



A Sysmex Group Company



Istruzioni per l'uso (IFU)

REF: CE-LPH 022-S / CE-LPH 022

CBFβ (CBFB)/MYH11 Translocation, Dual Fusion Probe



SOLO PER USO PROFESSIONALE



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

Usò previsto

CytoCell® CBFβ (CBFB)/MYH11 Translocation, Dual Fusion probe è un test qualitativo, non automatizzato, d'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) utilizzato per rilevare riarrangiamenti cromosomici tra la regione 16p13.1 sul cromosoma 16 e la regione 16q22 sul cromosoma 16 in sospensioni cellulari di derivazione ematica fissate in soluzione di Carnoy (metanolo/acido acetico 3:1) da pazienti con leucemia mieloide acuta (LMA) 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, dove la conoscenza dello stato di traslocazione di *CBFB::MYH11* è 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 le regioni *CBFB* e *MYH11*. 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 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 come supporto 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 (FISH) è una tecnica che consente di rilevare sequenze di DNA su cromosomi in metafase o in nuclei interfasicci di campioni citogenetici fissati. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde di DNA in grado di ibridare cromosomi interi o singole sequenze univoche 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'appaiamento 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.

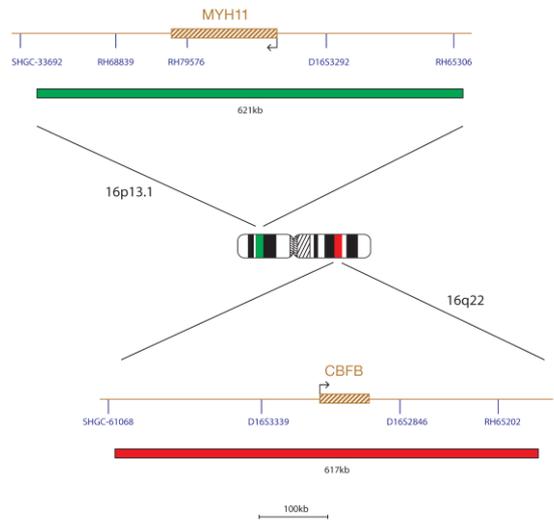
Informazioni sulla sonda

Il gene *CBFB* (subunità beta del fattore legante il core) è localizzato su 16q22, mentre il gene *MYH11* (catena pesante della miosina 11) è localizzato su 16p13.1. L'inversione *inv(16)(p13.1q22)* e la traslocazione *t(16;16)(p13.1;q22)* danno origine al gene di fusione *CBFB::MYH11*. La leucemia mieloide acuta con fusione *CBFB::MYH11* è un'entità patologia riconosciuta secondo la classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS)¹. Questo tipo di LMA rappresenta il 5-8% dei casi nei pazienti più giovani, mentre l'incidenza diminuisce tra gli adulti di età superiore¹. L'alterazione citogenetica più comune rilevata in ~95% dei pazienti con *CBFB::MYH11* è rappresentata da *inv(16)(p13.1q22)*¹. La prognosi della LMA con *CBFB::MYH11* è favorevole e i tassi di sopravvivenza per gli adulti si attestano a ~50%^{1,2}.

Specifiche della sonda

CBFB, 16q22, rosso
MYH11, 16p13.1, verde

CMP-H077 v005.00



La sonda CBFB, marcata in rosso, copre una regione di 617 kb entro 16q22 e include il gene *CBFB*. La sonda MYH11, marcata in verde, copre una regione di 621 kb entro 16p13.1 e include il gene *MYH11*.

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 <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 mezzo di montaggio 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 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 di dati di sicurezza per garantire uno smaltimento sicuro del prodotto. Ciò si applica anche al contenuto di kit di test danneggiati.
6. Smaltire tutti i reagenti usati e i materiali monouso contaminati attenendosi alle procedure per i rifiuti infetti o potenzialmente infetti. È responsabilità di ciascun laboratorio maneggiare i rifiuti solidi e liquidi secondo la rispettiva natura e il livello di pericolosità, gestendoli e smaltendoli (o disponendone la gestione e lo smaltimento) nel rispetto dei regolamenti applicabili.
7. Gli operatori devono essere in grado di distinguere i colori rosso, blu e verde.
8. La mancata aderenza al protocollo descritto e ai reagenti può incidere sulle prestazioni e portare a risultati falsi positivi/negativi.
9. La sonda non deve essere diluita o miscelata con altre sonde.
10. Il mancato utilizzo di 10 µL di sonda durante la fase di pre-denaturazione del protocollo può incidere sulle prestazioni e portare a risultati falsi positivi/negativi.
11. Tutti i prodotti devono essere convalidati prima dell'uso.
12. I controlli interni devono essere eseguiti utilizzando popolazioni di cellule inalterate nei campioni di prova.

Definizioni delle temperature

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

Conservazione e manipolazione

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



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

Apparecchiature e materiali necessari ma non forniti

È necessario utilizzare apparecchiature calibrate:

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 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 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]
DAPI	364	454
Aqua	418	467
Verde	495	521
Rosso	596	615
Oro	539	561
Arancione	551	572

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 di derivazione ematica, fissate in soluzione di Carnoy (metanolo/acido acetico 3:1) da pazienti con leucemia mieloide acuta (LMA) confermata o sospetta, le quali sono preparate secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituto. Preparare campioni essiccati all'aria su vetrini da microscopia secondo le procedure citogenetiche standard. L'AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* contiene raccomandazioni per il prelievo, la coltura, la raccolta di campioni e per l'allestimento di vetrini³.

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. 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 del lavaggio, 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

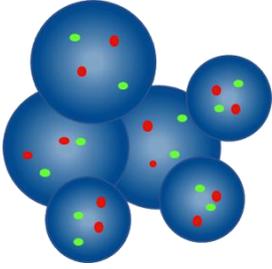
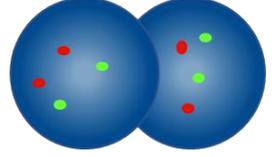
Valutazione della qualità dei vetrini

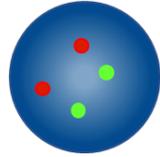
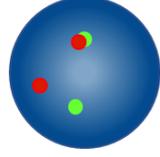
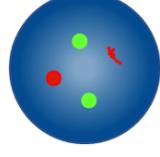
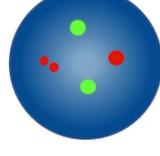
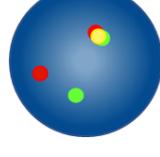
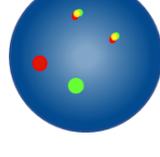
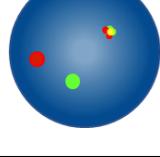
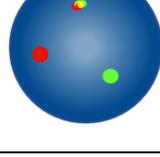
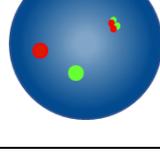
Il vetrino non deve essere analizzato se:

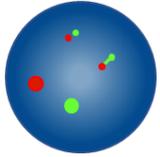
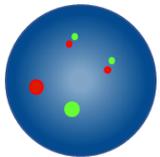
- I segnali sono troppo deboli da analizzare in filtri singoli; al fine di procedere con l'analisi, i segnali devono essere intensi, distinti e facilmente valutabili
- Sono presenti numerose cellule aggregate/sovrapposte che impediscono l'analisi
- L'ibridazione non è avvenuta in >50% delle cellule
- 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 alla possibilità di analizzare una cellula, non analizzarla

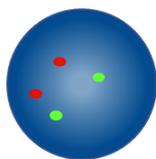
Linee guida per l'analisi	
	<p>Non contare: nuclei troppo vicini per determinarne i confini</p>
	<p>Non contare nuclei che si sovrappongono: non sono visibili tutte le aree dei due nuclei</p>

	<p>Modello di segnale normale atteso (2R2V)</p>
	<p>Modello di segnale normale (2R2V) - un segnale rosso e un segnale verde sono co-localizzati</p>
	<p>Modello di segnale normale (2R2V) - uno dei due segnali rossi è diffuso</p>
	<p>Modello di segnale normale (2R2V) - lo spazio in un segnale rosso è minore di due lunghezze della sonda</p>
	<p>Modello di segnale normale (2R2V) - un segnale rosso e un segnale verde sono co-localizzati</p>
	<p>Modello di segnale anormale atteso (1R1V2F) - i segnali di fusione rosso e verde sono in proporzione più piccoli</p>
	<p>Modello di segnale anormale atteso (1R1V2F) - segnali di fusione co-localizzati</p>
	<p>Modello di segnale anormale atteso (1R1V2F) - segnali di fusione co-localizzati</p>
	<p>Modello di segnale anormale atteso (1R1V2F) - due segnali di fusione uno vicino all'altro</p>

	Contare come un segnale rosso, un segnale verde e due segnali di fusione - un segnale di fusione è diffuso
	Contare come un segnale rosso, un segnale verde e due segnali di fusione - lo spazio tra il segnale rosso e verde nelle fusioni è minore di due lunghezze della sonda e i segnali verde e rosso sono in proporzione più piccoli

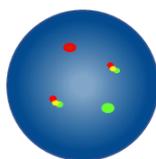
Risultati attesi

Modello di segnale normale atteso



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

Modelli di segnale anormale attesi



In una cellula con $inv(16)(p13.1;q22)$ o $t(16;16)(p13.1;q22)$, il modello di segnale atteso sarà uno rosso, uno verde e due fusioni (1R1V2F).

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

Interferenze rilevanti/sostanze interferenti note

Non vi sono interferenze rilevanti/sostanze interferenti note.

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 relativo ai 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@oqt.com

Per le Autorità nazionali competenti europee, è possibile trovare un elenco dei punti di contatto di vigilanza all'indirizzo:

https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

Caratteristiche specifiche di prestazione

Specificità analitica

La specificità analitica è definita come la percentuale di segnali che si ibridano al locus corretto e in nessun'altra localizzazione. Sono stati analizzati due loci cromosomici in ciascuna delle venti cellule in metafase provenienti da cinque campioni, ottenendo 200 punti di dati. 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 ciascun prodotto è stata calcolata come il numero di segnali FISH di cromosomi in metafase che si sono ibridati al locus corretto diviso per il numero totale di segnali FISH ibridati di cromosomi in metafase, tale risultato è stato moltiplicato per 100, espresso come percentuale e dato con un intervallo di confidenza al 95%.

Tabella 1. Specificità analitica per CBFβ (CBFB)/MYH11 Translocation, Dual Fusion Probe

Bersaglio	Numero di cromosomi in metafase ibridati	Numero di loci correttamente ibridati	Specificità analitica	Intervallo di confidenza al 95%
16q22	200	200	100%	98,12%-100%
16p13.1	200	200	100%	98,12%-100%

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica è la percentuale di cellule in interfase valutabili che presentano il modello di segnale normale atteso. È stato analizzato un minimo di 200 cellule in interfase per ciascuno dei 25 campioni di midollo osseo 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 modello di segnale atteso normale ed espressi come percentuale con un intervallo di confidenza al 95%.

Tabella 2. Sensibilità analitica per CBFβ (CBFB)/MYH11 Translocation, Dual Fusion Probe

Tipo di campione	Criteri di sensibilità	Risultato di sensibilità
Midollo osseo	>95%	98,94% (98,59%-99,29%)

Caratterizzazione dei valori di cut-off di normalità

Il cut-off di normalità è definito come la percentuale di cellule che mostrano un modello 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 ciascuno dei 1.300 campioni di midollo osseo ottenendo come minimo la valutazione di 260.000 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 modello di segnale falso positivo utilizzando il limite superiore di un intervallo di confidenza al 95% unilaterale della distribuzione binomiale in un campione di pazienti normali.

Tabella 3. Caratterizzazione dei valori di cut-off di normalità per CBFβ (CBFB)/MYH11 Translocation, Dual Fusion Probe

Tipo di campione	Risultato di cut-off
Midollo osseo	2,3%

I laboratori devono verificare i valori di cut-off utilizzando i propri dati^{4,5}.

Riproducibilità

Sono stati eseguiti studi di riproducibilità per stabilire:

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

La riproducibilità è stata stabilita da tre singoli laboratori che hanno analizzato sei campioni in cieco (due campioni negativi per il riarrangiamento, due campioni positivi bassi pari a 1-3 volte il valore di cut-off e due campioni positivi alti 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 siti ha condotto inoltre un'analisi di riproducibilità inter-lotto utilizzando tre lotti differenti di sonde.

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

Tabella 4a. Riproducibilità e precisione per CBFβ (CBFB)/MYH11 Translocation, Dual Fusion Probe

Variabile	Tipo di campione	Accordo
Riproducibilità intra-giorno (da campione a campione), inter-giorno (da giorno a giorno) e inter-sito (da sito a sito)	Midollo osseo negativo	100%
	Midollo osseo positivo basso	35%
	Midollo osseo positivo alto	100%
Riproducibilità da lotto a lotto	Midollo osseo negativo	100%
	Midollo osseo positivo basso	33%
	Midollo osseo positivo alto	100%

È stato condotto un ulteriore studio di riproducibilità per integrare i risultati positivi bassi utilizzando due campioni con diversi livelli di bassa positività (valori di cut-off 2x e 4x) e due campioni negativi per stabilire:

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

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

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

Tabella 4b. Ulteriori dati di supporto per la riproducibilità e la precisione di CBFβ (CBFβ)/MYH11 Translocation, Dual Fusion Probe

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

Prestazione clinica

Per assicurarsi che CBFβ (CBFβ)/MYH11 Translocation, Dual Fusion Probe rilevi i riarrangiamenti desiderati, è stata stabilita la prestazione clinica nel corso di quattro (4) studi su campioni rappresentativi della popolazione prevista per il prodotto: materiale residuo fissato in metanolo/acetico 3:1. La numerosità complessiva del campione per questi studi era pari a trecentonovantatré (393) campioni, per un totale di ventotto (28) campioni positivi e trecentosessantacinque (365) campioni negativi. I risultati sono stati confrontati con lo stato noto del campione. È stato riscontrato che la concordanza/discordanza dei risultati soddisfaceva i criteri di accettabilità per questo studio. I risultati di tali test sono stati analizzati al fine di fornire la sensibilità clinica, la specificità clinica e il valore del tasso di falsi positivi (FPR) per segnali positivi, utilizzando un approccio unidimensionale.

Tabella 5. Prestazione clinica per CBFβ (CBFβ)/MYH11 Translocation, Dual Fusion Probe

Variabile	Risultato
Sensibilità clinica (tasso di veri positivi, TPR)*	98,76%
Specificità clinica (tasso di veri negativi, TNR)*	99,52%
Tasso di falsi positivi (FPR) = 1 - Specificità*	0,48%

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: 50558449LPH022J9

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@cytozell.com

Sito web: www.ogt.com

Bibliografia

1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Haematolymphoid tumours* [Internet; beta version ahead of print]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2022 [cited 2023 Nov 03]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 11). Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
2. Döhner, et al. *Blood*. 2022;140(122):1345-1377.
3. Arsham, MS., Barch, M.J. and Lawce H.J. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
4. 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.
5. Wiktor AE, Dyke DL, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. *Genetics in Medicine*. 2006;8(1):16-23.

Glossario dei simboli

EN ISO 15223-1:2021 - "Dispositivi medici - Simboli da utilizzare nelle informazioni che devono essere fornite dal fabbricante - Parte 1: Requisiti generali" (© International Organization for Standardization)		
Simbolo	Titolo	Numero/i di riferimento
	it: Fabbricante	5.1.1
	it: Rappresentante autorizzato nella Comunità europea/Unione europea	5.1.2
	it: Data di scadenza	5.1.4
	it: Codice lotto	5.1.5
	it: Numero di catalogo	5.1.6
	it: Tenere lontano dalla luce del sole	5.3.2
	it: Limite di temperatura	5.3.7
	it: Consultare le istruzioni per l'uso	5.4.3
	it: Consultare le istruzioni per l'uso in formato elettronico ogt.com/IFU	5.4.3
	it: Attenzione	5.4.4
	it: Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>	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 Cytozell Limited.



Cytozell Limited

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

Tel.: +44 (0)1223 294048

E-mail: probes@cytozell.com

Sito web: www.ogt.com



Sysmex Europe SE

Deelböge 19 D
22297 Hamburg
GERMANIA

Sito web: www.sysmex-europe.com

Cronologia delle versioni delle IFU

V001 2023-10-09: Nuove IFU per il Regolamento (UE) 2017/746

V002 2025-08-29: Rimozione del marchio UKCA

V003 2025-09-09: Aggiornamento dell'indirizzo del rappresentante autorizzato nell'UE. Rimozione del numero di telefono del rappresentante autorizzato nell'UE. Rimozione del numero di fax di OGT.