



A Sismex Group Company



Instruções de Utilização (IFU)

REF: CE-LPH 036-S/CE-LPH 036

EV11 (MECOM) Breakapart Probe



APENAS PARA UTILIZAÇÃO PROFISSIONAL



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

Utilização Prevista

A CytoCell® EV11 (MECOM) Breakapart Probe é um teste qualitativo não automatizado de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) utilizado para detectar rearranjos cromossômicos envolvendo a região 3q26.2 no cromossoma 3 em suspensões de células derivadas de sangue fixadas em solução de Carnoy (3:1 de metanol/ácido acético) de doentes com confirmação ou suspeita de leucemia mieloide aguda com rearranjo do *MECOM* (LMA) ou neoplasias mielodisplásicas (SMD).

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 do rearranjo do *MECOM* seria importante para a gestão clínica.

Limitações

Este dispositivo destina-se a detectar rearranjos com pontos de quebra na região abrangida pelos clones vermelho, verde e aqua neste conjunto de sondas, o que inclui a região *MECOM* (sonda verde), uma região telomérica ao gene *MECOM* (sonda vermelha) e uma região centromérica ao gene *MECOM* (sonda aqua). Os pontos de quebra fora destas regiões ou os rearranjos variantes inteiramente contidos nesta região poderão não ser detetados com este dispositivo.

Este dispositivo não se destina a ser utilizado: como diagnóstico autónomo, como diagnóstico complementar, como teste pré-natal, como rastreio populacional, como 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 oncogene *MECOM* (locus complexo de MDS1 e EV11) em 3q26.2 é frequentemente rearranjado em doenças malignas hematológicas de origem mieloide, incluindo neoplasias mielodisplásicas (SMD) e leucemia mieloide aguda com rearranjo do *MECOM* (LMA). A sua expressão em células mieloides neoplásicas perturba a diferenciação mieloide, a regulação do ciclo celular e as vias de sinalização celular.¹

Esta expressão desregulada deve-se frequentemente a um rearranjo cromossómico que envolve a 3q26.2, sendo as duas aberrações mais frequentes (~40%) a t(3;3)(q21;q26.2) e a inv(3)(q21q26.2).¹ Foram descritos mais de 30 rearranjos da 3q26.2 adicionais, a maioria dos quais caracterizada ao nível molecular.¹

Os pontos de quebra das translocações e inversões variam consideravelmente. Os rearranjos do *MECOM* são muito heterogêneos e podem ser difíceis de detetar pela citogenética convencional, o que torna a FISH uma ferramenta útil para efeitos de deteção. Os pontos de quebra t(3;v)(q26.2;v) variantes podem estender-se desde 3' proximal ao *MECOM* até 5' distal ao promotor de MDS1-EV11, abrangido pela sonda verde. Por conseguinte, o padrão de sinais esperado para estas translocações varia consoante a posição do ponto de quebra.² O teste dos rearranjos do *MECOM* é recomendado tanto na SMD como na LMA.³

A LMA com rearranjos do *MECOM* é uma doença agressiva com uma sobrevivência curta independentemente da percentagem de blastos, sem diferenças nos resultados entre casos com inv(3)/t(3;3) em comparação com rearranjos do *MECOM* com outros parceiros.¹ A estratificação do risco de SMD incorpora variáveis como a idade, gravidade de citopenias e achados citogenéticos.¹

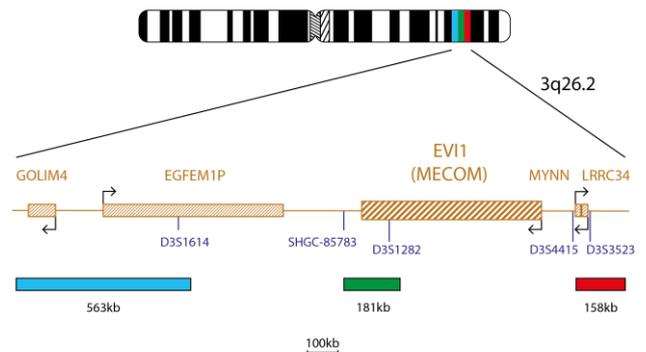
Especificação da Sonda

EV11, 3q26.2, Vermelho

EV11, 3q26.2, Verde

EV11, 3q26.2, Aqua

CMP-H021 v008.00



A componente vermelha da mistura de sondas EV11 consiste numa sonda de 158 kb telomérica ao marcador D3S4415 e inclui o gene *LRRC34*. A componente verde abrange uma região de 181 kb que inclui a parte centromérica do gene *EV11 (MECOM)* e além do marcador D3S1282. A componente aqua abrange uma região de 563 kb centromérica ao gene *EV11*, que inclui o marcador D3S1614.

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 teratogénico; 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 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.

- 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 de pH capazes de medir um pH de 6,5–8,0)
- Recipiente humidificado
- Óleo de imersão de lentes para microscópio de fluorescência
- Centrifuga 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 salina de citrato de sódio (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]
Água	418	467
Verde	495	521
Vermelha	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 filtro simples passa-banda do espectro aqua para obter a melhor visualização do espectro aqua ou um triplo filtro passa-banda do espectro vermelho/espectro verde/espectro aqua para obter a melhor visualização simultânea possível das substâncias fluorescentes verde, vermelha e aqua.

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 mieloide aguda (LMA) ou neoplasias mielodisplásicas (SMD), 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.⁴

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

- 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.)
- 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 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

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

Hibridação

- 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, uma vez que tais temperaturas são críticas para o óptimo desempenho 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

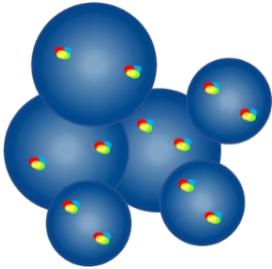
Avaliação da Qualidade das Lâminas

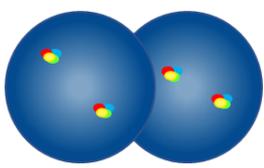
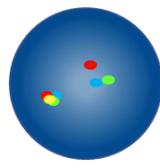
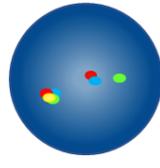
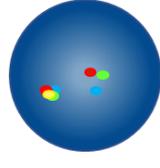
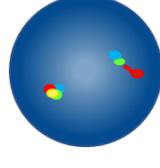
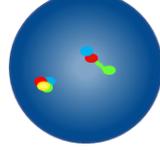
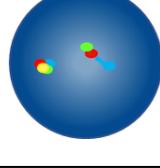
A lâmina não deve ser analisada nos seguintes casos:

- 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

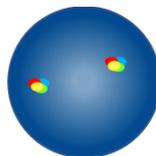
- Dois analistas devem analisar e interpretar cada amostra. Qualquer discrepância deve ser resolvida pela avaliação de um terceiro analista.
- Cada analista deve estar adequadamente qualificado de acordo com as normas nacionais reconhecidas.
- Cada analista deve pontuar independentemente 100 núcleos 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.
- Quando analisar sondas de quebra de três cores, se houver um intervalo entre qualquer um dos 3 sinais (vermelho, verde, aqua) 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	
	<p>Não contar – os núcleos estão demasiado juntos para determinar limites</p>

	<p>Não contar núcleos sobrepostos – todas as áreas de ambos os núcleos não estão visíveis</p>
	<p>Contar como 2 sinais de fusão – o intervalo entre o sinal vermelho e o sinal verde/aqua é inferior a duas larguras de sonda</p>
	<p>Contar como 2 sinais de fusão – o intervalo entre o sinal verde e o sinal vermelho/aqua é inferior a duas larguras de sonda</p>
	<p>Contar como 2 sinais de fusão – o intervalo entre o sinal aqua e o sinal vermelho/verde é inferior a duas larguras de sonda</p>
	<p>Contar como 2 sinais de fusão – o sinal vermelho é difuso na fusão superior direita</p>
	<p>Contar como 2 sinais de fusão – o sinal verde é difuso na fusão superior direita</p>
	<p>Contar como 2 sinais de fusão – o sinal aqua é difuso na fusão superior direita</p>

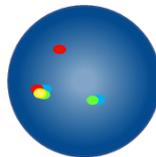
Resultados Esperados

Padrão de Sinais Normal Esperado



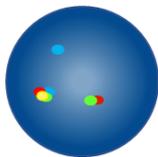
Numa célula normal, espera-se dois sinais de fusão vermelho/verde/aqua (2VermVerdAq).

Padrões de Sinais Anormais Esperados



Numa célula com uma t(3;3)(q21;26.2) ou uma t(3;v)(q26.2;v), com pontos de quebra distais à sonda verde, o padrão de sinais esperado será um sinal de fusão DS1063/CE-pt v001.00/2024-02-05 (CMP-H021 V008)

vermelho/verde/aqua, um sinal de fusão verde/aqua e um sinal vermelho (1VermVerdAq1VerdAq1Verm).



Numa célula com uma inv(3)(q21q26.2) ou uma t(3;v)(q26.2;v), com pontos de quebra proximais à sonda verde, o padrão de sinais esperado será um sinal de fusão vermelho/verde/aqua, um sinal de fusão vermelho/verde e um sinal aqua (1VermVerdAq1VermVerd1Aq).

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

Interferências/Substâncias Interferentes Relevantes Conhecidas

Sem interferências/substâncias interferentes relevantes conhecidas.

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@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 hibridam com o locus correto e nenhuma outra localização. Foram analisados dois loci cromossómicos em cada uma de vinte células metafásicas de cinco amostras, proporcionando 200 pontos de dados por componente. 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 EVI1 (MECOM) Breakapart Probe

Alvo	Número de cromossomas metafásicos hibridados	Número de loci corretamente hibridados	Especificidade analítica	Intervalo de confiança de 95%
3q26.2	200	200	100%	98,12–100%
3q26.2	200	200	100%	98,12–100%
3q26.2	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 200 células interfásicas para cada uma das 25 suspensões de células fixas de medula óssea que foram consideradas negativas para um rearranjo do MECOM, 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 EVI1 (MECOM) Breakapart Probe

Tipo de amostra	Crítérios de sensibilidade	Resultado da sensibilidade
Medula óssea	>95%	99,14% (98,89%–99,39%)

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 amostras de medula óssea que foram consideradas negativas para uma rearranjo do MECOM, 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 EVI1 (MECOM) Breakapart Probe

Tipo de amostra	Resultado de cut-off
Medula óssea	4%

Os laboratórios têm de verificar os valores de cut-off utilizando os seus próprios dados.^{5,6}

Reprodutibilidade

Foram realizados estudos de reprodutibilidade para estabelecer:

- A reprodutibilidade intradiária em 3 centros (amostra para amostra)
- A reprodutibilidade interdiária em 3 centros (dia para dia)
- A reprodutibilidade intercentros em 3 centros (centro para centro)
- A reprodutibilidade interlotes num único centro (lote para lote)

A reprodutibilidade foi estabelecida por 3 laboratórios individuais, que testaram um total de 12 amostras em ocultação, 6 por padrão de sinais (2 negativas para o rearranjo, 2 amostras positivas baixas que correspondiam a 1 a 3 vezes o valor de cut-off e 2 amostras positivas altas que continham mais de 45% de células positivas para o rearranjo). A análise foi realizada com 2 réplicas de cada amostra durante 5 dias não consecutivos.

Os 3 centros realizaram testes intradiários, interdiários e intercentros utilizando o mesmo lote de sonda, sendo que um dos centros também realizou testes de reprodutibilidade interlotes com 3 lotes diferentes de sonda.

Os resultados foram apresentados como a concordância global com a classe negativa prevista (para as amostras negativas) e com a classe positiva prevista (para as amostras positivas).

Tabela 4a. Reprodutibilidade e Precisão para a EVI1 (MECOM) Breakapart Probe – Padrão de Sinais de Inversão

Variável	Tipo de amostra	Concordância
Reprodutibilidade intradiária (amostra para amostra), interdiária (dia para dia) e intercentros (centro para centro)	Negativa de medula óssea	100%
	Positiva baixa de medula óssea	63%
	Positiva alta de medula óssea	100%
Reprodutibilidade interlotes (lote para lote)	Negativa de medula óssea	92%
	Positiva baixa de medula óssea	67%
	Positiva alta de medula óssea	100%

Tabela 4b. Reprodutibilidade e Precisão para a EVI1 (MECOM) Breakapart Probe – Padrão de Sinais de Translocação

Variável	Tipo de amostra	Concordância
Reprodutibilidade intradiária (amostra para amostra), interdiária (dia para dia) e intercentros (centro para centro)	Negativa de medula óssea	100%
	Positiva baixa de medula óssea	98%
	Positiva alta de medula óssea	100%
Reprodutibilidade interlotes (lote para lote)	Negativa de medula óssea	100%
	Positiva baixa de medula óssea	100%
	Positiva alta de medula óssea	100%

Foi realizado um estudo de reprodutibilidade adicional para suplementar os resultados positivos baixos para o padrão de sinais de inversão, utilizando 2 amostras com diferentes níveis de positivo baixo (2x e 4x o valor de cut-off) e 1 amostra negativa para estabelecer:

- A reprodutibilidade intradiária num único centro (amostra para amostra)
- A reprodutibilidade interdiária num único centro (dia para dia)
- A reprodutibilidade interoperacional num único centro (operador para operador).

A reprodutibilidade foi estabelecida utilizando 1 lote de sondas, avaliado em 2 réplicas de cada amostra, testado durante 5 dias não consecutivos por 2 operadores diferentes.

Os resultados foram apresentados como a concordância global com a classe positiva prevista (para as amostras positivas).

Tabela 4c. Dados de apoio adicionais para a Reprodutibilidade e Precisão da EV11 (MECOM) Breakpart Probe – Padrão de Sinais de Inversão

Variável	Tipo de amostra	Concordância
Reprodutibilidade intradiária (amostra para amostra), interdiária (dia para dia) e interoperacional (operador para operador)	Positiva baixa de medula óssea (2x cut-off)	100%
	Positiva baixa de medula óssea (4x cut-off)	100%

Desempenho Clínico

Para assegurar que o produto deteta os rearranjos pretendidos, o desempenho clínico foi estabelecido através de 3 estudos 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) provenientes de doentes com confirmação ou suspeita de leucemia mieloide aguda (LMA) ou neoplasias mielodisplásicas (SMD). O tamanho combinado da amostra dos estudos foi cento e dezoito (118) espécimes, com a população-alvo de sete (7) amostras positivas para translocação e cento e onze (111) negativas para translocação e uma amostra combinada de cento e dezanove (119) espécimes envolvendo cento e onze (111) amostras negativas para inversão e oito (8) amostras positivas para inversão. Os resultados foram comparados com o estado conhecido da amostra. Verificou-se que a concordância/discordância de resultados cumpriu os critérios de aceitação para este estudo.

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 a EV11 (MECOM) Breakpart Probe – Translocação

Variável	Resultado
Sensibilidade clínica (taxa de verdadeiros positivos, TPR)	99,94%
Especificidade clínica (taxa de verdadeiros negativos, TNR)	99,97%
Taxa de falsos positivos (FPR) = 1 – Especificidade	0,03%

Tabela 6. Desempenho Clínico para a EV11 (MECOM) Breakpart Probe – Inversão

Variável	Resultado
Sensibilidade clínica (taxa de verdadeiros positivos, TPR)	96,26%
Especificidade clínica (taxa de verdadeiros negativos, TNR)	99,28%
Taxa de falsos positivos (FPR) = 1 – Especificidade	0,72%

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: 50558449LPH036JL

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@cytozell.com
W: www.ogt.com

Bibliografia

- 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 21]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 11). Available from: <https://tumourclassification.iaarc.who.int/chapters/63>
- Ottema et al. Atypical 3q26/MECOM rearrangements genocopy inv(3)/t(3;3) in acute myeloid leukemia. *Blood* (2020)136(2):224–234.
- Rack et al., *Leukemia* (2019) 33:1851–1867
- 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 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
	pt: Consultar as instruções de utilização eletrónicas	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 Cytozell Limited.



Cytozell 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@cytozell.com
W: www.ogt.com



Sysmex Europe SE

Bombarch 1
22848 Norderstedt
ALEMANHA

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

Histórico de Versões das IFU

V001 2024-02-05: Novas IFU para Regulamento (UE) 2017/746