



A Sysmex Group Company



Instruções de utilização (IFU)

REF.º: CE-LPA 001-S / CE-LPA 001 /
CE-LPA 001-30 / CE-LPA 001-50

Prenatal Enumeration Probe Kit



APENAS PARA UTILIZAÇÃO PROFISSIONAL



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

Utilização prevista

O CytoCell® Prenatal Enumeration Probe Kit é um teste qualitativo não automatizado de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) utilizado para detetar as regiões alacentroméricas cromossômicas Xp11.1-q11.1, Yp11.1-q11.1 e 18p11.1-q11.1, e as regiões cromossômicas 13q14.2 e 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 X, Y, 13, 18 e 21 em gestações de alto risco com suspeita de síndrome de Turner, Patau, Edwards ou Down.

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 nas regiões alacentroméricas cromossômicas Xp11.1-q11.1 e 18p11.1-q11.1 e nas regiões cromossômicas 13q14.2 e 21q22.1 seria importante para o tratamento do doente.

Limitações

Este dispositivo foi concebido para detetar material cromossômico que inclui as regiões centroméricas abrangidas pelos clones verde, laranja e aqua no componente de Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe, para os cromossomas X, Y e 18, respetivamente. Os ganhos ou perdas genómicas fora destas regiões ou as perdas ou ganhos parciais destas regiões poderão não ser detetados com este dispositivo.

Este dispositivo destina-se também a detetar material cromossômico que inclui as regiões cromossômicas 13q14.2 e 21q22.1 abrangidas pelos clones verde e laranja no componente de Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe. Os ganhos ou perdas genómicas fora destas regiões ou as perdas ou ganhos parciais destas regiões poderão não ser detetados com este produto.

Este dispositivo não se destina a ser utilizado: como diagnóstico autónomo, diagnóstico complementar, 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. Este dispositivo não foi validado para utilização na deteção de ganhos do cromossoma X e/ou Y.

Este dispositivo 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 uma utilização profissional em ambiente laboratorial.

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 hibridam com cromossomas inteiros ou sequências únicas individuais e serve de forte adjuvante à citogenética clássica. Desenvolvidos recentemente fizeram com que esta valiosa técnica possa agora ser aplicada como uma ferramenta de diagnóstico essencial na análise cromossômica pré-natal, hematológica e patológica. O ADN-alvo, após fixação e desnaturação, fica disponível para hibridização 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 contraincorporado para efeitos de visualização. A microscopia de fluorescência permite então a visualização da sonda hibridada no material-alvo.

Informações sobre a sonda

A análise citogenética molecular desempenha um papel fundamental na avaliação pré-natal de gestações de alto risco, permitindo a identificação exata de anomalias cromossômicas e a avaliação do risco de recorrência. As anomalias cromossômicas mais comuns são as aneuploidias, definidas como um número de cópia de cromossomas anormais, com os indivíduos afetados a apresentarem tipicamente trissomia (três cópias de um cromossoma) ou monossomia (cópia única de um cromossoma).¹ As aneuploidias bem conhecidas e clinicamente significativas incluem as trissomias dos cromossomas 13, 18 e 21, bem como a monossomia do cromossoma X. Estas anomalias contribuem significativamente para as perturbações do desenvolvimento e para resultados reprodutivos adversos, estando entre as indicações mais comuns para o diagnóstico pré-natal invasivo.²

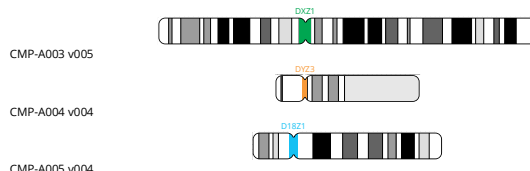
A trissomia 21 (síndrome de Down), a trissomia autossômica viável mais comum, caracteriza-se por défice cognitivo, anomalias cardíacas congénitas e morbilidade multissistémica, continuando a ser uma indicação fundamental para a realização de testes genéticos pré-natais.^{3,4} A trissomia 13 (síndrome de Patau) caracteriza-se por malformações cerebrais (holoprosencefalia), dismorfismo facial, anomalias oculares, polidactilia pós-axial, malformações viscerais (cardiopatia) e atraso psicomotor grave.⁵ A trissomia 18 (síndrome de Edwards) está associada a malformações congénitas graves, elevada mortalidade perinatal e fenótipos ecográficos bem definidos, sublinhando a necessidade de uma deteção pré-natal precisa e de confirmação genética.^{6,7} A monossomia X (síndrome de Turner), também referida como síndrome de hipoplasia ovárica congénita, é a anomalia cromossômica sexual mais comum no sexo feminino e resulta da ausência total ou parcial de um cromossoma X.⁸

O diagnóstico pré-natal é proposto em gestações de alto risco, com risco acrescido de anomalias cromossômicas, como a trissomia 13, 18, 21 e a monossomia do cromossoma X. A FISH é um método de citogenética molecular validado para a deteção rápida e a contagem do número de cópias cromossômicas em núcleos interfásicos. A FISH permite a deteção orientada de aneuploidias comuns e fornece resultados rápidos para apoiar a tomada de decisões clínicas, sendo amplamente utilizada nos diagnósticos modernos de aneuploidias, particularmente quando é necessária uma confirmação imediata do estado do número de cópias cromossômicas.^{9,10,11}

Especificação da sonda

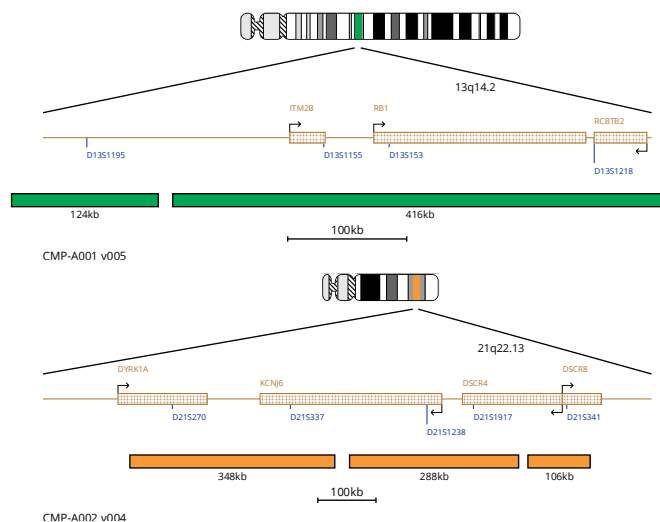
LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Centrómero X, Xp11.1-q11.1 (DXZ1) Verde
Centrómero Y, Yp11.1-q11.1 (DYZ3) Laranja
Centrómero 18, 18p11.1-q11.1 (D18Z1) Aqua



LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

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



O kit contém dois componentes de sondas para duas hibridizações separadas.

LPA002

O componente de sondas LPA002 é uma mistura de sondas de ADN diretamente marcadas por fluorescência verde, laranja e aqua:

- A sonda verde DXZ1 marca diretamente as sequências de ADN alfa satélite na região DXZ1 do cromossoma X.
- A sonda laranja DYZ3 marca diretamente as sequências de ADN alfa satélite na região DYZ3 do cromossoma Y.
- A sonda aqua D18Z1 marca diretamente as sequências de ADN alfa satélite na região D18Z1 do cromossoma 18.

LPA003

O componente de sondas LPA003 é uma mistura de sondas de ADN diretamente marcadas por fluorescência verde e laranja contendo sequências únicas:

- A mistura de sondas verdes contém uma sonda de 124 kb e uma sonda de 416 kb em 13q14.2 que abrange os genes ITM2B, RB1 e RCBTB2, incluindo os marcadores D13S1195, D13S1155, D13S153 e D13S1218.
- A mistura de sondas laranja contém uma sonda de 348 kb, uma sonda de 288 kb e uma sonda de 106 kb em 21q22.13 que abrange os genes DYRK1A, KCNJ6, DSCR4 e DSCR8, incluindo os marcadores D21S270, D21S337, D21S1238, D21S1917 e D21S341.

Materiais fornecidos

Sonda: 50 µL por frasco num kit de 5 testes, 100 µL por frasco num kit de 10 testes, 300 µL por frasco num kit de 30 testes ou 500 µL por frasco num kit de 50 testes.
Os componentes de sondas são fornecidos pré-misturados 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 num kit de 5 testes, 500 µL por frasco num kit de 10 testes, 1000 µL por frasco num kit de 30 testes ou 1200 µL por frasco num kit de 50 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).

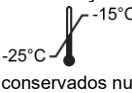
Advertências e precauções

1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Apenas para utilização profissional em laboratório.
2. Os operadores devem certificar-se de que as Instruções de utilização corretas e atualizadas são sempre consultadas e respeitadas.
3. As misturas de sondas contêm formamida, um teratogénico; não inalar vapores nem permitir o contacto com a pele. Manuseie com cuidado; use luvas e uma bata de laboratório.
4. Manuseie o DAPI com cuidado. Use luvas e uma bata de laboratório.
5. Não utilize se o(s) frasco(s) estiver(em) danificado(s), ou se o conteúdo do frasco for comprometido de qualquer forma.
6. 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.
7. Elimine todos os reagentes utilizados e quaisquer outros materiais contaminados que possam ser eliminados de acordo com os procedimentos para resíduos infecciosos ou potencialmente infecciosos. 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.
8. Os operadores têm de conseguir distinguir as cores aqua, laranja e verde.
9. A inobservância do protocolo, do equipamento e dos reagentes especificados pode afetar o desempenho do produto e dar origem a falsos resultados positivos/negativos.
10. A sonda não deve ser diluída nem misturada com outras sondas.
11. A não utilização de 10 µL de sonda durante a fase pré-desnaturação do protocolo pode afetar o desempenho do produto e dar origem a falsos resultados positivos/negativos.
12. Todos os produtos devem ser validados antes de serem utilizados.
13. Devem ser efetuados controlos internos utilizando populações de células não afetadas em amostras de testes.
14. Devem ser tomadas precauções para evitar a contaminação entre os frascos contendo o LPA002 e o LPA003.

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). **Sondas FISH:** 5 ciclos para o kit de 5 testes, 10 ciclos para o kit de

10 testes, 30 ciclos para o kit de 30 testes, 50 ciclos para o kit de 50 testes.
Contracorante: 10 ciclos para o kit de 5 testes, 20 ciclos para o kit de 10 testes, 60 ciclos para o kit de 30 testes, 100 ciclos para o kit de 50 testes. A exposição à luz deve ser reduzida ao mínimo e evitada sempre que possível. Armazene os componentes no recipiente à prova de luz 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 à luz.

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. Centrifuga 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 kit de sondas são excitadas e emitem luz nos seguintes comprimentos de onda:

Substância fluorescente	Excitação _{máx} [nm]	Emissão _{máx} [nm]
Aqua	418	467
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 tripla DAPI/FITC/TRITC é ideal para visualizar os fluoróforos verdes e laranja, bem como o contracorante em simultâneo. O fluoróforo aqua tem especificidade para o espetro Aqua e DEAC (é necessário um filtro passa-banda simples Aqua ou DEAC).

Verifique o microscópio de fluorescência antes da sua utilização para garantir o seu correto funcionamento. 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 células fixadas em solução de Carnoy (3:1 de metanol/ácido acético) derivadas de amostras de líquido amniótico, na enumeração dos cromossomas X, Y, 13, 18 e 21 em gestações de alto risco com suspeita de síndrome de Turner, Patau, Edwards ou Down, que são preparadas de acordo com as diretrizes do laboratório ou da instituição em causa. A colheita das amostras de líquido amniótico deve ser realizada 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 as amostras secas ao ar em lâminas de microscópio de acordo com os procedimentos citogenéticos padrão. O manual laboratorial de citogenética da AGT (*Cytogenetics Laboratory Manual*) contém recomendações para a colheita de espécimes, realização de culturas, colheitas e preparação de lâminas.¹²

Preparação da solução
Soluções de etanol

Dilua etanol a 100% com água purificada utilizando os seguintes rários 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 às luzes do laboratório seja 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 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.

Hibridização

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

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 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 processuais

1. O envelhecimento ou o cozimento 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 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 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 aquém do ideal podem resultar em ligação não específica que pode ser incorretamente interpretada como um sinal de sonda.

Interpretação dos resultados

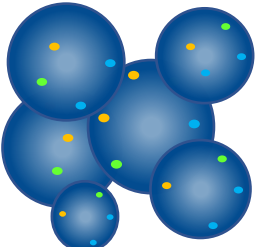
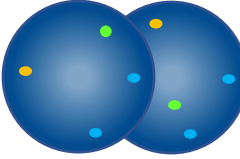
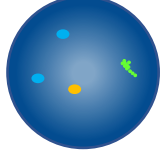
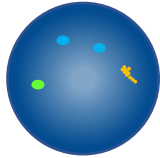
Avaliação da qualidade das lâminas

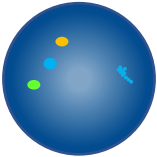
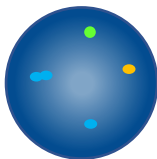
A lâmina não deve ser analisada nos seguintes casos:

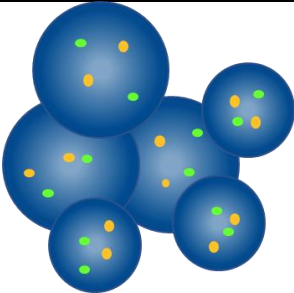
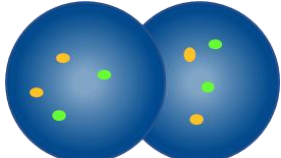
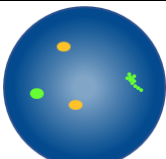
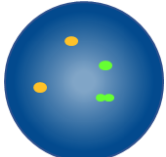
- Os sinais são demasiado fracos para analisar com filtros simples – para proceder à análise, os sinais devem ser luminosos, distintos e facilmente avaliáveis.
- Há um número elevado de células agrupadas/sobrepostas a obstruir a análise.
- >50% das células não estão hibridadas.
- Há um excesso de partículas 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 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 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 hibridização 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 ambos os sinais, conte-os como um sinal.
- Se tiver dúvidas sobre se uma célula é analisável ou não, não a analise.

Diretrizes para a análise – LPA002	
	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 um sinal verde, um sinal laranja e dois sinais aqua – o sinal verde é difuso
	Contar como um sinal verde, um sinal laranja e dois sinais aqua – o sinal laranja é difuso

	Contar como um sinal verde, um sinal laranja e dois sinais aqua – um dos dois sinais aqua é difuso
	Contar como um sinal verde, um sinal laranja e dois sinais aqua – o intervalo no sinal aqua é menos de duas larguras de sonda

Diretrizes para a análise – LPA003	
	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 laranja e dois sinais verdes – um dos dois sinais verdes é difuso
	Contar como dois sinais laranja e dois sinais verdes – o intervalo num sinal verde é inferior a duas larguras de sinal

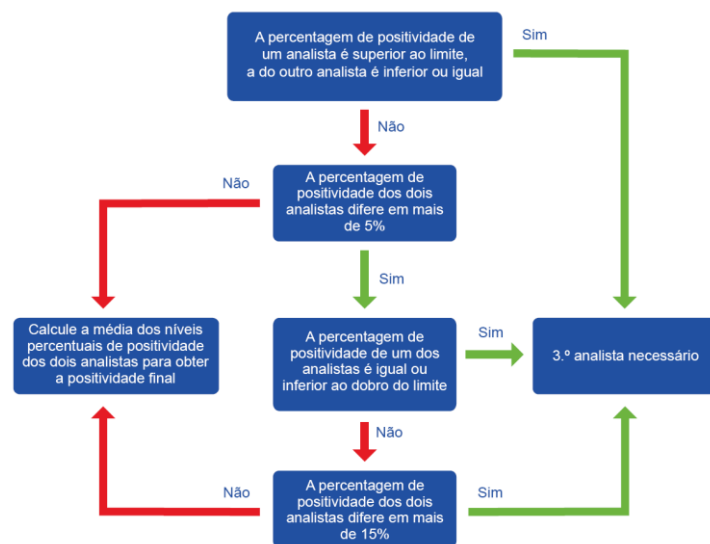
Recurso a terceiro analista

Consoante o número de núcleos anormais que cada analista observou, poderá ser necessário recorrer a um terceiro analista. O terceiro analista analisará o mesmo número de núcleos que os dois primeiros analistas, conforme especificado pelas diretrizes institucionais, regionais ou nacionais. As regras para a utilização de um terceiro analista estão detalhadas no texto e fluxograma abaixo.

É necessário recorrer a um terceiro analista nos seguintes casos:

- A percentagem de positividade de um dos analistas é superior ao limite e a percentagem de positividade dos outros analistas é inferior ou igual ao limiar.
- A percentagem de positividade dos dois analistas difere em mais de 5% e a percentagem de positividade de um dos analistas é igual ou inferior ao dobro do limite.
- A percentagem de positividade dos dois analistas difere em mais de 15%.

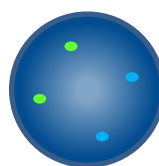
Das três pontuações obtidas, será calculada a média dos dois valores percentuais positivos mais próximos para obter a positividade final. Se as três pontuações forem equidistantes, deve utilizar-se o valor mediano de positividade.



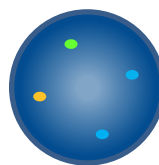
Resultados esperados

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Padrões de sinais normais esperados

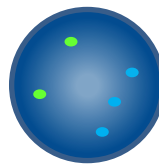


Numa célula feminina normal, espera-se dois sinais verdes e dois sinais aqua (2Verd2A).

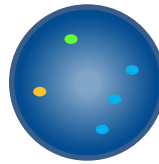


Numa célula masculina normal, espera-se um sinal verde, um sinal laranja e dois sinais aqua (1Verd1L2A).

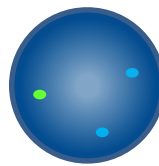
Padrões de sinais anormais esperados



Numa célula feminina com trissomia 18, o padrão de sinais esperado será dois sinais verdes e três sinais aqua (2Verd3A).



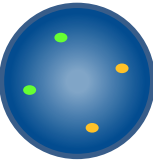
Numa célula masculina com trissomia 18, o padrão de sinais esperado será um sinal verde, um sinal laranja e três sinais aqua (1Verd1L3A).



Numa célula com síndrome de Turners, o padrão de sinais esperado é um sinal verde e dois sinais aqua (1Verd2A).

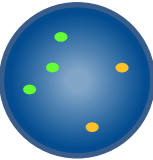
LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Padrão de sinais normal esperado

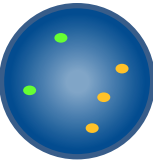


Numa célula normal, espera-se dois sinais verdes e dois laranja (2Verd2L).

Padrões de sinais anormais esperados



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



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

São possíveis outros padrões de sinais em espécimes aneuploides/desequilibrados.

Interferências/substâncias interferentes relevantes conhecidas

Sem interferências/substâncias interferentes relevantes conhecidas.

Reatividade cruzada conhecida

A sonda DXZ1 pode apresentar hibridização cruzada aos centrômeros dos cromossomas 1, 11, 17 e Y.

A sonda DY23 pode apresentar hibridização cruzada aos centrômeros dos cromossomas 13, 14, 15, 20, 21, 22 e X.

A sonda D18Z1 pode apresentar hibridização cruzada com os centrômeros dos cromossomas 2, 4, 8, 9, 13, 14, 15, 20, 21 e 22.

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 ocorridos noutros países, é favor comunicá-los ao fabricante e, se aplicável, à autoridade nacional competente.

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

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

A especificidade analítica é definida como a percentagem de sinais que se hibridam com o locus correto e nenhuma outra localização. Foram analisados 4 loci cromossômicos em cada uma de 20 células metafásicas de 5 amostras, proporcionando 100 pontos de dados para os cromossomas X e Y e 200 pontos de dados para o cromossoma 18. A localização de cada sonda hibridada foi mapeada e o número de sinais de FISH de cromossomas metafásicos hibridados 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 expresso em forma de percentagem com um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 1. Especificidade analítica para a LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Alvo	Número de cromossomas metafásicos hibridados	Número de loci corretamente hibridados	Especificidade analítica	Intervalo de confiança de 95%
Xp11.1-q11.1	100	100	100%	96,30–100%

Yp11.1-q11.1	100	100	100%	96,30–100%
18p11.1-q11.1	200	200	100%	98,12–100%

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

A especificidade analítica é definida como a percentagem de sinais que se hibridam com o locus correto e nenhuma outra localização. Foram analisados 4 loci cromossômicos em cada uma de 20 células metafásicas de 5 amostras, proporcionando 200 pontos de dados para cada um dos cromossomas 13 e 21. A localização de cada sonda hibridada foi mapeada e o número de sinais de FISH de cromossomas metafásicos hibridados 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 expresso em forma de percentagem com um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 2. Especificidade analítica para a LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Alvo	Número de cromossomas metafásicos hibridados	Número de loci corretamente hibridados	Especificidade analítica	Intervalo de confiança de 95%
13q14.2	200	200	100%	98,12–100%
21q22.1	200	200	100%	98,12–100%

Sensibilidade analítica

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

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 e 25 do sexo feminino cariotipicamente normais que foram considerados como tendo um complemento normal do cromossoma 18, resultando num mínimo de 2500 núcleos pontuados no total. 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 3. Sensibilidade analítica para a LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Tipo de amostra	Crítérios de sensibilidade	Resultado da sensibilidade
Líquido amniótico	>95%	95,99% (95,15–96,69%)

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

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 considerados como tendo um complemento normal dos cromossomas 13 e 21, 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 4. Sensibilidade analítica para a LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Tipo de amostra	Crítérios de sensibilidade	Resultado da sensibilidade
Líquido amniótico	>95%	96,24% (94,84–97,64%)

Caracterização dos valores de limite normais

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

O valor de limite 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 e 25 do sexo feminino cariotipicamente normais que foram considerados como tendo um complemento normal do cromossoma 18, resultando num mínimo de 2500 núcleos pontuados no total.

O valor de limite foi determinado utilizando a função β -inversa (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 5. Caracterização dos valores de limite normais para a LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Tipo de amostra	Padrão de sinais	Resultado de limite
Líquido amniótico	1Verd1L3A	11,62%
	2Verd3A	8,97%
	1Verd2A	13,98%

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

O valor de limite 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 suspensões de células de líquido amniótico de 25 indivíduos do sexo masculino ou feminino cariotipicamente normais, resultando num mínimo de 1250 núcleos pontuados para cada tipo de amostra.

O valor de limite foi determinado utilizando a função β -inversa (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 6. Caracterização dos valores de limite normais para a LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Tipo de amostra	Padrão de sinais	Resultado de limite
Líquido amniótico	2Verd3L	8,97%
	3Verd2L	

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

Precisão

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

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 3 amostras para avaliar a precisão deste produto: 1 amostra de líquido amniótico masculino normal considerado XY e com um complemento normal do cromossoma 18; 1 amostra de líquido amniótico feminino normal considerado XX e com um complemento normal do cromossoma 18; e 1 amostra de líquido amniótico feminino com trissomia 18 positiva baixa.

A precisão interdiária e intradiária foi avaliada através da análise de amostras em triplicado em 10 dias não consecutivos. A precisão interlotes foi avaliada testando 3 lotes de produtos independentes em triplicado, utilizando as mesmas amostras. Os resultados foram expressos como concordância global com a classificação esperada (positiva ou negativa).

Tabela 7. Reprodutibilidade e precisão para a LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Variável	Tipo de amostra	Concordância
Intradiária	Líquido amniótico feminino negativo	100,0%
	Líquido amniótico feminino com trissomia 18	90,0%
Interdiária	Líquido amniótico feminino negativo	100,0%
	Líquido amniótico feminino com trissomia 18	90,0%
	Líquido amniótico masculino negativo	100,0%
Interlotes	Líquido amniótico feminino negativo	100,0%
	Líquido amniótico feminino com trissomia 18	100,0%
	Líquido amniótico masculino negativo	100,0%

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

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 3 amostras para avaliar a precisão deste produto: 1 amostra de líquido amniótico normal considerada como tendo um complemento normal dos cromossomas 13 e 21; 1 amostra de líquido amniótico com trissomia 13 positiva baixa; e 1 amostra de líquido amniótico com trissomia 21 positiva baixa.

A precisão interdiária e intradiária foi avaliada através da análise de amostras em triplicado em 10 dias não consecutivos. A precisão interlotes foi avaliada testando 3 lotes de produtos independentes em triplicado, utilizando as mesmas amostras. Os resultados foram expressos como concordância global com a classificação esperada (positiva ou negativa).

Tabela 8. Reprodutibilidade e precisão para a LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Variável	Tipo de amostra	Concordância
Intradiária e interdiária	Líquido amniótico negativo	100,0%
	Líquido amniótico com trissomia 13 positiva baixa	100,0%
	Líquido amniótico com trissomia 21 positiva baixa	96,7%
Interlotes	Líquido amniótico negativo	88,9%
	Líquido amniótico com trissomia 13 positiva baixa	100,0%
	Líquido amniótico com trissomia 21 positiva baixa	100,0%

Desempenho clínico

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Para assegurar que a Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe deteta os rearranjos pretendidos, o desempenho clínico foi estabelecido através de um estudo, com amostras representativas da população pretendida para o produto: material fixado com 3:1 de metanol/ácido acético residual de amostras de líquido amniótico pré-natal. O tamanho da amostra para o estudo foi de 71 espécimes, com uma população de 3 espécimes positivos para trissomia 18, 2 espécimes positivos para monossomia X e 66 espécimes negativos. Todas as amostras foram anonimizadas e aleatorizadas para evitar enviesamentos na análise. Os resultados foram então comparados com o estado conhecido da amostra. A sonda identificou corretamente o estado das amostras em todas as situações.

Os resultados destes testes foram analisados para 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 9. Desempenho clínico da Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

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	0,0%

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Para assegurar que a Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe deteta os rearranjos pretendidos, o desempenho clínico foi estabelecido através de um estudo, com amostras representativas da população pretendida para o produto: material fixado com 3:1 de metanol/ácido acético residual de amostras de 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 então comparados com o estado conhecido da amostra. A sonda identificou corretamente o estado das amostras em todas as situações.

Os resultados destes testes foram analisados para 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 10. Desempenho clínico da Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

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	0,0%

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: 50558449LPA001GG

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

- Alliance G. (2010). Chromosomal Abnormalities [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK132134/>.
- Dey M, et al. (2013). Prenatal screening methods for aneuploidies. North American Journal of Medical Sciences.

3. Antonarakis SE, Strydom A. (2020). Down Syndrome. Nature Reviews Disease Primers.
4. Orphanet: Down syndrome [Internet]. www.orpha.net. Disponível em: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/870>.
5. Orphanet: Trisomy 13 [Internet]. www.orpha.net. Disponível em: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/3378>.
6. Pyle AK, et al. (2025) Guidance for Caring for Infants and Children With Trisomy 13 and Trisomy 18: Clinical Report. PEDIATRICS.
7. Balasundaram P, et al. (2023). Edwards syndrome. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; jan 2025. Atualizado em 15 fev 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570597/>.
8. Shankar Kikkeri N, et al. (2023). Turner Syndrome; disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554621/>.
9. Best Practice Guidelines (2024). The Association for Clinical Genomic Science (ACGS). Cytogenetics Constitutional Guidelines.
10. NHS England - National genomic test directory for rare and inherited disease. Disponível em: <https://www.england.nhs.uk/publication/national-genomic-test-directories/>
11. Silva M. et al. (2019) European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. European Journal of Human Genetics.
12. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc. References
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.

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
	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 registrada da CytoCell Limited.



CytoCell Limited
 Oxford Gene Technology
 418 Cambridge Science Park
 Milton Road
 CAMBRIDGE
 CB4 0PZ
 REINO UNIDO

T: +44 (0)1223 294048
 E: probes@cytoCELL.com
 W: www.ogt.com



Sysmex Europe SE
 Deelbøge 19 D
 22297 Hamburg
 ALEMANHA

 W: www.sysmex-europe.com

Histórico de versões das IFU
 V001 2026-03-09: Novas IFU para Regulamento (UE) 2017/746