



A Sysmex Group Company



Instruções de Utilização

REF: LPH 087-S / LPH 087

CLL Plus Screening Panel



APENAS PARA USO PROFISSIONAL



www.cytocell.com

Mais informações e outros idiomas disponíveis em www.ogt.com

Limitações

Este dispositivo destina-se a detetar ganhos ou perdas genómicos superiores às regiões abrangidas pelos clones vermelho e verde neste conjunto de sondas, o que inclui as regiões 13q14.3, *ATM*, *P53 (TP53)* e *MYB* e o centrómero do cromossoma 12. Os ganhos ou perdas genómicos fora destas regiões ou os ganhos ou perdas parciais destas regiões poderão não ser detetados com este produto.

O teste não se destina a ser utilizado: como diagnóstico autónomo, teste pré-natal, rastreio populacional, teste descentralizado ou autodiagnóstico. Este produto destina-se apenas a uma utilização profissional num ambiente laboratorial. Todos os resultados devem ser interpretados por técnicos adequadamente qualificados, tomando em consideração os resultados de outros testes relevantes.

Este produto não foi validado para ser utilizado com tipos de amostra ou tipos de doença que não sejam os especificados na secção da utilização prevista.

A comunicação e interpretação dos resultados da FISH devem ser consistentes com as normas da prática profissional e devem tomar em consideração outras informações clínicas e de diagnóstico. Este kit destina-se a ser utilizado como adjuvante de outros testes de diagnóstico laboratoriais e não deve ser iniciada qualquer medida terapêutica apenas com base nos resultados da FISH.

O não cumprimento do protocolo pode afetar o desempenho do produto e dar origem a falsos resultados positivos/negativos.

Este kit não foi validado para outros efeitos que não os indicados na secção da utilização prevista.

Utilização prevista

O CLL Plus Screening Panel é um teste qualitativo não automatizado de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) utilizado para detetar deleções cromossómicas na região 11q22.3 no cromossoma 11, na região 17p13.1 no cromossoma 17 ou na região 13q14.2-q14.3 no cromossoma 13 e/ou ganhos da região centromérica no cromossoma 12 e/ou deleções que envolvem a região MYB no cromossoma 6 na localização 6q23.3 em suspensões de células derivadas do sangue fixadas no fixador de Carnoy (3:1 de metanol/ácido acético) de doentes com confirmação ou suspeita de leucemia linfocítica crónica (LLC).

Indicações

Este produto destina-se a ser utilizado como adjuvante de outros testes clínicos ou histopatológicos em vias reconhecidas de diagnóstico e cuidados clínicos, em que o conhecimento do estado da deleção de *P53 (TP53)*, *ATM* ou da deleção do D13S319 e/ou ganho do estado do centrómero do cromossoma 12 seria importante para o tratamento clínico.

Princípios do teste

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é uma técnica que permite detetar sequências de ADN em cromossomas metafásicos ou em núcleos interfásicos de amostras citogenéticas fixadas. A técnica recorre a sondas de ADN que se hibridizam com cromossomas inteiros ou sequências únicas individuais e serve de forte adjuvante à análise citogenética por bandeamento G. Esta técnica pode agora ser aplicada como ferramenta de investigação essencial na análise cromossómica pré-natal, hematológica e de tumores sólidos. O ADN alvo, após fixação e desnaturação, está disponível para renaturação com uma sonda de ADN marcada por fluorescência e desnaturada de forma semelhante, que tem uma sequência complementar. Após a hibridização, a sonda de ADN não ligada e não

especificamente ligada é removida e o ADN é contracorado para efeitos de visualização. A microscopia de fluorescência permite então a visualização da sonda hibridizada no material alvo.

Informações sobre a sonda

Uma seleção de sondas hematológicas e de uma sonda alfa-satélite para a leucemia linfocítica crónica (LLC).

Sonda Alfa Satélite 12 Plus para a LLC

A trissomia 12 é uma anomalia recorrente na LLC, observada em 20% dos casos¹ e surge frequentemente como a aberração citogenética exclusiva (40-60% dos casos com trissomia 12)². Os doentes com trissomia 12 são classificados com risco baixo na ausência de quaisquer outras lesões genéticas³. Este produto está também disponível em tamanhos de kit de 5 testes (LPH 069-S) e de 10 testes (LPH 069) e está otimizado para a hibridização durante a noite.

13q14.3

As deleções que afetam a região 13q14 são as aberrações genéticas estruturais mais frequentes na LLC^{3,4,5}. Esta região é heterozigoticamente deletada em 30-60% e homozigoticamente deletada em 10-20% dos doentes com LLC⁶. Os doentes com deleções da 13q14 são classificados com risco muito baixo na ausência de quaisquer outras lesões genéticas³.

P53 (TP53) (17p13.1)

O gene *TP53 (proteína tumoral p53)* no 17p13.1 é um dos genes supressores de tumores mais importantes; atua como um fator de transcrição potente com uma função fundamental na manutenção da estabilidade genética. A perda do *TP53* é comunicada em 10% dos doentes com LLC e é considerada o marcador de prognóstico menos bom nessa doença^{3,7}.

ATM (11q22.3)

O gene *ATM (quinase serina/treonina ATM)* no 11q22.3 é um gene de controlo importante envolvido na gestão dos danos celulares. A sua função é avaliar o nível de danos do ADN da célula e tentar repará-los através de substratos fosforilantes chave envolvidos na via de resposta a danos no ADN⁸. A perda do *ATM* é comunicada em 18% dos doentes com LLC e é considerada um marcador de mau prognóstico nessa doença⁹.

MYB (6q23.3)

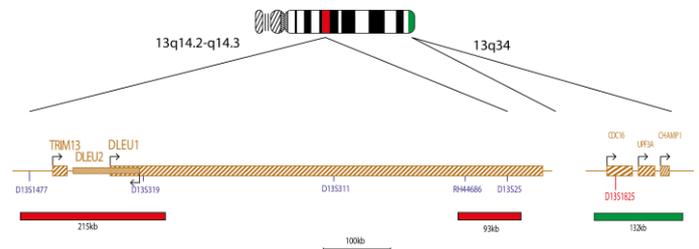
As deleções do cromossoma 6q são recorrentes na LLC. O gene *MYB (proto-oncogene MYB, fator de transcrição)* é essencial para a proliferação e diferenciação das células hematopoéticas^{10,11}. Está localizado na banda 6q23.3 e serve de marcador para a deleção de 6q.

Especificação da sonda

13q14.3 Deletion Probe

13q14.2-q14.3, Vermelho

13qter, 13q34, Verde



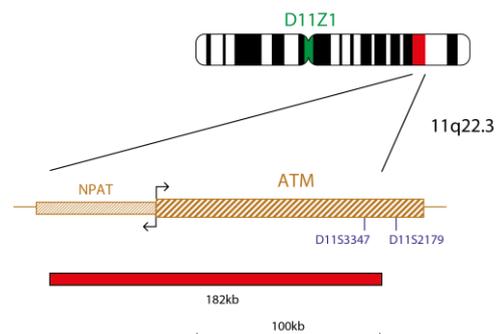
As sondas de 13q14.2-q14.3, marcadas a vermelho, abrangem os marcadores D13S319 e D13S25. A sonda específica do subtelómero 13qter (clone 163C9), marcada a verde, permite a identificação do cromossoma 13 e atua como sonda de controlo.

ATM Deletion Probe

ATM, 11q22.3, Vermelho

D11Z1, 11p11.1-q11.1, Verde

CMP-H006 v005.00



A sonda de ATM é de 182 kb, marcada a vermelho, e abrange a extremidade telomérica do gene NPAT e a extremidade centromérica do gene ATM até

justamente além do marcador D11S3347. A mistura de sondas também contém uma sonda de controlo para o centrómero 11 (D11Z1) marcada a verde.

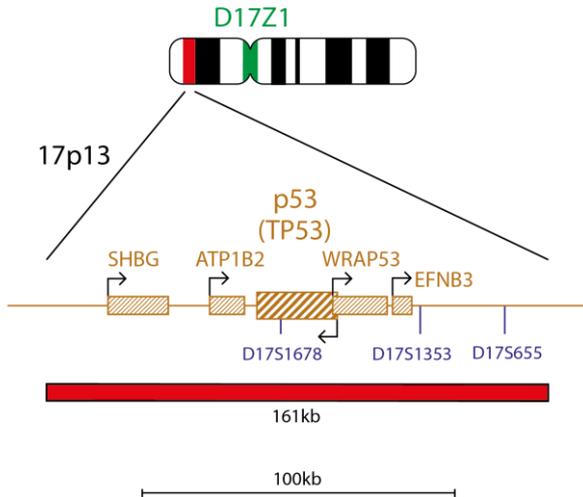
Alpha Satellite 12 Plus for CLL
D12Z3, 12p11.1-q11.1, Vermelho



A Sonda de Alfa-Satélite 12 Plus é uma sonda de sequência de repetições, marcada a vermelho, que reconhece a sequência de repetições centromérica D12Z3.

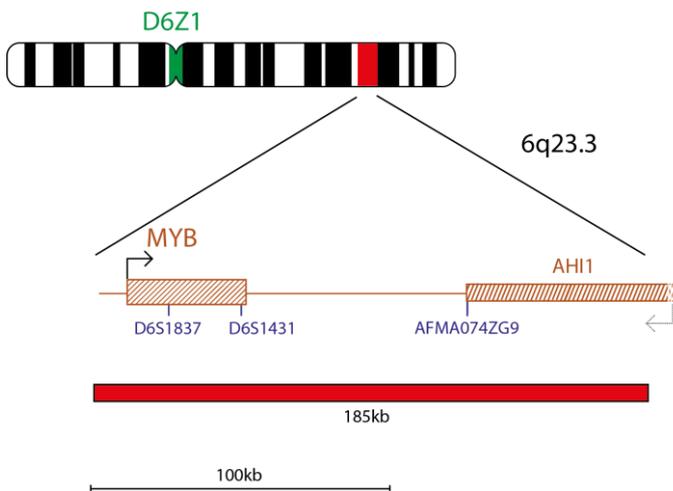
P53 (TP53) Deletion Probe
P53, 17p13, Vermelho
D17Z1, 17p11.1-q11.1, Verde

CMP-H039 V007.00



A sonda de p53 (TP53) é uma sonda de 161 kb, marcada a vermelho, que abrange todo o gene p53 (TP53) e as regiões flanqueadoras. A mistura de sondas também contém uma sonda de controlo para o centrómero 17 (D17Z1) marcada a verde.

MYB Deletion Probe
MYB, 6q23.3, Vermelho
D6Z1, 6p11.1-q11.1, Verde



A mistura de sondas de MYB consiste numa sonda de 185 kb, marcada a vermelho, que abrange todo o gene MYB e uma região telomérica ao gene que inclui uma parte centromérica do gene AH11. Esta mistura de sondas também contém uma sonda de controlo para o centrómero 6 (D6Z1) marcado a verde.

Materiais fornecidos

Sondas: 50 µl por tubo (5 testes) ou 100 µl por tubo (10 testes)
As sondas são fornecidas pré-misturadas em solução de hibridização (formamida; sulfato de dextrano; citrato de sódio salino [SSC]) e estão prontas para serem utilizadas.

Contracorante: 150 µl por tubo (15 testes)
O contracorante é o DAPI Antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

Advertências e precauções

1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Apenas para uso profissional.
2. Utilize luvas quando manusear sondas de ADN e o contracorante DAPI.
3. As soluções de sonda contêm formamida, que é um teratogénio. Não respire fumos nem permita o contacto das mesmas com a pele. Manuseie com cuidado. Utilize luvas e uma bata de laboratório.
4. O DAPI é um potencial agente cancerígeno. Manuseie com cuidado. Utilize luvas e uma bata de laboratório.
5. Elimine todos os materiais perigosos de acordo com as diretrizes da sua instituição para a eliminação de resíduos perigosos.
6. Os operadores têm de ser capazes de distinguir as cores vermelha, azul e verde.
7. O não cumprimento do protocolo e reagentes delineados pode afetar o desempenho do produto e dar origem a falsos resultados positivos/negativos.
8. A sonda não deve ser diluída nem misturada com outras sondas.
9. A não utilização de 10 µl de sonda durante a fase de pré-desnaturação do protocolo pode afetar o desempenho do produto e dar origem a falsos resultados positivos/negativos.

Conservação e manuseamento

O kit deve ser conservado num congelador a uma temperatura de -25 °C a -15 °C até ao prazo de validade indicado no rótulo do kit. Os tubos de sonda e de contracorante têm de ser conservados no escuro.



A sonda permanece estável durante os ciclos de congelamento e descongelamento que ocorrem durante a utilização normal (em que um ciclo constitui a remoção da sonda do congelador e a sua reposição no mesmo) e fica fotoestável durante um máximo de 48 horas depois de exposta a condições de luminosidade contínua. Devem ser envidados todos os esforços para limitar a exposição a variações de luz e de temperatura.

Equipamento e materiais necessários, mas não fornecidos

- É necessário utilizar equipamento calibrado:
1. Placa quente (com uma placa sólida e controlo exato da temperatura até 80 °C)
 2. Micropipetas e pontas de volume variável calibradas, entre 1 µl - 200 µl
 3. Aparelho de banho-maria com controlo exato da temperatura de 37 °C a 72 °C
 4. Tubos de microcentrifugação (0,5 ml)
 5. Microscópio de fluorescência (ver secção "Recomendação de microscópio de fluorescência")
 6. Microscópio de contraste de fase
 7. Jarras de Coplin limpas em plástico, cerâmica ou vidro termorresistente
 8. Pinça
 9. Medidor de pH calibrado (ou tiras indicadoras do pH capazes de medir um pH de 6,5 – 8,0)
 10. Recipiente humidificado
 11. Óleo de imersão de lentes para microscópio de fluorescência
 12. Centrifuga de bancada
 13. Lâminas de microscópio
 14. Lamelas de 24 x 24 mm
 15. Temporizador
 16. Incubadora de 37 °C
 17. Cola de solução de borracha
 18. Agitador vórtex
 19. Cilindros graduados
 20. Agitador magnético
 21. Termómetro calibrado

Equipamento opcional não fornecido

1. Câmara de secagem citogenética

Reagentes necessários, mas não fornecidos

1. Solução de citrato de sódio salino (SSC) 20x
2. Etanol a 100%
3. Tween-20
4. Hidróxido de sódio 1M (NaOH)
5. Ácido clorídrico 1M (HCl)
6. Água purificada

Recomendação de microscópio de fluorescência

Utilize uma lâmpada de mercúrio de 100 Watts ou equivalente e lentes planas apocromáticas para imersão em óleo 60/63x ou 100x para obter a melhor visualização possível. As substâncias fluorescentes utilizadas neste conjunto de sondas são excitadas e emitem luz nos seguintes comprimentos de onda:

Substância fluorescente	Excitação _{máx} [nm]	Emissão _{máx} [nm]
Verde	495	521
Vermelho	596	615

Certifique-se de que os filtros de excitação e emissão apropriados, que abrangem os comprimentos de onda listados acima, estão instalados no microscópio. Utilize um triplo filtro passa-banda de DAPI/espectro verde/espectro vermelho ou um duplo filtro passa-banda do espectro verde/espectro vermelho para obter a melhor visualização simultânea possível das substâncias fluorescentes verde e vermelha.

Verifique o microscópio de fluorescência antes de o utilizar para garantir que está a funcionar corretamente. Utilize um óleo de imersão que seja adequado à microscopia de fluorescência e formulado para baixa autofluorescência. Evite

misturar o DAPI Antifade com o óleo de imersão para microscópio, dado que essa mistura vai obscurecer os sinais. Siga as recomendações do fabricante relativamente à vida útil da lâmpada e à duração dos filtros.

Preparação das amostras

O kit destina-se a ser utilizado em suspensões de células derivadas do sangue fixadas no fixador de Carnoy (3:1 de metanol/ácido acético), que são preparadas de acordo com as diretrizes do laboratório ou da instituição em causa. Prepare amostras secas ao ar em lâminas de microscópio, de acordo com os procedimentos citogenéticos padrão. O manual laboratorial de citogenética da AGT (*AGT Cytogenetics Laboratory Manual*) contém recomendações para a colheita de espécimes, realização de culturas, colheitas e preparação de lâminas¹².

Preparação da solução

Soluções de etanol

Dilua etanol a 100% com água purificada utilizando os seguintes rácios e depois misture bem:

- Etanol a 70% - 7 partes de etanol a 100% para 3 partes de água purificada
 - Etanol a 85% - 8,5 partes de etanol a 100% para 1,5 partes de água purificada
- Conserve as soluções durante um máximo de 6 meses à temperatura ambiente num recipiente hermético.

Solução de SSC 2x

Dilua 1 parte de solução de SSC 20x com 9 partes de água purificada e misture bem. Verifique o pH e ajuste-o para um pH 7,0 utilizando NaOH ou HCl, conforme necessário. Conserve a solução durante um máximo de 4 semanas à temperatura ambiente num recipiente hermético.

Solução de SSC 0,4x

Dilua 1 parte de solução de SSC 20x com 49 partes de água purificada e misture bem. Verifique o pH e ajuste-o para um pH 7,0 utilizando NaOH ou HCl, conforme necessário. Conserve a solução durante um máximo de 4 semanas à temperatura ambiente num recipiente hermético.

Solução de SSC 2x e 0,05% de Tween-20

Dilua 1 parte de solução de SSC 20x com 9 partes de água purificada. Adicione 5 µl de Tween-20 por cada 10 ml e misture bem. Verifique o pH e ajuste-o para um pH 7,0 utilizando NaOH ou HCl, conforme necessário. Conserve a solução durante um máximo de 4 semanas à temperatura ambiente num recipiente hermético.

Protocolo da FISH

(Nota: Certifique-se de que a exposição da sonda e do contracolorante às luzes do laboratório está sempre limitada.)

Preparação das lâminas

1. Coloque uma gota de amostra celular numa lâmina de microscópio de vidro. Deixe secar. (**Opcional, se utilizar uma câmara de secagem citogenética:** As gotas de amostra devem ser colocadas nas lâminas utilizando uma câmara de secagem citogenética. A câmara deve ser utilizada com uma temperatura aproximada de 25 °C e humidade de 50% para que a colocação de gotas de amostra seja a melhor possível. Se não houver uma câmara de secagem citogenética, utilize um exaustor de laboratório como alternativa.)
2. Mergulhe a lâmina em SSC 2x durante 2 minutos à temperatura ambiente (TA) sem agitar.
3. Desidrate numa série de etanol (70%, 85% e 100%), cada uma durante 2 minutos à TA.
4. Deixe secar.

Pré-desnaturação

5. Retire a sonda do congelador e deixe-a aquecer até à temperatura ambiente. Centrifugue os tubos brevemente antes de os utilizar.
6. Certifique-se de que a solução da sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
7. Retire 10 µl de sonda por cada teste e transfira-os para um tubo de microcentrifugação. Reponha o restante volume da sonda no congelador.
8. Coloque a sonda e a lâmina da amostra numa placa quente a 37 °C (+/-1 °C) durante 5 minutos para pré-aquecimento.
9. Coloque 10 µl da solução de sonda na amostra de células e aplique uma lamela com cuidado. Vede com cola de solução de borracha e deixe a cola secar completamente.

Desnaturação

10. Desnature a amostra e a sonda em simultâneo aquecendo a lâmina numa placa quente a 75 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos.

Hibridização

11. Coloque a lâmina num recipiente húmido resistente à luz a 37 °C (+/-1 °C) e deixe-a no mesmo de um dia para o outro.

Lavagens pós-hibridização

12. Retire o DAPI do congelador e deixe-o aquecer até à TA.
13. Retire a lamela e todos os vestígios de cola com cuidado.
14. Mergulhe a lâmina em SSC 0,4x (pH 7,0) a 72 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos sem agitar.
15. Drene a lâmina e mergulhe-a em SSC 2x e 0,05% de Tween-20 à TA (pH 7,0) durante 30 segundos sem agitar.
16. Drene a lâmina e aplique 10 µl de DAPI Antifade em cada amostra.
17. Cubra a amostra com uma lamela, elimine eventuais bolhas e deixe a cor desenvolver-se no escuro durante 10 minutos.
18. Visualize com um microscópio de fluorescência. (ver secção **Recomendação de microscópio de fluorescência.**)

Estabilidade das lâminas acabadas

As lâminas acabadas permanecem analisáveis durante 1 mês no máximo se conservadas no escuro a uma temperatura igual ou inferior à TA.

Recomendações para o procedimento

1. O envelhecimento e aquecimento das lâminas no forno pode reduzir a fluorescência do sinal.
2. As condições de hibridização podem ser negativamente afetadas pela utilização de reagentes que não sejam os fornecidos ou recomendados pela CytoCELL Ltd.
3. Utilize um termómetro calibrado para medir as temperaturas das soluções, aparelhos de banho-maria e incubadoras, visto que essas temperaturas são críticas para o ótimo desempenho do produto.
4. As concentrações de lavagem, o pH e as temperaturas são importantes, visto que umas condições pouco rigorosas podem resultar numa ligação não específica da sonda e umas condições demasiado rigorosas podem resultar na ausência de sinal.
5. Uma desnaturação incompleta pode resultar em ausência de sinal e uma desnaturação excessiva também pode resultar numa ligação não específica.
6. Uma hibridização excessiva pode resultar em sinais adicionais ou inesperados.
7. Os utilizadores devem otimizar o protocolo para as suas próprias amostras antes de utilizarem o teste para efeitos de diagnóstico.
8. Condições que não sejam ótimas podem resultar numa ligação não específica, que pode ser incorretamente interpretada como um sinal da sonda.

Interpretação dos resultados

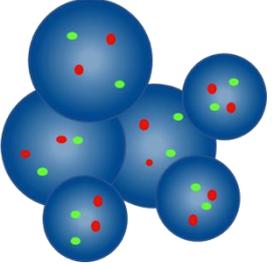
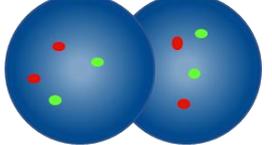
Avaliação da qualidade das lâminas

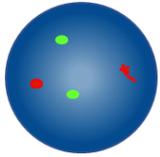
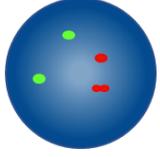
A lâmina não deve ser analisada nos seguintes casos:

- Os sinais são demasiado fracos para analisar com filtros simples – para proceder à análise, os sinais devem ser luminosos, distintos e facilmente avaliáveis.
- Há um número elevado de células agrupadas/sobrepostas a obstruir a análise.
- >50% das células não estão hibridizadas.
- Há um excesso de partículas fluorescentes entre as células e/ou uma névoa fluorescente que interfere com os sinais – nas lâminas ótimas, o fundo deve estar escuro ou preto e limpo.
- Não é possível distinguir os limites dos núcleos das células, que não estão intactos.

Diretrizes para a análise

- Dois analistas devem analisar e interpretar cada amostra. Qualquer discrepância deve ser resolvida pela avaliação de um terceiro analista.
- Cada analista deve estar adequadamente qualificado de acordo com as normas nacionais reconhecidas.
- Cada analista deve pontuar 100 núcleos para cada amostra, de forma independente. O primeiro analista deve começar a análise pelo lado esquerdo da lâmina e o segundo analista pelo lado direito.
- Cada analista deve documentar os seus resultados em folhas separadas.
- Analise apenas os núcleos intactos e não os núcleos sobrepostos ou agrupados ou núcleos cobertos por resíduos citoplasmáticos ou elevado grau de autofluorescência.
- Evite as áreas com excesso de resíduos citoplasmáticos ou hibridização não específica.
- A intensidade do sinal pode variar, mesmo com um único núcleo. Nesses casos, utilize filtros simples e/ou ajuste o plano focal.
- Em condições que não sejam ótimas, os sinais poderão parecer difusos. Se dois sinais da mesma cor se tocarem um no outro ou se a distância entre eles não for superior a duas larguras de sinal, ou quando houver uma vaga cadeia a ligar os dois sinais, conte-os como um sinal.
- Se tiver dúvidas sobre se uma célula é analisável ou não, não a analise.

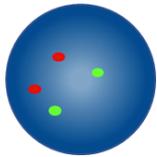
Diretrizes para a análise	
	Não contar – os núcleos estão demasiado juntos para determinar limites
	Não contar núcleos sobrepostos – todas as áreas de ambos os núcleos não estão visíveis

	Contar como dois sinais vermelhos e dois sinais verdes – um dos dois sinais vermelhos é difuso
	Contar como dois sinais vermelhos e dois sinais verdes – o intervalo num sinal vermelho é inferior a duas larguras de sinal

Resultados esperados

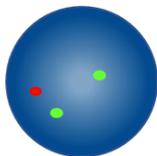
Sonda de Deleção de 13q14.3

Padrão de sinais normal esperado

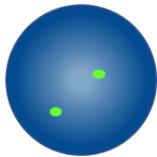


Numa célula normal, espera-se dois sinais vermelhos e dois sinais verdes (2R, 2G).

Padrões de sinais anormais esperados



Numa célula com uma deleção hemizigótica do 13q14.3, o padrão de sinais esperado é um sinal vermelho e dois sinais verdes (1R, 2G).



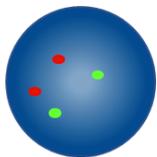
Numa célula com uma deleção homizigótica, o padrão de sinais esperado é nenhum sinal vermelho e dois sinais verdes (0R, 2G).

As deleções 13q na LLC são reconhecidas como sendo heterogêneas; uma pequena deleção na região 13q pode resultar num pequeno sinal residual com este conjunto de sondas.

Outros padrões de sinais são possíveis em espécimes aneuploides/desequilibrados.

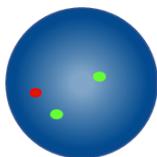
Sonda de Deleção de ATM

Padrão de sinais normal esperado



Numa célula normal, espera-se dois sinais vermelhos e dois sinais verdes (2R, 2G).

Padrão de sinais anormal esperado

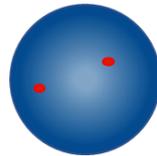


Numa célula com uma deleção de ATM, o padrão de sinais esperado é um sinal vermelho e dois sinais verdes (1R, 2G).

Outros padrões de sinais são possíveis em espécimes aneuploides/desequilibrados.

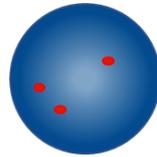
Sonda Alfa Satélite 12 Plus para a LLC

Padrão de sinais normal esperado



Numa célula normal, espera-se dois sinais vermelhos (2R).

Padrão de sinais anormal esperado

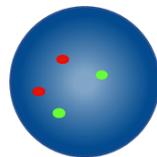


Numa célula com trissomia 12, o padrão de sinais esperado é três sinais vermelhos (3R).

Outros padrões de sinais são possíveis em espécimes aneuploides/desequilibrados.

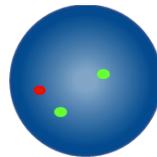
Sonda de Deleção de P53 (TP53)

Padrão de sinais normal esperado



Numa célula normal, espera-se dois sinais vermelhos e dois sinais verdes (2R, 2G).

Padrão de sinais anormal esperado

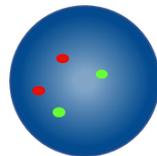


Numa célula com uma deleção de P53, o padrão de sinais esperado é um sinal vermelho e dois sinais verdes (1R, 2G).

Outros padrões de sinais são possíveis em espécimes aneuploides/desequilibrados.

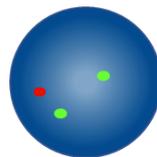
Sonda de Deleção de MYB

Padrão de sinais normal esperado



Numa célula normal, espera-se dois sinais vermelhos e dois sinais verdes (2R, 2G).

Padrão de sinais anormal esperado



Numa célula com uma deleção de MYB, o padrão de sinais esperado é um sinal vermelho e dois sinais verdes (1R, 2G).

Outros padrões de sinais são possíveis em espécimes aneuploides/desequilibrados.

Reatividade cruzada conhecida

Sonda	Reatividade cruzada conhecida
Sonda de Deleção de 13q14.3	A sonda de 13qter verde pode apresentar hibridização cruzada com o centrómero do cromossoma 19 e os braços-p de outros cromossomas.
Sonda de Deleção de ATM	A sonda de D11Z1 verde pode apresentar até 4 sinais de hibridização cruzada com Xc e 17c.
Alfa Satélite 12 Plus para a LLC	A sonda pode apresentar hibridização cruzada vermelha com 3c, 6c, 7c e 10c.
Sonda de Deleção de P53	A sonda de D17Z1 verde pode apresentar hibridização cruzada com os centrómeros dos cromossomas 11 e X.
Sonda de Deleção de MYB	Nenhuma hibridização cruzada conhecida.

Notificação de eventos adversos

Se acreditar que este dispositivo se avariou ou sofreu uma deterioração nas respetivas características de desempenho que possa ter contribuído para um evento adverso (por exemplo, diagnóstico tardio ou incorreto, tratamento tardio ou inadequado), deve comunicá-lo imediatamente ao fabricante (e-mail: vigilance@ogt.com).

Se aplicável, o evento também deve ser comunicado à sua autoridade competente nacional. Pode obter uma lista de pontos de contacto de vigilância em: <http://ec.europa.eu/growth/sectors/medical-devices/contacts/>.

Características específicas de desempenho

Especificidade analítica

A especificidade analítica é a percentagem de sinais que se hibridizam com o locus correto e nenhuma outra localização. A especificidade analítica foi estabelecida pela análise de um total de 200 loci alvo. A especificidade analítica foi calculada como o número de sinais de FISH que se hibridizaram com o locus correto, dividido pelo número total de sinais de FISH hibridizados.

Tabela 1. Especificidade analítica para o CLL Plus Screening Panel

Kit	Sonda	Locus alvo	N.º de sinais hibridizados com o locus correto	N.º total de sinais hibridizados	Especificidade (%)
Sonda de Deleção de 13q14.3	Vermelho 13q14.3	13q14.3	200	200	100
	Verde 13qter	13qter, 13q34	200	200	100
Sonda de Deleção de ATM	Vermelho ATM	11q22.3	200	200	100
	Verde D11Z1	11q11.1-q11.1	200	200	100
Alfa Satélite 12 Plus para a LLC	D12Z3 Vermelho	12p11.1-q11.1	200	200	100
Sonda de Deleção de P53	Vermelho P53	17p13.1	200	200	100
	Verde D17Z1	17p11.1-q11.1	200	200	100
Sonda de Deleção de MYB	Vermelho MYB	6q23	200	200	100
	Verde D6Z1	6p11.1-q11.1	200	200	100

Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica é a percentagem de células interfásicas pontuáveis com o padrão de sinais normal esperado. A sensibilidade analítica foi estabelecida pela análise de células interfásicas em diferentes amostras normais. A sensibilidade foi calculada como a percentagem de células pontuáveis com o padrão de sinais esperado (com um intervalo de confiança de 95%).

Tabela 2. Sensibilidade analítica para o CLL Plus Screening Panel

Kit	N.º de células que têm o padrão de sinais esperado	N.º de células que têm sinais pontuáveis	Sensibilidade (%)	Intervalo de confiança de 95%
Sonda de Deleção de 13q14.3	481	500	96,2	1,6
Sonda de Deleção de ATM	482	500	96,4	1,0
Alfa Satélite 12 Plus para a LLC	487	500	97,4	1,0
Sonda de Deleção de P53	471	500	94,2	2,7
Sonda de Deleção de MYB	479	500	95,8	1,7

Caracterização dos valores cut-off normais

O valor cut-off normal, em associação com sondas de FISH, corresponde à máxima percentagem de células interfásicas pontuáveis com um determinado padrão de sinais anormal, com o qual uma amostra é considerada normal para esse padrão de sinais.

O valor cut-off normal foi estabelecido utilizando amostras de doentes normais e doentes positivos. Para cada amostra, foram registados padrões de sinais de 100 células. O índice de Youden foi calculado para determinar o valor-limite ao qual a Sensibilidade + Especificidade-1 é maximizada.

Tabela 3. Caracterização dos valores cut-off normais para o CLL Plus Screening Panel

Kit	Padrão de sinais anormal	Índice de Youden	Cut-off normal (%)
Sonda de Deleção de 13q14.3	1R, 2G ou 0R, 2G	0,95	7
Sonda de Deleção de ATM	1R, 2G	0,99	9
Alfa Satélite 12 Plus para a LLC	3R	0,99	3
Sonda de Deleção de P53	1R, 2G	0,90	10
Sonda de Deleção de MYB	1R, 2G	0,97	8

Os laboratórios têm de verificar os valores cut-off utilizando os seus próprios dados^{13, 14}.

Precisão e reprodutibilidade

A precisão é uma medida da variação natural de um teste quando repetido várias vezes nas mesmas condições. A precisão foi avaliada pela análise de repetições de teste com o mesmo número de lote de sonda e a mesma amostra, nas mesmas condições e no mesmo dia.

A reprodutibilidade é uma medida da variabilidade de um teste e foi estabelecida em termos da variabilidade de amostra para amostra, de dia para dia e de lote para lote. A reprodutibilidade de dia para dia foi avaliada pela análise das mesmas amostras em três dias diferentes. A reprodutibilidade de lote para lote foi avaliada pela análise das mesmas amostras utilizando três números de lote de sonda diferentes num dia. A reprodutibilidade de amostra para amostra foi avaliada pela análise de três réplicas de uma amostra num dia. Para cada amostra, foram registados padrões de sinais de 100 células interfásicas e foi calculada a percentagem de células que têm o padrão de sinais esperado.

A reprodutibilidade e a precisão foram calculadas como o desvio padrão (DP) entre réplicas para cada variável e DP médio global.

Tabela 4. Reprodutibilidade e precisão para o CLL *Plus* Screening Panel

Variável	Desvio padrão (DP)				
	Sonda de Deleção de 13q14.3	Sonda de Deleção de ATM	Alfa Satélite 12 <i>Plus</i> para a LLC	Sonda de Deleção de P53	Sonda de Deleção de MYB
Precisão	0,72	0,38	0,72	2,63	1,09
Amostra para amostra	0,58	0,38	0,89	2,30	1,19
Dia para dia	0,96	0,58	0,51	2,39	1,20
Lote para lote	1,40	1,27	1,27	1,68	0,90
Desvio global	1,03	1,01	1,15	2,16	1,06

Desempenho clínico

O desempenho clínico foi estabelecido com uma amostra representativa da população pretendida para o produto. Para cada amostra, foram registados padrões de sinais de ≥ 100 células interfásicas. Foi realizada uma determinação normal/anormal comparando a percentagem de células que têm um determinado padrão de sinais anormal com o valor cut-off normal. Os resultados foram então comparados com o estado conhecido da amostra.

Os resultados dos dados clínicos foram analisados com vista a produzir os valores da sensibilidade, da especificidade e os valores cut-off utilizando uma abordagem unidimensional.

Tabela 5. Desempenho clínico para o CLL *Plus* Screening Panel

Sonda	Sensibilidade clínica (taxa de verdadeiros positivos, TPR)	Especificidade clínica (taxa de verdadeiros negativos, TNR)	Taxa de falsos positivos (FPR) = 1 - Especificidade
Sonda de Deleção de 13q14.3	96,3%	99,1%	0,9%
Sonda de Deleção de ATM	100%	99,2%	0,8%
Alfa Satélite 12 <i>Plus</i> para a LLC	100%	100%	0%
Sonda de Deleção de P53	92,5%	97,1%	2,9%
Sonda de Deleção de MYB	97,8%	99,6%	0,4%

Informações adicionais

Para obter mais informações sobre o produto, contacte o departamento de assistência técnica da CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

Bibliografia

1. Swerdlow *et al.*, (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, Lyon, France, 4th edition, IARC, 2017
2. Puiggros *et al.*, Biomed Res Int 2014;1-13
3. Rossi *et al.*, Blood 2013;121(8):1403-1412
4. Juliusson G *et al.*, N Eng J Med 1990;323:720-4
5. Kasar *et al.*, Nature Communications 2015;6:1-12
6. Hammarsund M *et al.*, FEBS Letters 2004;556:75-80
7. Baliakas P, *et al.*, Leukemia. 2014;(April):1-8
8. Stankovic *et al.*, Blood 2004;103(1):291-300
9. Dohner *et al.*, N Eng J Med 2000;343:1910-1916
10. Clappier *et al.*, Blood 2007;110(4):1251-1261
11. Stilgenbauer *et al.*, Leukemia, 1999;13:1331-1334
12. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) The *AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
13. 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.
14. 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.

Guia dos símbolos

REF	pt: Número de catálogo
	pt: Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	pt: Código de lote
	pt: Consulte as Instruções de Utilização
	pt: Fabricante
	pt: Prazo de validade
	pt: Limite de temperatura
	pt: Manter afastado da luz solar
	pt: Suficiente para <n> testes
	pt: Conteúdo

Patentes e marcas comerciais

CytoCell é uma marca comercial registada da CytoCell Ltd.

CytoCell Ltd.

Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, Reino Unido
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E: probes@cytoCELL.com
W: www.ogt.com

