



A Sysmex Group Company



### Istruzioni per l'uso

RIF: LPH 036-S/LPH 036

## EV11 (MECOM) Breakapart Probe



SOLO PER USO PROFESSIONALE



www.cytocell.com

Ulteriori informazioni e altre lingue disponibili su [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

### Limitazioni

Il presente dispositivo è ideato per individuare riarrangiamenti con breakpoint nella regione coperta dai cloni verde e blu in questo set di sonde, la quale include la regione *EV11 (MECOM)*. I 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 destinato unicamente a 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 di FISH.

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

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

### Uso previsto

CytoCell EV11 (MECOM) Breakapart Probe è un test qualitativo, non automatizzato d'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) utilizzato per rilevare riarrangiamenti cromosomici che coinvolgono la regione 3q26.2 sul cromosoma 3 in sospensioni cellulari derivate ematologicamente fissate in soluzione di Carnoy (3:1 metanolo/acido acetico) da pazienti con leucemia mieloide acuta (LMA) o sindrome mielodisplastica (SMD) confermata o sospetta.

### Indicazioni

Questo prodotto è ideato come aggiunta ad altri test clinici e istopatologici in percorsi diagnostici e di cura clinica riconosciuti, dove la conoscenza dello stato dei riarrangiamenti di *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 interfasci di campioni citogenetici fissati. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde di DNA in grado di ibridare con per interi cromosomi o singole sequenze uniche, e rappresenta un potente strumento in aggiunta all'analisi citogenetica con bandeggio G. Tale tecnica può essere applicata oggi come strumento diagnostico essenziale nell'analisi cromosomica prenatale, ematologica e nei tumori solidi. Il DNA bersaglio, dopo fissazione e denaturazione, è disponibile per l'annealing per una sonda di DNA similmente denaturata, marcata con sostanza fluorescente, a sequenza complementare. Terminata l'ibridazione, la sonda di DNA non legata o legata in modo non specifico viene rimossa e il DNA viene colorato con un colorante di contrasto. L'utilizzo della microscopia a fluorescenza permette quindi la visualizzazione della sonda ibridata sul materiale target.

### Informazioni sulla sonda

L'oncogene *MECOM (locus complesso di MDS1 e EV11)* su 3q26.2 è spesso riarrangiato in tumori ematologici di origine mieloide.

*MECOM* codifica una proteina a dita di zinco che è espressa inappropriatamente nelle cellule leucemiche di circa il 2-5% dei pazienti con LMA e SMD<sup>1</sup>. L'espressione deregolata è spesso dovuta a un riarrangiamento cromosomico che coinvolge 3q26.2, essendo le due aberrazioni più comuni t(3;3)(q21;q26.2) e inv(3)(q21q26.2)<sup>1</sup>. I breakpoint per le traslocazioni e inversioni variano in modo considerevole.

I breakpoint di inversione sono localizzati centromerici rispetto, e comprendenti, il gene *MECOM* e coprono circa 600kb. La maggioranza dei breakpoint nelle traslocazioni di 3q26.2 è telomerica rispetto al gene *MECOM* e copre una regione che include l'estremità telomerica del gene *MDS1* e del gene *MYNN*<sup>2</sup>.

Riarrangiamenti cromosomici che coinvolgono la regione 3q26.2 sono associati a tumori mieloidi maligni, espressione aberrante del gene *MECOM*, a una prognosi sfavorevole e a un decorso clinico aggressivo<sup>2</sup>.

LMA con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2) è un'entità di malattia riconosciuta secondo l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) di neoplasie mieloidi e leucemia acuta. Questa è una LMA trasformata o de novo con un decorso clinico molto aggressivo e aberrazioni che coinvolgono *MECOM* su 3q26.2 e *RPN1* (riboforina I) su 3q21<sup>3</sup>.

È stato inoltre dimostrato che *MECOM* è riarrangiato in malattia correlata a terapia mediante la traslocazione t(3;21)(q26.2;q22), avendo come esito una fusione *MECOM-RUNX1*<sup>3,4</sup>.

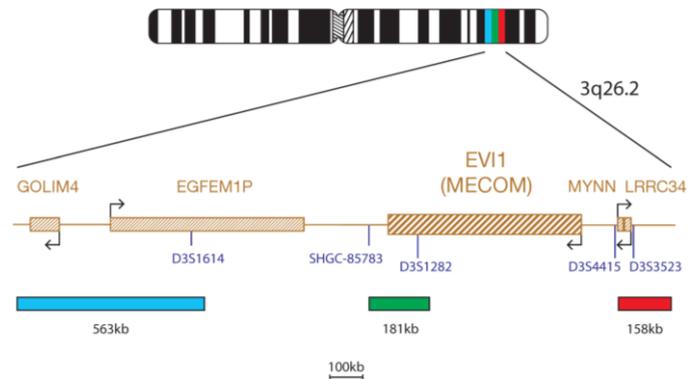
I riarrangiamenti di *MECOM* sono molto eterogenei e possono essere difficili da rilevare mediante la citogenetica convenzionale, rendendo FISH uno strumento utile per la loro individuazione.

### Specifiche della sonda

EV11, 3q26.2, rosso

EV11, 3q26.2, verde

EV11, 3q26.2, blu



La componente di colore rosso del mix della sonda di EVI1 consiste di una sonda di 158kb telomerica rispetto al marcatore D3S4415 che include il gene *LRRC34*. La componente di colore verde copre una regione di 181kb che include la parte centromerica del gene *EV11 (MECOM)* e al di là del marcatore D3S1282. La componente di colore blu copre una regione di 563kb centromerica rispetto al gene *EV11*, che include il marcatore D3S1614.

### Materiali forniti

**Sonda:** 50µl per provetta (5 test) o 100µl per provetta (10 test)

Le sonde sono fornite già mescolate nella soluzione d'ibridazione (formamide; destrano solfato; citrato salino di sodio (SSC)) e sono pronte all'uso.

**Colorante da contrasto:** 150µl per provetta (15 test)

La colorazione con contrasto è DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolo)).

### Avvertenze e misure precauzionali

1. Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale.
2. Quando si manipolano le sonde ed il colorante di contrasto DAPI è necessario indossare i guanti.
3. Le miscele di sonda contengono formamide, una sostanza tetratogena; 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. Eseguire lo smaltimento dei materiali pericolosi nel rispetto delle normative interne dell'istituto relative allo smaltimento dei residui tossici.
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 mescolata con altre sonde.
9. Il mancato utilizzo di 10µl di sonda durante lo stadio di pre-denaturazione del protocollo può incidere sulla prestazione e portare a risultati falsi positivi/negativi.

### Conservazione e utilizzo



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



La sonda rimane stabile nel corso dei cicli di congelamento e scongelamento sperimentati 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 continue. È necessario intraprendere tutti gli sforzi per limitare l'esposizione a variazioni di luce e temperatura.

#### Apparecchiature e materiali necessari ma non forniti

È necessario utilizzare apparecchiature calibrate:

1. Piastra riscaldante (con una piastra solida e controllo accurato della temperatura fino a 80 °C)
2. Micropipette a volume calibrato variabile compreso tra 1µl - 200µl
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 (riferirsi alla 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 calibrato del pH (o strisce indicatrici del pH capace di misurare pH da 6,5 a 8,0)
10. Contenitore umidificato
11. Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza.
12. Centrifuga da banco.
13. Vetrini da microscopia
14. Coprioggetto 24x24
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. Stufa per asciugatura citogenetica

#### Reagenti necessari ma non forniti

1. Soluzione 20x di citrato salino di sodio (SSC)
2. 100% etanolo
3. Tween-20
4. 1M sodio idrossido (NaOH)
5. 1M acido idroclorico (HCl)
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 ed obiettivi plan apochromat 60/63x e 100x. I fluorofori utilizzati in questa sonda ecciteranno ed emetteranno alle seguenti lunghezze d'onda:

Fluoroforo	Eccitazione <sub>max</sub> [nm]	Emissione <sub>max</sub> [nm]
Aqua	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 filtro triplo bandpass DAPI/spettro green/spettro red o un filtro dual spettro green/spettro red per una visualizzazione simultanea dei fluorofori verdi e rossi. Utilizzare un filtro singolo bandpass aqua per una visualizzazione ottimale dello spettro aqua o di un filtro triplo bandpass spettro red/spettro green/ spettro aqua per una visualizzazione simultanea dei fluorofori verdi, rossi e aqua.

Controllare il microscopio a fluorescenza prima dell'uso per garantire che stia funzionando correttamente. Utilizzare olio a immersione adatto per microscopio a fluorescenza e formulato per bassa autofluorescenza. Evitare di mescolare DAPI Antifade con l'olio a immersione per microscopio poiché questo oscurerà i segnali. Seguire le raccomandazioni del fabbricante in relazione alla vita della lampada e all'età dei filtri.

#### Preparazione del campione

Il kit è progettato per l'utilizzo su sospensioni cellulari ematologicamente derivate, fissate in soluzione di Carnoy (3:1 metanolo/acido acetico), le quali sono preparate secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituto. Stendere i campioni essiccati su vetrini da microscopia secondo le procedure citogenetiche standard. L'AGT *Cytogenetics Laboratory Manual*, contiene raccomandazioni per il prelievo, coltura, raccolta di esemplari e per la realizzazione di vetrini<sup>2</sup>.

#### Preparazione della soluzione

##### Soluzioni di etanolo

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

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

##### Soluzione 2xSSC

Diluire 1 parte di soluzione 20xSSC con 9 parti di acqua purificata e miscelare in modo accurato. Controllare il pH e correggere a pH 7,0 mediante NaOH oppure HCl come richiesto. Conservare la soluzione fino a 4 mesi a temperatura ambiente in un contenitore a chiusura ermetica.

##### Soluzione 0,4xSSC

Diluire 1 parte di soluzione 20xSSC con 49 parti di acqua purificata e miscelare in modo accurato. Controllare il pH e correggere a pH 7,0 mediante NaOH oppure HCl come richiesto. Conservare la soluzione fino a 4 mesi a temperatura ambiente in un contenitore a chiusura ermetica.

##### Soluzione 2xSSC, 0,05% Tween-20

Diluire 1 parte di soluzione 20xSSC con 9 parti di acqua purificata. Aggiungere 5µl di Tween-20 per 10ml e miscelare accuratamente. Controllare il pH e correggere a pH 7,0 mediante NaOH oppure HCl come richiesto. Conservare la soluzione fino a 4 mesi 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. (**Opzionale, se si utilizza una stufa per citogenetica:** i vetrini devono essere caricati utilizzando una stufa per citogenetica. La camera deve essere azionata a un'umidità di circa 25 °C e al 50% di umidità per una caricatura del campione cellulare ottimale. Se non è disponibile una stufa per citogenetica, utilizzare una cappa fumaria come alternativa).
2. Immergere il vetrino in 2xSSC per 2 minuti a temperatura ambiente e (TA) senza agitazione.
3. Disidratare in una serie di etanolo (70%, 85% e 100%), ciascuna per 2 minuti a TA.
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 sia miscelata in modo uniforme mediante una pipetta.
7. Pipettare 10µl di sonda per test e inserirli in una provetta da microcentrifuga. Riporre velocemente la sonda rimanente nel congelatore.
8. Posizionare la sonda e il vetrino del campione a preriscaldare su una piastra riscaldante a 37 °C (+/- 1 °C) per 5 minuti.
9. Caricare 10µl di miscela della sonda sul campione cellulare e coprire delicatamente con un coprioggetto. Sigillare con soluzione collante gommosa 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) durante la 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. Lavare il vetrino in 0,4xSSC (pH 7,0) a 72 °C (+/- 1 °C) per 2 minuti, senza agitazione
15. Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
16. Scolare i vetrini e applicare 10µl di DAPI antifade su ciascun campione.
17. Coprire con un vetrino coprioggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
18. Analizzare con un microscopio a fluorescenza (vedere **Configurazione ottimale del microscopio a fluorescenza**).

#### Stabilità dei vetrini finiti

I vetrini finiti restano analizzabili per circa 1 mese se conservati al buio a temperatura pari o inferiore a quella ambiente.

#### Raccomandazioni per l'uso

1. L'eccessivo riscaldamento o l'invecchiamento dei vetrini potrebbe ridurre la fluorescenza del segnale.
2. Le condizioni d'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 termostati e degli

incubatori in quanto queste temperature sono di fondamentale importanza per la performance ottimale del prodotto.

4. Le concentrazioni del lavaggio (stringenza), il pH e la temperatura sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame non specifico della sonda e condizioni di stringenza troppo elevate possono condurre alla perdita del segnale.
5. La denaturazione incompleta può tradursi in una perdita del segnale, mentre una denaturazione eccessiva può anche tradursi in un legame non specifico.
6. Come esito di una sovra-ibridazione, possono verificarsi segnali aggiuntivi o imprevisti.
7. Prima di utilizzare il test per obiettivi diagnostici, è necessario ottimizzare il protocollo per i propri campioni.
8. Condizioni sub-ottimali possono avere come esito un legame non specifico che può essere interpretato erroneamente come segnale di sonda.

#### Interpretazione dei risultati

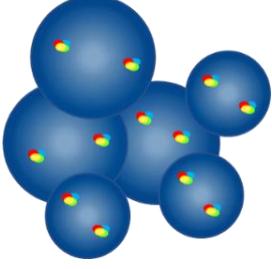
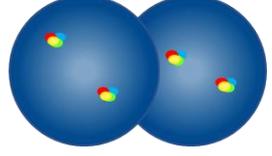
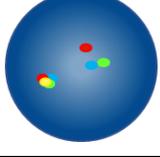
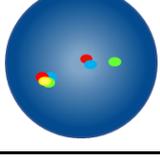
##### Valutazione della qualità dei vetrini

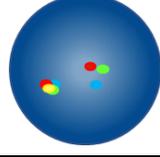
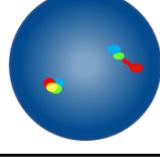
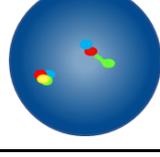
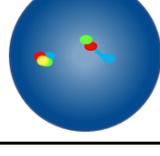
Il vetrino non deve essere analizzato se:

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

##### Linee guida di analisi

- Ogni campione deve essere analizzato e interpretato da due analisti. Eventuali discrepanze devono essere risolte mediante valutazione da parte di un terzo analista.
- Ciascun analista deve essere adeguatamente qualificato secondo gli standard nazionali riconosciuti
- Ciascun analista deve dare indipendentemente un punteggio a 100 nuclei per ciascun campione. Il primo analista deve iniziare l'analisi dal lato sinistro del vetrino e il secondo analista dal lato destro
- Ciascun analista deve documentare i propri risultati in fogli separati
- Analizzare solo nuclei intatti, non sovrapposti o affollati o nuclei coperti da detriti citoplasmatici o da un elevato grado di autofluorescenza
- Evitare aree dove vi è un eccesso di detriti citoplasmatici o ibridazione non specifica
- L'intensità del segnale può variare, anche con un singolo nucleo. In tali casi, utilizzare filtri singoli e/o correggere il piano focale
- In condizioni sub-ottimali, i segnali possono apparire confusi. Se due segnali dello stesso colore si toccano o la distanza tra di loro non è maggiore di due larghezze di segnale, o quando vi è un filamento debole che connette i due segnali, contare come un segnale
- Quando si analizzano sonde breakapart a colore triplo, se vi è uno spazio tra i segnali red, green e blue a una distanza non più grande di due lunghezze di segnale, contare come segnale riarrangiato/fuso
- In caso di dubbio se la cellula sia analizzabile o meno, non effettuare l'analisi

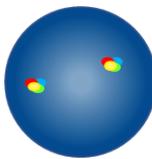
Linee guida di analisi	
	Non contare - nuclei troppo vicini l'un l'altro per determinare confini
	Non contare nuclei che si sovrappongono - tutte le aree di entrambi i nuclei non sono visibili
	Contare come 2 segnali di fusione - lo spazio tra il segnale rosso e il segnale verde/blu è minore di due lunghezze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

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

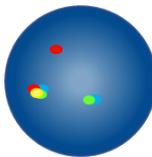
La strategia a tre colori mostra sia la presenza sia una traslocazione e consente di distinguere ciascun diverso tipo di riarrangiamento.

##### Modello di segnale normale atteso

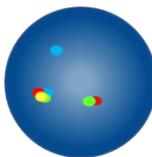


In una cellula normale, sono attesi due segnali rosso/verde/blu co-localizzati (2RVB).

##### Modelli di segnale anormale attesi



In una cellula con traslocazione  $t(3;nn)(q21;nn)$ , il modello di segnale atteso è un segnale rosso, uno verde e un segnale di fusione rosso/verde/blu (1R, 1V, 1RVB).



In una cellula con inversione  $inv(3)(q21q26.2)$ , il modello di 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 modelli di segnale sono possibili in esemplari aneuploidi/non bilanciati.

#### Reattività incrociata nota

Nessuna reattività incrociata nota.

#### Segnalazione di eventi avversi

Se si crede che questo dispositivo abbia avuto malfunzionamenti o subito un deterioramento nelle sue caratteristiche di prestazione che possono aver contribuito a un evento avverso (ad es., ritardata o errata diagnosi, ritardato o inappropriato trattamento), ciò deve essere immediatamente segnalato al fabbricante (**e-mail**: [vigilance@ogt.com](mailto:vigilance@ogt.com)).

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

## Caratteristiche specifiche di prestazione

### Specificità analitica

La specificità analitica è la percentuale di segnali che si ibridano al locus corretto e nessun'altra localizzazione. La specificità analitica è stata stabilita analizzando un totale di 200 loci target. La specificità analitica è stata calcolata come il numero di segnali FISH che si ibridano al locus corretto diviso per il numero totale di segnali FISH ibridati.

Tavola 1. Specificità analitica per EVI1 Breakpart Probe

Sonda	Locus target	Numero di segnali ibridati al locus corretto	N. totale di segnali ibridati	Specificità (%)
Red EVI1	3q26	200	200	100
Green EVI1	3q26	200	200	100
Blu EVI1	3q26	200	200	100

### Sensibilità analitica

Sensibilità analitica è la percentuale di cellule interfase a cui è possibile fornire un punteggio con il modello di segnale normale atteso. La sensibilità analitica è stata stabilita analizzando cellule interfase in differenti campioni normali. La sensibilità è stata calcolata come la percentuale di cellule a cui è possibile fornire un punteggio con il modello di segnale atteso (con un intervallo di confidenza del 95%).

Tavola 2. Sensibilità analitica per EVI1 Breakpart Probe

N. di cellule con modelli di segnale atteso	N. di cellule con segnali a cui è possibile fornire un punteggio	Sensibilità (%)	Intervallo di confidenza del 95%
4957	5000	99,14	98,84 – 99,36

### Caratterizzazione dei valori normali di cut off

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

Il valore normale di cut off è stato stabilito mediante campioni negativi per il riarrangiamento che la sonda intende rilevare e la funzione beta inversa. Per ciascun campione, i modelli di segnale di 100 nuclei interfase sono stati registrati da due analisti indipendenti, con un totale di 200 per campione.

Tavola 3. Caratterizzazione dei valori normali di cut off per EVI1 Breakpart Probe

Modello di segnale anormale	Numero di campioni analizzati per generare cut off	Numero di nuclei valutati per campione	Numero massimo di modelli di segnale falsi positivi	Valore normale di cut off (%)
1R, 1VB, 1RVB	25	200	3	4
1RV, 1B, 3RVB	25	200	3	4

I laboratori devono verificare i valori di cut off utilizzando i propri dati<sup>6,7</sup>.

### Riproducibilità

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

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

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

Tavola 4. Riproducibilità e precisione per EVI1 Breakpart Probe

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

## Prestazione clinica

La prestazione clinica è stata stabilita utilizzando un set rappresentativo di pazienti non selezionati riferiti per AML o MDS con 100 esemplari raccolti dal sito. I tassi di incidenza dei riarrangiamenti individuati dalla sonda sono stati confrontati con quelli raccolti da una revisione delle fonti in letteratura.

Per abilitare questo confronto, l'intervallo di confidenza indicato in letteratura in una dimensione di popolazione di 100 campioni è stato calcolato mediante 1 - test di proporzioni del campione con correzione di continuità.

Tavola 5. Prestazione clinica per EVI1 Breakpart Probe

Riarrangiamento	Prevalenza			
	Revisione letteratura (%)	95% LCI (%)	Studio clinico (%)	95% UCL (%)
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-Bjergaard *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

RIF	it: Riferimento di catalogo
	it: Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
	it: Codice di lotto
	it: Consultare le istruzioni per l'uso
	it: Fabbricante
	it: Utilizzare entro
	it: Limiti di temperatura
	it: Tenere lontano dalla luce solare.
	it: Contenuto per <n> test
	it: Contenuto

### Brevetto e marchi registrati

CytoCell è un marchio registrato di CytoCell Ltd.

#### CytoCell Ltd.

3-4 Technopark  
Newmarket Road  
Cambridge, CB5 8PB, UK.  
T: +44(0)1223 294048  
F: +44(0)1223 294986  
E-mail: probes@cytoCELL.com  
Sito web: www.ogt.com

