



A Sysmex Group Company



Instruções de Utilização (IFU)

REF: CE-LPA 003-S / CE-LPA 003

Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit



APENAS PARA USO PROFISSIONAL



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

Utilização Prevista

O Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit da CytoCell® é um teste qualitativo não automatizado de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) utilizado para detectar a região do cromossoma 13q14.2 e a região do cromossoma 21q22.1 em células fixadas em solução de Carnoy (3:1 de metanol/ácido acético) derivadas de amostras de líquido amniótico, na enumeração dos cromossomas 13 e 21 em gestações de alto risco com suspeita de síndrome de Down ou Patau.

Indicações de Utilização

Este dispositivo destina-se a ser utilizado como adjuvante de outros testes clínicos e laboratoriais em vias reconhecidas de diagnóstico e cuidados clínicos, tais como rastreio ecográfico e testes bioquímicos, onde o conhecimento do estado do número de cópias na região cromossômica 13q14.2 e na região cromossômica 21q22.1 seria importante para o tratamento do doente.

Limitações

Este dispositivo destina-se a detectar material cromossômico que inclui as regiões do cromossoma 13q14.2 e do cromossoma 21q22.1 abrangidas pelos clones verde e laranja neste conjunto de sondas, respetivamente. Os ganhos ou perdas genômicos fora destas regiões ou as perdas ou ganhos parciais destas regiões poderão não ser detetados com este dispositivo.

Este dispositivo não se destina a: ser utilizado como diagnóstico isolado, como diagnóstico complementar, como rastreio com base na população, como teste descentralizado ou autodiagnóstico e não foi validado para tipos de amostra, tipos de doenças ou fins que não os mencionados na utilização prevista.

Este dispositivo destina-se a ser utilizado como adjuvante a 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 dos FISH devem ser efetuadas por técnicos devidamente qualificados, consistentes 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 à 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 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 cromossômica pré-natal, hematológica e de tumores sólidos. O ADN alvo, após fixação e desnaturação, está disponível para emparelhamento 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.

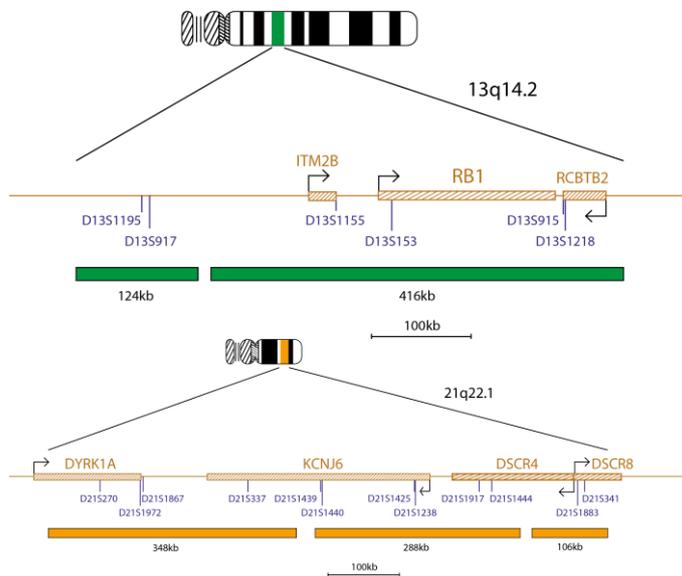
Informações sobre a Sonda

A Síndrome de Down (SD) é uma trissomia autossômica que é causada pela presença de uma terceira cópia (parcial ou total) do cromossoma 21 e caracteriza-se por uma incapacidade intelectual variável, hipotonia muscular e laxidão articular, frequentemente associada a um dimorfismo facial característico e várias anomalias, tais como defeitos cardíacos, gastrointestinais, neurosensoriais ou endócrinos^{1,2}. A SD é uma das principais causas de incapacidade intelectual a nível mundial e estes doentes também enfrentam vários problemas de saúde, incluindo a nível de aprendizagem e memória, doenças cardíacas congénitas (DCC), doença de Alzheimer (DA), leucemia, cancro e doença de Hirschsprung (DH)¹. A SD tem uma elevada complexidade genética e variabilidade fenotípica¹. Com 16 semanas de gestação, a incidência de gestações de SD é de 1 em 1050 para mães com 20 anos, 1 em 620 para mães com 30 anos e 1 em 70 para mães com 40 anos³.

A Síndrome de Patau (SP) é uma anomalia cromossômica causada pela presença de um cromossoma 13 extra e caracteriza-se por malformações cerebrais (holoprosencefalia), dimorfismo facial, anomalias oculares, polidactilia pós-axial, malformações viscerais (cardiopatia) e atraso psicomotor grave². A SP está associada a holoprosencefalia fenotípica e anomalias de fusão da linha média devido à fusão defeituosa da mesoderme pré-cordal na fase embrionária⁴. Com 16 semanas de gestação, a incidência de gestações de SP é de 1 em 11 000 para mães com 20 anos, 1 em 6500 para mães com 30 anos e 1 em 700 para mães com 40 anos³.

Especificação da Sonda

Sequência única 13, 13q14.2 Verde
Sequência única 21, 21q22.1 Laranja



A mistura de sondas verdes contém uma sonda de 124 kb e uma sonda de 416 kb que abrange os genes *ITM2B*, *RB1* e *RCBTB2*. A mistura de sondas laranja abrange uma região no 21q22.1 do gene *DYRK1A* ao gene *DSCR8*.

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 hibridização (<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 soluções de sonda contêm formamida, que é um teratogénico. Não inale vapores provenientes das mesmas nem permita o contacto com a pele. Manuseie com cuidado. Utilize luvas e uma bata de laboratório.
3. Manuseie o DAPI com cuidado. Utilize 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 recomendações nas Ficha de Dados de Segurança para determinar como eliminar este produto de forma segura. Tal também se aplica a conteúdos danificados do kit de testes.
6. Elimine todos os reagentes utilizados e quaisquer outros materiais contaminados que podem ser eliminados de acordo com os procedimentos para resíduos infecciosos ou potencialmente infecciosos. É responsabilidade de cada laboratório lidar com os resíduos sólidos e líquidos de acordo com a

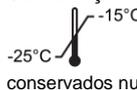
respetiva natureza e grau de perigo, bem como tratar e eliminar os mesmos (ou encarregar um terceiro de o fazer) de acordo com quaisquer regulamentações aplicáveis.

- Os operadores têm de ser capazes de distinguir as cores vermelha, azul e verde.
- O não cumprimento do protocolo e dos reagentes especificados pode afetar o desempenho do produto e dar origem a falsos resultados positivos/negativos.
- A sonda não deve ser diluída nem misturada com outras sondas.
- 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.
- Todos os produtos devem ser validados antes da utilização.
- 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:

- Placa quente (com uma placa sólida e controlo exato da temperatura até 80 °C)
- Micropipetas e pontas de volume variável calibradas, entre 1 µl–200 µl
- Aparelho de banho-maria com controlo exato da temperatura de 37 °C a 72 °C
- Tubos de microcentrifugação (0,5 ml)
- Microscópio de fluorescência (ver secção "Recomendação de microscópio de fluorescência")
- Microscópio de contraste de fase
- Jarras de Coplin limpas em plástico, cerâmica ou vidro termorresistente
- Pinça
- Medidor de pH calibrado (ou tiras indicadoras do pH capazes de medir um pH de 6,5–8,0)
- Recipiente humidificado
- Óleo de imersão de lentes para microscópio de fluorescência
- Centrífuga de bancada
- Lâminas de microscópio
- Lamelas de 24 x 24 mm
- Temporizador
- Incubadora a 37 °C
- Cola de solução de borracha
- Agitador vórtex
- Cilindros graduados
- Agitador magnético
- Termómetro calibrado

Equipamento Opcional não Fornecido

- Câmara de secagem citogenética

Reagentes Necessários, mas não Fornecidos

- Solução de citrato de sódio salino (SSC) 20x
- Etanol a 100%
- Tween-20
- Hidróxido de sódio 1M (NaOH)
- Ácido clorídrico 1M (HCl)
- 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
Laranja	551	572

Certifique-se de que os filtros de excitação e emissão apropriados, que abrangem os comprimentos de onda listados acima, estão instalados no microscópio. O filtro passa-banda triplo DAPI/FITC/TRITC é ideal para visualizar os fluoróforos verdes e laranja, bem como o corante em simultâneo. O filtro passa-banda triplo DAPI/FITC/Texas Red também pode ser utilizado para visualizar os fluoróforos e o DAPI simultaneamente.

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 células fixadas em solução de Carnoy (3:1 de metanol/ácido acético) derivadas de amostras de líquido amniótico, na enumeração dos cromossomas 13 e 21 em gestações de alto risco com suspeita de síndrome de Down ou Patau, que são preparadas de acordo com as diretrizes do laboratório ou da instituição em causa. A colheita de amostras de líquido amniótico deve ser efetuada de acordo com as diretrizes do laboratório ou da instituição em causa. As amostras com vestígios de sangue ou acastanhadas não devem ser utilizadas, uma vez que podem conter sangue materno e conduzir a resultados falsos. 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 lâminas⁵.

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 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 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 7,0 utilizando NaOH ou HCl, conforme necessário. Conserve a solução durante um máximo de 4 semanas à temperatura ambiente num recipiente hermético.

Pré-tratamento Recomendado para a Lâmina⁵.

- Mergulhe a lâmina preparada a partir de células fixadas com 3:1 de metanol/ácido acético derivadas de amostras de líquido amniótico em SSC 2x durante 1 hora a 37 °C.
- Coloque a lâmina em solução ativa de pepsina fresca (5 mg de pepsina adicionada a 100 ml de HCl a 0,01 M) durante 13 minutos a 37 °C.
- Mergulhe a lâmina em solução salina tamponada com fosfato (PBS) à TA durante 5 minutos.
- Mergulhe a lâmina em solução pós-fixação (formaldeído a 0,95%: 1,0 ml de formaldeído a 37%, 0,18 g de MgCl₂ e 39,0 ml de PBS) durante 5 minutos à TA.
- Mergulhe a lâmina em PBS à TA durante 5 minutos.
- Mergulhe a lâmina em etanol a 70% à TA. Permita que a lâmina permaneça no banho de etanol durante 2 minutos.
- Retire a lâmina do etanol a 70%. Repita o passo 6 com etanol a 80%, seguido de etanol a 100%.
- Deixe secar ao ar.

Protocolo FISH

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

Preparação das Lâminas (avance este passo se a lâmina foi pré-tratada de acordo com o protocolo acima)

- 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. Se não houver uma câmara de secagem citogenética, utilize um exaustor de laboratório como alternativa.)
- Mergulhe a lâmina em SSC 2x durante 2 minutos à temperatura ambiente (TA) sem agitar.
- Desidrate numa série de etanol (70%, 85% e 100%), cada uma durante 2 minutos à TA.
- Deixe secar.

Pré-desnaturação

- Retire a sonda do congelador e deixe-a aquecer até à TA. Centrifugue os tubos brevemente antes de os utilizar.
- Certifique-se de que a solução da sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
- 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.
- Coloque a sonda e a lâmina da amostra numa placa quente a 37 °C (+/-1 °C) durante 5 minutos para pré-aquecimento.
- 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

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

Hibridização

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

Lavagens Pós-hibridização

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

Recomendações para o Procedimento

- O envelhecimento ou aquecimento das lâminas no forno pode reduzir a fluorescência do sinal.
- As condições de hibridização podem ser negativamente afetadas pela utilização de reagentes que não sejam os fornecidos ou recomendados pela Cytocell Ltd.
- 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.
- 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.
- Uma desnaturação incompleta pode resultar em ausência de sinal, e uma desnaturação excessiva também pode resultar em ligação não específica.
- Uma hibridização excessiva pode resultar em sinais adicionais ou inesperados.
- Os utilizadores devem otimizar o protocolo para as suas próprias amostras antes de utilizarem o teste para efeitos de diagnóstico.
- 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:

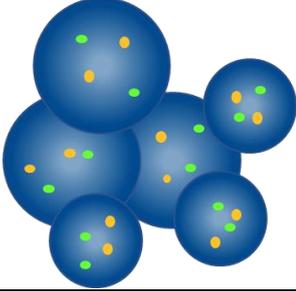
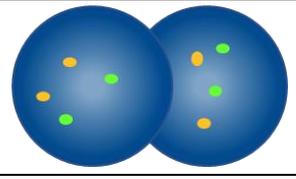
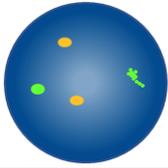
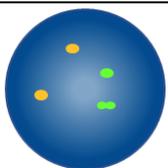
- Os sinais são demasiado fracos para analisar com filtros simples – para proceder à análise, os sinais devem ser luminosos, distintos e facilmente avaliáveis.
- Há um número elevado de células agrupadas/sobrepostas a obstruir a análise.
- >50% das células não estão hibridizadas.
- Há um excesso de partículas fluorescentes entre as células e/ou uma névoa fluorescente que interfere com os sinais – nas lâminas que estejam em condições 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

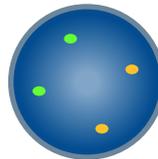
- Dois analistas devem analisar e interpretar cada amostra. Qualquer discrepância deve ser resolvida pela avaliação de um terceiro analista.
- Cada analista deve estar adequadamente qualificado de acordo com as normas nacionais reconhecidas.
- Cada analista deve pontuar independentemente núcleos suficientes de cada amostra para que as pontuações combinadas dos analistas cumpram os critérios mínimos especificados pelas diretrizes institucionais, regionais ou nacionais. 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.

- Quando analisar sondas de quebra de duas cores, se houver um intervalo entre os sinais vermelho e verde não superior à largura de 2 sinais, conte-os como sinais não rearranjados/fundidos
- Quando analisar sondas de quebra de três cores, se houver um intervalo entre qualquer um dos sinais 3 sinais (vermelho, verde, azul) não superior à largura de 2 sinais, conte-os como sinais não rearranjados/fundidos
- Se tiver dúvidas sobre se uma célula é analisável ou não, não a analise.

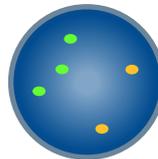
Diretrizes para a Análise	
	Não contar – os núcleos estão demasiado juntos para determinar limites
	Não contar núcleos sobrepostos – todas as áreas de ambos os núcleos não estão visíveis
	Contar como dois sinais laranjas e dois sinais verdes – um dos dois sinais verdes é difuso
	Contar como dois sinais laranjas e dois sinais verdes – o intervalo num sinal verde é inferior a duas larguras de sinal

Padrão de Sinais Normal Esperado

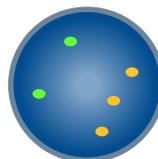


Numa célula normal, espera-se dois sinais verdes e dois sinais laranjas (2Verd2L).

Padrões de Sinais Anormais Esperados



Numa célula com trissomia 13, espera-se três sinais verdes e dois sinais laranjas (3Verd2L).



Numa célula com trissomia 21, espera-se dois sinais verdes e três sinais laranjas (2Verd3L).

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 paciente/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 sérios noutros países, comunique-os ao fabricante e, se aplicável, à autoridade competente nacional.

Contacto de vigilância do fabricante: vigilance@oqt.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 hibridizam com o locus correto e nenhuma outra localização. Foram analisados quatro loci cromossómicos em cada uma de 20 células metafásicas de cinco amostras, proporcionando 400 pontos de dados. A localização de cada sonda hibridizada foi mapeada e o número de sinais de FISH de cromossomas metafásicos que se hibridizaram 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 hibridizaram com o locus correto, dividido pelo número total de sinais de FISH de cromossomas metafásicos hibridizados. 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 o Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit

Alvo	Número de cromossomas metafásicos hibridizados	Número de loci corretamente hibridizados	Especificidade Analítica	Intervalo de Confiança de 95%
21q22.1	200	200	100%	98,12–100%
13q14.2	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 50 células interfásicas para cada uma das 25 suspensões de células fixas de amostras de líquido amniótico de indivíduos do sexo masculino ou feminino cariotipicamente normais que foram confirmados como tendo um complemento normal dos cromossomas 13 e 21 por FISH ou cariótipo, resultando num mínimo de 1250 núcleos pontuados para cada tipo de amostra. Os dados da 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 o Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit

Tipo de Amostra	Crítérios de Sensibilidade	Resultado da Sensibilidade
Líquido Amniótico	>95%	96,24% (94,84–97,64%)

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 50 células interfásicas para cada uma das 25 suspensões de células fixas de amostras de líquido amniótico de indivíduos do sexo masculino ou feminino cariotipicamente normais que foram confirmados como tendo um complemento normal dos cromossomas 13 e 21 por FISH ou cariótipo, resultando num mínimo de 1250 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 o Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit

Tipo de Amostra	Resultado de Cut-off
Líquido Amniótico	8,97%

Os laboratórios *devem obrigatoriamente* verificar os valores de cut-off utilizando os seus próprios dados e de acordo com quaisquer diretrizes de melhores práticas institucionais, regionais ou profissionais que possam ser aplicáveis ao seu contexto de diagnóstico^{6,7}.

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 líquido amniótico normal, uma amostra de líquido amniótico com trissomia 13 positiva baixa (3Verd2L) e uma amostra de líquido amniótico com trissomia 21 positiva baixa (2Verd3L). As amostras de fluido amniótico positivas baixas foram fabricadas utilizando uma proporção da amostra de líquido amniótico normal e misturando-a com uma amostra de líquido amniótico positiva conhecida, com o objetivo de criar uma amostra positiva baixa no intervalo de 2–4x o valor de cut-off.

Para estabelecer as precisões interdiária e intradiária, as amostras foram avaliadas em 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 o Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit

Variável	Tipo de amostra	Concordância
Precisão intradiária e precisão interdiária	Negativa de líquido amniótico	100%
	Positiva baixa de líquido amniótico com trissomia 13 (3Verd2L)	100%
	Positiva baixa de líquido amniótico com trissomia 21 (2Verd3L)	96,7%
Lote para lote e precisão interdiária	Negativa de líquido amniótico	88,9%
	Positiva baixa de líquido amniótico com trissomia 13 (3Verd2L)	100%
	Positiva baixa de líquido amniótico com trissomia 21 (2Verd3L)	100%

Desempenho Clínico

Para assegurar que o produto deteta os rearranjos pretendidos, o desempenho clínico foi estabelecido através de três estudos, com amostras representativas da população pretendida para o produto: Material fixado com 3:1 de metanol/ácido acético residual de amostras líquido amniótico pré-natal. O tamanho da amostra para o estudo foi de 172 espécimes, com uma população de 15 espécimes positivos para trissomia 13 e 157 espécimes negativos para trissomia 13, e um total de 109 espécimes positivos para trissomia 21 e 63 espécimes negativos para trissomia 21. 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 para o Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit

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: 50558449LPA003GL

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

Bibliografia

- Asim A, Kumar A et al. Down syndrome an insight of the Disease. Journal of Biomedical Science, 2015;22(41):1-9
<https://www.orpha.net/>
- Gardner, R. and Amor, D. Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 5th ed: OUP USA, 2018
- Noriega MA, Siddik AB. s.l. Trisomy 13 : StatPearls[Internet], Treasure Island[FL], updated 2021.
- 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.

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 eletrônicas	5.4.3
	pt: Cuidado	5.4.4
	pt: Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	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

V001.00 2023-01-11: Novas IFU para Regulamento (UE) 2017/746.