi e per stabilire la precisione da lotto a lotto sono stati valutati tre (3) lotti del prodotto su tre (3) repliche degli stessi campioni. I risultati sono stati presentati come l'accordo globale con la classe negativa prevista (per i campioni negativi).

Tabella 4. Riproducibilità e precisione per P53 (TP53)/ATM Combination Deletion Probe

Variabile	Tipo di campione	Accordo
Riproducibilità intra-giorno (da campione a campione) e inter-giorno (da giorno a giorno)	Midollo osseo negativo	100%
	Midollo osseo basso positivo 2R1V (delezione di *ATM*)	96,7%
	Midollo osseo basso positivo 1R2V (delezione di *TP53*)	100%
Riproducibilità da lotto a lotto	Midollo osseo negativo	100%
	Midollo osseo basso positivo 2R1V (delezione di *ATM*)	88,9%
	Midollo osseo basso positivo 1R2V (delezione di *TP53*)	100%

Prestazioni cliniche
Per assicurarsi che il prodotto rilevi le delezioni desiderate, sono state stabilite le prestazioni cliniche nel corso di uno (1) studio su campioni rappresentativi della popolazione prevista per il prodotto: sospensioni cellulari derivate ematologicamente fissate in soluzione di Carnoy (3:1 metanolo/acido acetico) da pazienti con leucemia linfocitica cronica (LLC) confermata o sospetta. La dimensione dei campioni per lo studio era di trenta (30) campioni, con la popolazione bersaglio di undici (11) campioni positivi e diciannove (19) campioni con delezione di *ATM* negativa e undici (11) campioni positivi e diciannove (19) campioni con delezione di *TP53* negativa. Tutti i campioni sono stati anonimizzati e i risultati sono stati confrontati con lo stato noto del campione. La sonda ha identificato correttamente lo stato dei campioni in tutti i casi.

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. Prestazioni cliniche per P53 (TP53)/ATM Combination Deletion Probe - delezione di *ATM*

Variabile	Risultato
Sensibilità clinica (tasso di veri positivi [true positive rate, TPR])	99,93%
Specificità clinica (tasso di veri negativi [true negative rate, TNR])	99,99%
Tasso di falsi positivi (FPR) = 1 – Specificità	0,01%

Tabella 6. Prestazioni cliniche per P53 (TP53)/ATM Combination Deletion Probe - delezione di *TP53*

Variabile	Risultato
Sensibilità clinica (tasso di veri positivi [true positive rate, TPR])	100,0%
Specificità clinica (tasso di veri negativi [true negative rate, TNR])	100,0%
Tasso di falsi positivi (FPR) = 1 – Specificità	0,00%

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: 50558449LPH052JJ

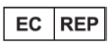
Qualora Eudamed non fosse del tutto operativo, la SSP sarà resa disponibile al pubblico su richiesta tramite email all'indirizzo SSP@ogt.com.

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. Dohner, et al. N Eng J Med. 2000;343:1910-1916.
2. Rossi D, et al. Blood. 2013 Feb 21;121(8):1403-12.
3. Baliakas P, et al. Leukemia. 2014;(April):1-8.
4. *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 18]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 11). Available from: https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63
5. Stankovic, et al., Blood. 2004;103(1):291-300.
6. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
7. Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. Genet Med. 2011;13(7):667-675.
8. Wiktor AE, Van 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
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 *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 2024-01-08: Nuove IFU per il Regolamento (UE) 2017/746
V002 2025-08-29: Rimozione del marchio UKCA.