A Sysmex Group Company

CytoCell

**Instruções de Utilização (IFU)**

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

# P53 (TP53)/ATM Combination Deletion Probe

CE IVD
2797

**APENAS PARA UTILIZAÇÃO PROFISSIONAL**

ogt.com/IFU

**Mais informações e outros idiomas disponíveis em ogt.com/IFU**

## Utilização Prevista

A CytoCell® P53 (TP53)/ATM Combination Deletion Probe é um teste qualitativo, não automatizado, de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), utilizado para detetar deleções cromossómicas na região 11q22.3 no cromossoma 11 e na região 17p13 no cromossoma 17 em suspensões de células derivadas do sangue fixadas em solução de Carnoy (3:1 de metanol/ácido acético) de doentes com confirmação ou suspeita de leucemia linfocítica crónica (LLC).

## Indicações de Utilização

Este dispositivo 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*) ou *ATM* seria importante para o tratamento clínico.

## Limitações

Este dispositivo destina-se a detetar perdas genómicas superiores às regiões abrangidas pelos clones vermelho e verde neste conjunto de sondas, o que inclui as regiões *TP53* e *ATM*. As perdas genómicas fora destas regiões ou as perdas parciais destas regiões poderão não ser detetadas com este dispositivo.
Este dispositivo não se destina a ser utilizado: como diagnóstico autónomo, diagnóstico complementar, teste pré-natal, rastreio populacional, teste descentralizado ou autodiagnóstico.
Este dispositivo não foi validado para tipos de amostra, tipos de doença ou fins que não os mencionados na utilização prevista.
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.
A comunicação e interpretação dos resultados da FISH devem ser efetuadas por técnicos devidamente qualificados, de forma consistente com as normas da prática profissional, e devem tomar em consideração outros resultados de testes e informações clínicas e de diagnóstico relevantes.
Este dispositivo destina-se apenas a utilização profissional em laboratório.
O não cumprimento do protocolo pode afetar o desempenho do produto e dar origem a falsos resultados positivos/negativos.

## Princípios do Teste

A hibridação *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 hibridam 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 cromossomática pré-natal, hematológica e de tumores sólidos. O ADN-alvo, após fixação e desnaturação, fica disponível para hibridação com uma sonda de ADN marcada por fluorescência e desnaturada de forma semelhante, que tem uma sequência complementar. Após a hibridação, 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 hibridada no material-alvo.

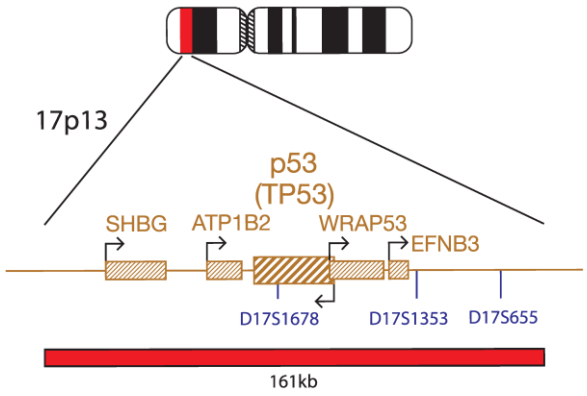
## Informações sobre a Sonda

O gene supressor de tumores *TP53* (*proteína tumoral p53*) na 17p13 e o gene da proteína quinase *ATM* (*quinase serina/treonina ATM*) na 11q22.3 são frequentemente deletados nos casos de leucemia linfocítica crónica (LLC). O gene *TP53* é um gene supressor de tumores importante; atua como um fator de transcrição potente com uma função fundamental na manutenção da estabilidade genética.[1] A perda do *TP53* é comunicada em 5-10% dos doentes com LLC e é um biomarcador de mau prognóstico que prevê resistência a quimioterapia.[2,3,4] O *ATM* é um gene de controlo importante envolvido na gestão dos danos celulares.[5] A perda do *ATM* é comunicada em 10-20% dos doentes com LLC.[2] As deleções do 11q e 17p são duas das aberrações cromossómicas mais frequentes na LLC; a del(11q) remove o *ATM*, ao passo que a del(17p) resulta em perda do *TP53*.[4]

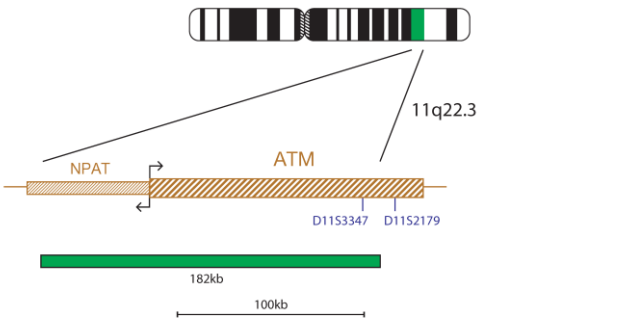
## Especificação da Sonda

P53, 17p13, Vermelho
ATM, 11q22.3, Verde

CMP-H040 V005.00




CMP-H041 v005.00




A componente de P53 consiste numa sonda de 161 kb, marcada a vermelho, que abrange todo o gene *P53* (*TP53*) e as regiões flanqueadoras. A componente de ATM consiste numa sonda de 182 kb, marcada a verde, que abrange a extremidade telomérica do gene *NPAT* e a extremidade centromérica do gene *ATM* para além do marcador D11S3347.

## Materiais Fornecidos

***Sonda***: 50 µl por frasco (5 testes) ou 100 µl por frasco (10 testes)
As sondas são fornecidas pré-misturadas em solução de hibridação (<65% de formamida; <20 mg de sulfato de dextrano; <10% de citrato de sódio salino [SSC] 20x) e estão prontas a utilizar.

***Contracorante***: 150 µl por frasco (15 testes)
O contracorante é o DAPI Antifade ES (0,125 µg/ml de DAPI [4,6-diamidino-2-fenilindol] em meio de montagem baseado em glicerol).

## Advertências e Precauções

1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Apenas para utilização profissional em laboratório.
2. As misturas de sondas contêm formamida, que é um teratógeno; não inalar vapores nem permitir o contacto com a pele. Manuseie com cuidado; use luvas e uma bata de laboratório.
3. Manuseie o DAPI com cuidado. Use luvas e uma bata de laboratório.
4. Não utilize se o(s) frasco(s) estiver(em) danificado(s), ou se o conteúdo do frasco for comprometido de qualquer forma.
5. Siga a regulamentação local de eliminação relativa à sua localização juntamente com as recomendações da Ficha de dados de segurança para determinar como eliminar este produto de forma segura. Tal também se aplica a conteúdos do kit de teste danificados.
6. Elimine todos os reagentes utilizados e quaisquer outros materiais contaminados que possam ser eliminados de acordo com os procedimentos para resíduos infeciosos ou potencialmente infeciosos. É da responsabilidade

de cada laboratório lidar com os resíduos sólidos e líquidos de acordo com a respetiva natureza e grau de perigo, bem como tratar e eliminar os mesmos (ou encarregar um terceiro de o fazer) de acordo com quaisquer regulamentações aplicáveis.
7. Os operadores têm de ser capazes de distinguir as cores vermelha, azul e verde.
8. O não cumprimento do protocolo e dos reagentes especificados pode afetar o desempenho do produto e dar origem a falsos resultados positivos/negativos.
9. A sonda não deve ser diluída nem misturada com outras sondas.
10. 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.
11. Todos os produtos devem ser validados antes da utilização.
12. Devem ser efetuados controlos internos utilizando populações de células não afetadas em amostras de testes.

**Definições de Temperatura**

- -20 °C/Congelado/No congelador: -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): +15 °C a +25 °C

**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 frascos de sonda e de contracorante têm de ser conservados num local escuro.

A sonda FISH, o contracorante DAPI Antifade ES e a Hybridisation Solution mantêm-se estáveis ao longo dos ciclos de congelamento e descongelamento que ocorrem durante a utilização normal (em que um ciclo constitui a remoção do frasco do congelador e a sua reposição no mesmo) – 5 ciclos para o frasco de 50 µl (5 testes) de sonda FISH, 10 ciclos para o frasco de 100 µl (10 testes) de sonda FISH e 15 ciclos para o frasco de 150 µl (15 testes) de contracorante. A exposição à luz deve ser minimizada e evitada sempre que possível. Armazene os componentes no recipiente à prova de luz que foi fornecido. Os componentes utilizados e armazenados sob condições para além das mencionadas no rótulo podem não funcionar como esperado e podem afetar os resultados do ensaio de forma adversa. 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 de 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. Centrífuga de bancada
13. Lâminas de microscópio
14. Lamelas de 24 x 24 mm
15. Temporizador
16. Incubadora a 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 salina de citrato de sódio (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 dos fabricantes relativamente à vida útil da lâmpada e à duração dos filtros.

**Preparação de Amostras**

O kit destina-se a ser utilizado em suspensões de células derivadas do sangue fixadas em solução de Carnoy (3:1 de metanol/ácido acético)
provenientes de doentes com confirmação ou suspeita de leucemia linfocítica crónica (LLC), 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 lâminas.[6]

**Preparação da Solução**

***Soluções de Etanol***

Dilua etanol a 100% com água purificada utilizando os seguintes rácios e, em seguida, 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 em 9 partes de água purificada e misture bem. Verifique o pH e ajuste-o para 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 em 49 partes de água purificada e misture bem. Verifique o pH e ajuste-o para 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 em 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 7,0 utilizando NaOH ou HCl conforme necessário. Conserve a solução durante um máximo de 4 semanas à temperatura ambiente num recipiente hermético.

**Protocolo FISH**

(Nota: certifique-se de que a exposição da sonda e do contracorante às luzes do laboratório é sempre limitada.)

***Preparação das Lâminas***

1. Coloque uma gota de amostra celular numa lâmina de vidro para microscópio. Deixe secar. (**Opcional, se estiver a utilizar 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. Na ausência de 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 TA. 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 rapidamente 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 de 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.

***Hibridação***

11. Coloque a lâmina num recipiente húmido e resistente à luz a 37 °C (+/-1 °C) durante a noite.

***Lavagens Pós-hibridação***

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 que a cor se desenvolva no escuro durante 10 minutos.
18. Visualize com um microscópio de fluorescência (ver secção **Recomendação de Microscópio de Fluorescência**).

**Recomendações para o Procedimento**

1. O envelhecimento ou o cozimento das lâminas no forno pode reduzir a fluorescência do sinal.
2. As condições de hibridação podem ser negativamente afetadas pela utilização de reagentes que não os fornecidos ou recomendados pela Cytocell Ltd.
3. Utilize um termómetro calibrado para medir as temperaturas das soluções, banhos-maria e incubadoras, visto que estas temperaturas são críticas para o desempenho ideal do produto.
4. As concentrações de lavagem, o pH e as temperaturas são importantes, visto que condições pouco rigorosas podem resultar numa ligação não específica da sonda e 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 em ligação não específica.
6. Uma hibridação 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 aquém do ideal podem resultar em ligação não específica que pode ser incorretamente interpretada como um sinal de sonda.

**Interpretação dos Resultados**

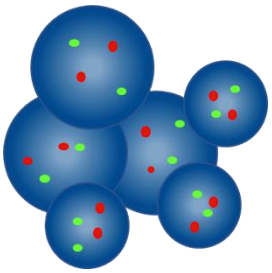
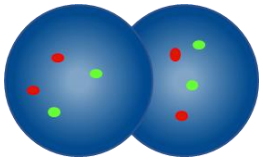
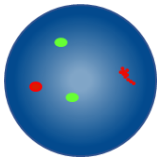
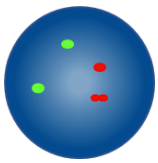
***Avaliação da Qualidade das Lâminas***

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 hibridadas.
- Há um excesso de partículas fluorescentes entre as células e/ou uma névoa fluorescente que interfere com os sinais – em lâminas ideais, o fundo deve estar escuro ou preto e limpo.
- Não é possível distinguir os limites dos núcleos das células, que não estão intactos.

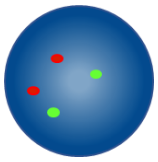
***Diretrizes para a Análise***

- 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 independentemente 100 núcleos para cada amostra. 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 núcleos intactos e não núcleos sobrepostos ou agrupados, nem núcleos cobertos por resíduos citoplasmáticos ou um elevado grau de autofluorescência.
- Evite áreas com excesso de resíduos citoplasmáticos ou hibridação não específica.
- A intensidade do sinal pode variar, mesmo num único núcleo. Nesses casos, utilize filtros simples e/ou ajuste o plano focal.
- Em condições aquém das ideais, os sinais poderão parecer difusos. Se dois sinais da mesma cor tocarem um no outro, ou se a distância entre eles não for superior a duas larguras de sinal, ou quando houver uma cadeia vaga 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 sonda |

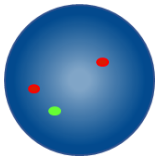
**Resultados Esperados**

Padrão de Sinais Normal Esperado

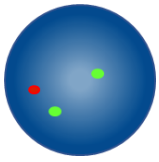


Numa célula normal, são esperados dois sinais vermelhos e dois sinais verdes (2Verm2Verd).

Padrões de Sinais Anormais Esperados



Numa célula com uma deleção de *ATM*, são esperados dois sinais vermelhos e um sinal verde (2Verm1Verd).



Numa célula com uma deleção de *TP53*, são esperados um sinal vermelho e dois sinais verdes (1Verm2Verd).

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

**Interferências/Substâncias Interferentes Relevantes Conhecidas**

Sem interferências/substâncias interferentes relevantes conhecidas.

**Reatividade Cruzada Conhecida**

Nenhuma reatividade cruzada conhecida.

**Comunicação de Incidentes Graves**
Para um doente/utilizador/terceiro na União Europeia e em países com regime regulatório idêntico (Regulamento [UE] 2017/746 sobre dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*): se, durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da sua utilização, ocorrer um incidente grave, comunique-o ao fabricante e à autoridade competente nacional.
No caso de incidentes graves noutros países, comunique-os ao fabricante e, se aplicável, à autoridade competente nacional.
Contacto de vigilância do fabricante: vigilance@ogt.com
Quanto a autoridades competentes nacionais na UE, pode obter uma lista de pontos de contacto de vigilância em:
https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

**Características Específicas de Desempenho**
***Especificidade Analítica***
A especificidade analítica é definida como a percentagem de sinais que se hibridam com o locus correto e nenhuma outra localização. Foram analisados quatro (4) loci cromossómicos em cada uma de vinte (20) células metafásicas de cada uma das cinco (5) amostras de células masculinas cariotipicamente normais fixadas com 3:1 de metanol/ácido acético provenientes de sangue periférico, proporcionando 400 pontos de dados. A localização de cada sonda hibridada foi mapeada e o número de sinais de FISH de cromossomas metafásicos que se hibridaram com o locus correto foi registado.

A especificidade analítica de cada sonda do kit foi calculada como o número de sinais de FISH de cromossomas metafásicos que se hibridaram com o locus correto, dividido pelo número total de sinais de FISH de cromossomas metafásicos hibridados. Este resultado foi multiplicado por 100, sendo o mesmo expresso em forma de percentagem e fornecido com um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 1. Especificidade Analítica para a P53 (TP53)/ATM Combination Deletion Probe

| Alvo | Número de cromossomas metafásicos hibridados | Número de loci corretamente hibridados | Especificidade analítica | Intervalo de confiança de 95% |
|---|---|---|---|---|
| 17p13 | 200 | 200 | 100% | 98,12–100% |
| 11q22.3 | 200 | 200 | 100% | 98,12–100% |

***Sensibilidade Analítica***
A sensibilidade analítica é a percentagem de células interfásicas pontuáveis com o padrão de sinais normal esperado. Foi analisado um mínimo de 200 células interfásicas para cada uma das 25 suspensões de células fixas de medula óssea que foram consideradas negativas para uma deleção de *TP53 ou ATM*, resultando num mínimo de 5000 núcleos pontuados para cada tipo de amostra. Os dados de sensibilidade foram analisados com base na percentagem de células que apresentavam um padrão de sinais esperado normal e foram expressos como percentagem com um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 2. Sensibilidade Analítica para a P53 (TP53)/ATM Combination Deletion Probe

| Tipo de amostra | Critérios de sensibilidade | Resultado da sensibilidade |
|---|---|---|
| Medula óssea | >95% | 96,32% (95,59%–97,05%) |

***Caracterização dos Valores de Cut-off Normais***
O valor de cut-off normal é definido como a percentagem de células que apresentam um padrão de sinais falso positivo com o qual um indivíduo seria considerado normal e não consistente com um diagnóstico clínico. Foi analisado um mínimo de 200 células interfásicas para cada uma das 25 suspensões de células fixas de medula óssea que foram consideradas negativas para uma deleção de *TP53* ou *ATM*, resultando num mínimo de 5000 núcleos pontuados para cada tipo de amostra.

O valor de cut-off foi determinado utilizando a função β-inverso (BETAINV) no MS Excel. Foi calculado como a percentagem de células interfásicas que apresentam um padrão de sinais falso positivo utilizando o limite superior de um intervalo de confiança de 95% unilateral da distribuição binomial numa amostra de doente normal.

Tabela 3. Caracterização dos Valores de Cut-off Normais para a P53 (TP53)/ATM Combination Deletion Probe

| Tipo de amostra | Padrão de sinais | Resultado de cut-off |
|---|---|---|
| Medula óssea | 2Verm1Verd | 3,78% |
| | 1Verm2Verd | 8,97% |

Os laboratórios devem verificar os valores de cut-off utilizando os seus próprios dados.[7,8]

***Precisão***
A precisão deste produto foi medida em termos da precisão intradiária (amostra para amostra), da precisão interdiária (dia para dia) e da precisão interlotes de um único centro (lote para lote).

Foram utilizadas três (3) amostras para avaliar a precisão deste produto: uma amostra de medula óssea normal (demonstrada por FISH como sendo negativa para deleções tanto de *TP53* como de *ATM* antes de ser utilizada no estudo), uma amostra de medula óssea positiva baixa para deleção de *ATM* 2Verm1Verd e uma amostra de medula óssea positiva baixa para deleção de *TP53* 1Verm2Verd. As amostras de medula óssea positivas baixas foram, cada uma, fabricadas utilizando uma proporção de uma amostra de medula óssea negativa e misturando-a com uma amostra de medula óssea positiva conhecida, com o objetivo de criar amostras positivas baixas no intervalo de 2–4x o valor de cut-off para desafiar o valor de cut-off estabelecido.

Para estabelecer as precisões interdiária e intradiária, as amostras foram avaliadas em dez (10) datas não consecutivas e, para estabelecer a precisão de lote para lote, foram avaliados três (3) lotes do produto com três (3) réplicas das mesmas amostras. Os resultados foram apresentados como a concordância global com a classe negativa prevista (para as amostras negativas).

Tabela 4. Reprodutibilidade e Precisão para a P53 (TP53)/ATM Combination Deletion Probe

| Variável | Tipo de amostra | Concordância |
|---|---|---|
| Reprodutibilidade intradiária (amostra para amostra) e interdiária (dia para dia) | Negativa de medula óssea | 100% |
| | Positiva baixa de medula óssea 2Verm1Verd (deleção de *ATM*) | 96,7% |
| | Positiva baixa de medula óssea 1Verm2Verd (deleção de *TP53*) | 100% |
| Reprodutibilidade de lote para lote | Negativa de medula óssea | 100% |
| | Positiva baixa de medula óssea 2Verm1Verd (deleção de *ATM*) | 88,9% |
| | Positiva baixa de medula óssea 1Verm2Verd (deleção de *TP53*) | 100% |

***Desempenho Clínico***
Para assegurar que o produto deteta as deleções pretendidas, o desempenho clínico foi estabelecido através de um (1) estudo com amostras representativas da população pretendida para o produto: suspensões de células derivadas do sangue fixadas em solução de Carnoy (3:1 de metanol/ácido acético) de doentes com confirmação ou suspeita de leucemia linfocítica crónica (LLC). O tamanho da amostra para o estudo foi de trinta (30) espécimes, com a população-alvo de onze (11) espécimes positivos e dezanove (19) espécimes negativos para deleção de *ATM* e onze (11) espécimes positivos e dezanove (19) espécimes negativos para deleção de *TP53*. Todas as amostras foram anonimizadas e os resultados foram comparados com o estado conhecido da amostra. A sonda identificou corretamente o estado das amostras em todos os casos.

Os resultados destes testes foram analisados com vista a proporcionar os valores da sensibilidade clínica, da especificidade clínica e da taxa de falsos positivos (FPR) para os sinais positivos, utilizando uma abordagem unidimensional.

Tabela 5. Desempenho Clínico da P53 (TP53)/ATM Combination Deletion Probe – Deleção de *ATM*

| Variável | Resultado |
|---|---|
| Sensibilidade clínica (taxa de verdadeiros positivos, TPR) | 99,93% |
| Especificidade clínica (taxa de verdadeiros negativos, TNR) | 99,99% |
| Taxa de falsos positivos (FPR) = 1 – Especificidade | 0,01% |

Tabela 6. Desempenho Clínico da P53 (TP53)/ATM Combination Deletion Probe – Deleção de *TP53*

| Variável | Resultado |
|---|---|
| Sensibilidade clínica (taxa de verdadeiros positivos, TPR) | 100,0% |
| Especificidade clínica (taxa de verdadeiros negativos, TNR) | 100,0% |
| Taxa de falsos positivos (FPR) = 1 – Especificidade | 0,00% |

**Resumo de Segurança e Desempenho (SSP)**
O SSP será disponibilizado para o público através da base de dados europeia sobre dispositivos médicos (Eudamed), onde está ligado ao UDI-DI básico.
URL da Eudamed: https://ec.europa.eu/tools/eudamed
UDI-DI básico: 50558449LPH052JJ

Se a Eudamed não estiver totalmente funcional, o SSP será disponibilizado para o público mediante solicitação para o e-mail SSP@ogt.com.

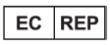
**Informações Adicionais**
Para obter mais informações sobre o produto, contacte o departamento de assistência técnica da CytoCell.
**T:** +44 (0)1223 294048
**E:** techsupport@cytocell.com
**W:** www.ogt.com

**Bibliografia**

1. Dohner, et al. N Eng J Med. 2000;343:1910-1916.
2. Rossi D, et al. Blood. 2013 Feb 21;121(8):1403-12.

3. Baliakas P, et al. Leukemia. 2014;(April):1-8.
4. *WHO Classification of Tumours Editorial Board. Haematolymphoid tumours* [Internet; beta version ahead of print]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2022 [cited 2023 December 18]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 11). Available from: https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63
5. Stankovic, et al., Blood. 2004;103(1):291-300.
6. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
7. Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. Genet Med. 2011;13(7):667-675.
8. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16–23.

**Glossário de Símbolos**

| **EN ISO 15223-1:2021 – "Dispositivos médicos – Símbolos a utilizar com informações fornecidas pelo fabricante – Parte 1: Requisitos gerais" (© Organização Internacional de Normalização)** | | |
|---|---|---|
| **Símbolo** | **Título** | **Número(s) de Referência** |
| | **pt:** Fabricante | 5.1.1 |
|  | **pt:** Representante autorizado na Comunidade Europeia/União Europeia | 5.1.2 |
| | **pt:** Prazo de validade | 5.1.4 |
| | **pt**: Código de lote | 5.1.5 |
| | **pt:** Número de catálogo | 5.1.6 |
| | **pt:** Manter afastado da luz solar | 5.3.2 |
| | **pt:** Limite de temperatura | 5.3.7 |
| | **pt:** Consultar as instruções de utilização | 5.4.3 |
| ogt.com/IFU | **pt:** Consultar as instruções de utilização eletrónicas | 5.4.3 |
| | **pt:** Cuidado | 5.4.4 |
| | **pt:** Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* | 5.5.1 |
| | **pt:** Suficiente para <n> testes | 5.5.5 |
| | **pt:** Identificação única do dispositivo | 5.7.10 |
| **Símbolos EDMA para reagentes e componentes IVD, revisão de outubro de 2009** | | |
| **Símbolo** | **Título** | **Número(s) de Referência** |
| | **pt:** Conteúdo (ou contém) | N/D |

**Patentes e Marcas Comerciais**
CytoCell é uma marca registada da Cytocell Limited.

**Cytocell Limited**
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

**Sysmex Europe SE**
Bornbarch 1
22848 Norderstedt
ALEMANHA

T: +49 40 527260
W: www.sysmex-europe.com

**Histórico de Versões das IFU**
V001 08-01-2024: Novas IFU para Regulamento (UE) 2017/746
V002 2025-08-29: Remoção da marca UKCA.