



A Sysmex Group Company



Instruções de utilização (IU)

REF.<sup>a</sup>: LPH 089 / LPH 089-S

**CBFB Breakapart Probe**



APENAS PARA USO PROFISSIONAL



www.cytocell.com

Mais informações e outros idiomas disponíveis em [www.ogt.com/cytocell](http://www.ogt.com/cytocell)

#### Finalidade prevista

A CBFB Breakapart Probe da CytoCell<sup>®</sup> é um teste qualitativo não automatizado de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) utilizado para detetar rearranjos cromossômicos na região 16q22 no cromossoma 16 em suspensões de células derivadas do sangue fixadas no fixador de Carnoy (3:1 de metanol/ácido acético) de doentes com confirmação ou suspeita de leucemia mieloide aguda (LMA).

#### Indicações de utilização

Este produto destina-se a ser utilizado como adjuvante de outros testes clínicos ou histopatológicos em vias reconhecidas de diagnóstico e cuidados clínicos, em que o conhecimento do estado do rearranjo do *CBFB* seria importante para o tratamento clínico.

#### Limitações

Este dispositivo destina-se a detetar rearranjos com pontos de quebra na região abrangida pelos clones vermelho e verde neste conjunto de sondas, o que inclui o gene *CBFB*. Os pontos de quebra fora desta região, ou os rearranjos variantes inteiramente contidos nesta região, poderão não ser detetados com este produto. O teste não se destina a ser utilizado: como diagnóstico autónomo, diagnóstico complementar, teste pré-natal, rastreio populacional, teste descentralizado ou autodiagnóstico.

Este dispositivo não foi validado para tipos de amostras, tipos de doenças ou fins não indicados na finalidade prevista.

Destina-se a ser utilizado como adjuvante de outros testes de diagnóstico laboratoriais e não deve ser iniciada nenhuma medida terapêutica com base apenas nos resultados da FISH.

A comunicação e interpretação dos resultados da FISH devem ser realizadas por pessoal devidamente qualificado, de forma consistente com as normas da prática profissional e devem ter em consideração outros resultados de testes e informação clínica e de diagnóstico.

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 resultados falsos 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 hibridizam com cromossomas inteiros ou sequências únicas individuais e serve como um 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 renaturação com uma sonda de ADN marcada por fluorescência e desnaturada de forma semelhante, que tem uma sequência complementar. Após a hibridização, a sonda de ADN não ligada e não especificamente ligada é removida e o ADN é contracorado para efeitos de visualização. A microscopia de fluorescência permite então a visualização da sonda hibridizada no material alvo.

#### Informações sobre a sonda

O gene *CBFB* (subunidade beta do fator de ligação ao núcleo) está localizado no 16q22. Está normalmente rearranjado devido à inversão *inv(16)(p13.11;q22.1)* ou à translocação *t(16;16)(p13.11;q22.1)*. Em raras ocasiões foram reportadas translocações de 16q22 com vários outros parceiros genéticos, tendo também sido reportada a eliminação da banda 16q22<sup>1</sup>.

As leucemias mieloides agudas com a *inv(16)(p13.11;q22.1)* ou a *t(16;16)(p13.11;q22.1)* formam uma entidade patológica reconhecida de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de neoplasias mieloides e leucemia aguda.<sup>2</sup> Estes rearranjos são frequentemente observados em doentes com um subtipo mielomonocítico com aumento dos eosinófilos na medula óssea, anteriormente designados LMA FAB (classificação francesa-americana-britânica) tipo M4Eo e são verificados em 5-8%<sup>2</sup> das LMA. Os casos de LMA relacionada com terapêutica também podem ter este rearranjo<sup>2,3</sup>. A inversão *inv(16)(p13.11;q22.1)* ou a translocação *t(16;16)(p13.11;q22.1)* produzem rearranjos genéticos *CBFB-MYH11* e são classificados como um grupo de risco citogenético favorável em doentes com LMA<sup>4,5,6</sup>.

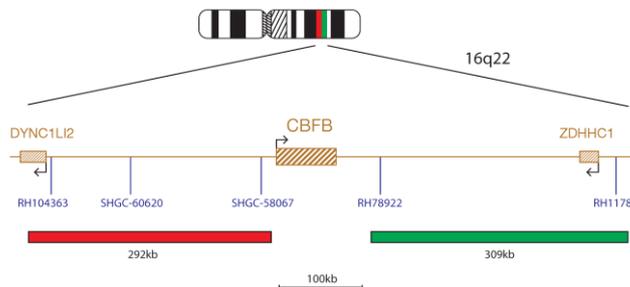
Tanto na inversão *inv(16)(p13.11;q22.1)* como na translocação *t(16;16)(p13.11;q22.1)*, os pontos de quebra ocorrem no intrão 5 do *CFFB* e no intrão 5 do *MYH11*. O terminal-N do *CFFB* funde-se com o terminal-C do *MYH11* com o seu domínio de multimerização. A proteína quimérica resultante reduz a quantidade de *CBF* ativo. Também ocorre uma acumulação dos multímeros de *CBFB-MYH11/CBFA* no núcleo. O *CBFB* regula a expressão de determinados fatores de ribosilação do ADP (*ARF*) e de outros genes supressores de tumores (*GST*), pelo que se julga que a proteína de fusão reprime a expressão dos *GST*.<sup>4</sup> Está demonstrado que esta proteína de fusão é necessária, mas, em si só, não suficiente para a leucemogénese e o trabalho continua para determinar a forma como a proteína parece trabalhar em colaboração com o *RUNX1* para mediar o sinal proliferativo e o bloqueio de diferenciação de células necessário para o desenvolvimento de leucemia<sup>7,8</sup>.

#### Especificação da sonda

CBFB, 16q22, Vermelho

CBFB, 16q22, Verde

CMP-H098 v001.00



A mistura da CBFB Breakapart Probe é composta por duas sondas distintas. A sonda vermelha (292 kb) é centromérica ao gene *CBFB* e estende-se para além do marcador RH104363 para cobrir parte do gene *DYNC1L12* e inclui os marcadores SHGC-60620 e SHGC-58067. A sonda verde (309 kb) é telomérica ao gene *CBFB* e estende-se através do marcador RH78922 para além do gene *ZDHHC1* até uma região telomérica ao marcador RH11782.

#### Materiais fornecidos

**Sonda:** 50 µl por tubo (5 testes) ou 100 µl por tubo (10 testes)

As sondas são fornecidas pré-misturadas em solução de hibridização (formamida; sulfato de dextrano; citrato de sódio salino (SSC)) e estão prontas para serem utilizadas.

**Contracorante:** 150 µl por tubo (15 testes)

O contracorante é o DAPI Antifade ES (0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole) em meio de montagem à base de 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 teratogénio. Não inale vapores provenientes das mesmas nem permita o contacto das mesmas com a pele. Manuseie com cuidado. Utilize luvas e uma bata de laboratório.
3. O DAPI é um potencial agente cancerígeno. Manuseie com cuidado. Utilize luvas e uma bata de laboratório.
4. Não utilize se o(s) tubo(s) estiver(em) danificado(s) ou se o conteúdo do(s) tubo(s) estiver comprometido.
5. Siga as regulamentações locais de eliminação para a sua localização, bem como as recomendações da Ficha de Dados de Segurança, para determinar a eliminação segura deste produto. Isto também se aplica ao conteúdo do kit de teste danificado.
6. Elimine todos os reagentes usados e qualquer outro material descartável contaminado seguindo os procedimentos para resíduos infecciosos ou potencialmente infecciosos. Cada laboratório é responsável por manusear resíduos sólidos e líquidos de acordo com a sua natureza e grau de perigo e pelo respetivo tratamento e eliminação (ou solicitar o respetivo tratamento e eliminação) de acordo com as regulamentações aplicáveis.
7. Os operadores têm de ser capazes de distinguir as cores vermelha, azul e verde.
8. O não cumprimento do protocolo delineado e dos reagentes pode afetar o desempenho do produto e dar origem a resultados falsos positivos/negativos.
9. A sonda não deve ser diluída nem misturada com outras sondas.
10. A não utilização de 10 µl de sonda durante a fase pré-desnaturação do protocolo pode afetar o desempenho do produto e dar origem a resultados falsos positivos/negativos.
11. Todos os produtos devem ser validados antes da utilização.

DS304/CE-pt v001.00/2021-10-01 (H098 v1)

Página 1 de 5

12. Devem ser realizados controlos internos utilizando populações de células não afetadas nas amostras de teste.

#### 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 seu rótulo. A sonda e os tubos de contracorante têm de ser conservados no escuro.



A sonda de FISH, o contracorante DAPI Antifade ES e a solução de hibridização permanecem estáveis durante os ciclos de congelamento e descongelamento que ocorrem durante a utilização normal (em que um ciclo constitui a remoção e reposição do tubo no congelador). A exposição à luz deve ser minimizada e evitada sempre que possível. Guarde os componentes no recipiente à prova de luz fornecido. Os componentes usados e armazenados em condições diferentes das indicadas na rotulagem podem não ter o desempenho esperado e podem afetar adversamente os resultados do ensaio. Devem ser envidados todos os esforços para limitar a exposição a variações de luz e de temperatura.

#### Equipamento e materiais necessários, mas não fornecidos

É necessário utilizar equipamento calibrado:

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

#### Equipamento opcional não fornecido

1. Câmara de secagem citogenética

#### Reagentes necessários, mas não fornecidos

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

#### Recomendação de microscópio de fluorescência

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

Substância fluorescente	Excitação <sub>máx.</sub> [nm]	Emissão <sub>máx.</sub> [nm]
Verde	495	521
Vermelho	596	615

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

Verifique o microscópio de fluorescência antes de o utilizar para garantir que está a funcionar corretamente. Utilize um óleo de imersão que seja adequado à microscopia de fluorescência e formulado para baixa autofluorescência. Evite misturar o DAPI Antifade com o óleo de imersão para microscópio, dado que essa mistura irá obscurecer os sinais. Siga as recomendações do fabricante relativamente à vida útil da lâmpada e à duração dos filtros.

#### Preparação das amostras

O kit destina-se a ser utilizado em suspensões de células derivadas do sangue fixadas no fixador de Carnoy (3:1 de metanol/ácido acético), que são preparadas de acordo com as diretrizes do laboratório ou da instituição. 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<sup>9</sup>.

#### 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 até 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 até 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 até 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 até 4 semanas à temperatura ambiente num recipiente hermético.

#### Protocolo da FISH

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

#### Preparação das lâminas

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

#### Pré-desnaturação

5. Retire a sonda do congelador e deixe-a aquecer até à 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 para um tubo de microcentrifugação. Reponha o restante volume da sonda no congelador.
8. Coloque a sonda e a lâmina da amostra numa placa quente a 37 °C (+/- 1 °C) durante 5 minutos para pré-aquecimento.
9. Coloque 10 µl da solução de sonda na amostra de células e aplique uma lamela com cuidado. Vede com cola de solução de borracha e deixe a cola secar completamente.

#### Desnaturação

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

#### Hibridização

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

#### Lavagens pós-hibridização

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

#### Recomendações para o procedimento

1. O envelhecimento e 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 desempenho ideal 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 umas 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 numa 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 ideais podem resultar numa ligação não específica, que pode ser incorretamente interpretada como um sinal da sonda.

#### Interpretação dos resultados

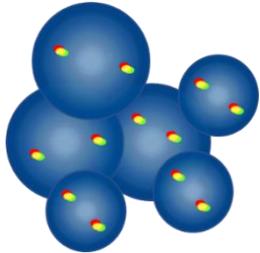
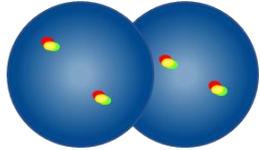
##### Avaliação da qualidade das lâminas

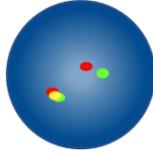
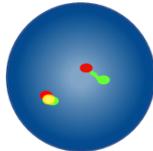
A lâmina não deve ser analisada nos seguintes casos:

- 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

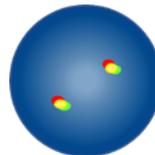
- Dois analistas devem analisar e interpretar cada amostra. Qualquer discrepância deve ser resolvida pela avaliação de um terceiro analista.
- Cada analista deve estar adequadamente qualificado de acordo com as normas nacionais reconhecidas.
- Cada analista deve classificar 100 núcleos para cada amostra, de forma independente. O primeiro analista deve começar a análise pelo lado esquerdo da lâmina e o segundo analista pelo lado direito.
- Cada analista deve documentar os seus resultados em folhas separadas.
- Analise apenas os núcleos intactos e não os núcleos sobrepostos ou agrupados ou núcleos cobertos por resíduos citoplasmáticos ou elevado grau de autofluorescência.
- Evite as áreas com excesso de resíduos citoplasmáticos ou hibridização não específica.
- A intensidade do sinal pode variar, mesmo com um único núcleo. Nesses casos, utilize filtros simples e/ou ajuste o plano focal.
- Em condições que não sejam ideais, os sinais poderão parecer difusos. Se dois sinais da mesma cor se tocarem um no outro ou se a distância entre eles não for superior a duas larguras de sinal, ou quando houver uma vaga cadeia a ligar os dois sinais, conte-os como um sinal.
- Se, ao analisar sondas de quebra de duas cores, existir um intervalo entre os sinais vermelho e verde não superior a 2 larguras de sinal, conte-os como sinais não rearranjados/fundidos.
- Se, ao analisar sondas de quebra de três cores, existir um intervalo entre qualquer um dos 3 sinais (vermelho, verde, azul) não superior a 2 larguras de sinal, 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 de fusão - o intervalo entre os sinais vermelho e verde é inferior a duas larguras de sonda
	Contar como dois sinais de fusão - um sinal de fusão está difuso

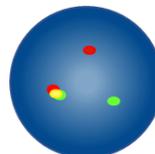
#### Resultados esperados

##### Padrão de sinais normal esperado



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

##### Padrão de sinais anormal esperado



Numa célula com rearranjo do CBBF, o padrão de sinais esperado é uma fusão, um sinal vermelho (R) e um sinal verde (G) (1F1R1G).

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

##### Interferências/substâncias interferentes relevantes conhecidas

Sem interferências/substâncias interferentes relevantes conhecidas.

##### Reatividade cruzada conhecida

Nenhuma reatividade cruzada conhecida.

##### Comunicação de incidentes graves

Para um doente/utilizador/terceiro na União Europeia e em países com regime regulamentar idêntico (Diretiva 98/79/CE/Regulamento (UE) 2017/746 relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*): se, durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da sua utilização, tiver ocorrido um incidente grave, comunique-o ao fabricante e à sua autoridade nacional competente.

No caso de incidentes graves noutros países, comunique-os ao fabricante e, se aplicável, à sua autoridade nacional competente.

Contacto de vigilância do fabricante: [vigilance@ogt.com](mailto:vigilance@ogt.com)

Pode obter uma lista de pontos de contacto de vigilância de autoridades nacionais competentes na UE em: [https://ec.europa.eu/health/md\\_sector/contact\\_en](https://ec.europa.eu/health/md_sector/contact_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 4 loci cromossómicos em cada uma das 20 células metafásicas de 5 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 a CBFB Breakpart Probe

Alvo	Número de cromossomas metafásicos hibridizados	Número de loci hibridizados corretamente	Especificidade analítica	Intervalo de confiança de 95%
16q22 Vermelho Texas	200	200	100%	98,12-100%
16q22 FITC	200	200	100%	98,12-100%

**Sensibilidade analítica**

A sensibilidade analítica é a percentagem de células interfásicas classificáveis com o padrão de sinais normal esperado. Foram analisadas pelo menos 200 células interfásicas para cada uma de 25 suspensões de células fixas de amostras de medula óssea, resultando num mínimo de 5000 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 a CBFB Breakpart Probe

Tipo de amostra	Crítérios de sensibilidade	Resultado da sensibilidade
Medula óssea	>95%	97,92% (97,59-98,25%)

**Caracterização dos valores de limite normais**

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. Foram analisadas pelo menos 200 células interfásicas para cada uma de 25 suspensões de células fixas de amostras de medula óssea, resultando num mínimo de 5000 núcleos pontuados para cada tipo de amostra.

O valor de limite foi determinado utilizando a função  $\beta$ -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 limite normais para a CBFB Breakpart Probe

Tipo de amostra	Resultado de limite
Medula óssea	3,08%

Os laboratórios têm de verificar os valores de limite utilizando os seus próprios dados<sup>10, 11</sup>.

**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 2 amostras para avaliar a precisão deste produto: 1 medula óssea negativa e 1 amostra de medula óssea positiva baixa.

Para estabelecer a precisão interdiária e intradiária, as amostras foram avaliadas em 5 datas não consecutivas e, para estabelecer a precisão de lote para lote, foram avaliados 3 lotes do produto em 4 réplicas das mesmas amostras. Os resultados foram apresentados como a concordância global com a classe negativa prevista (para as amostras negativas).

Tabela 4. Reprodutibilidade e precisão para a CBFB Breakpart Probe

Variável	Tipo de amostra	Concordância
Reprodutibilidade intradiária (amostra a amostra) e interdiária (dia a dia)	Medula óssea negativa	100%
	Medula óssea positiva baixa	100%
Reprodutibilidade de lote para lote	Medula óssea negativa	100%
	Medula óssea positiva baixa	100%

**Desempenho clínico**

Para garantir que o produto deteta os rearranjos pretendidos, o desempenho clínico foi estabelecido ao longo de dois estudos retrospectivos realizados em locais de teste externos em amostras representativas da população pretendida para o produto, utilizando material de fixação 3:1 de metanol/ácido acético de amostras derivadas do sangue. O tamanho de amostra combinado para os estudos foi de 113 espécimes, com 20 espécimes positivos e 93 espécimes negativos. Todas as amostras foram anonimizadas e aleatorizadas para evitar enviesamentos na análise. Os resultados foram comparados com o estado conhecido da amostra.

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 CBFB Breakpart Probe

Variável	Resultado
Sensibilidade clínica (taxa de verdadeiros positivos, TPR)	99,42%
Especificidade clínica (taxa de verdadeiros negativos, TNR)	99,84%
Taxa de falsos positivos (especificidade FPR=1)	0,16%

**Informações adicionais**

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

T: +44 (0)1223 294048

E: [techsupport@cytoCell.com](mailto:techsupport@cytoCell.com)

W: [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

**Bibliografia**

- Huret JL. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 1999; 3(3):147-149.
- Swerdlow, et al. (eds.) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, França, 4.ª edição, IARC, 2017
- Hernández JM, et al. Haematologica. 2000; 85(5):481-5.
- Moreno-Mirallas I, et al. J Biol Chem. 2005;280(48):40097-103.
- Grimwade D, et al. Blood. 2010;116(3):354-365.
- Litzow MR. Haematologica. 2020;105(6):1475-77.
- Rao S. Blood. 2020;136(21):2361-2362.
- Zhen T, et al. Blood. 2020;136(21):2373-2385.
- Arsham MS, Barch MJ and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Nova Jérsea: 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, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. *Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16-23.

**Glossário de símbolos**

ISO 15223-1:2016 - "Dispositivos médicos - Símbolos a utilizar nos rótulos, rotulagem e informação a fornecer com os dispositivos médicos - 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	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: Consulte as instruções de utilização	5.4.3
	pt: Cuidado	5.4.4
	pt: Dispositivo médico de diagnóstico in vitro	5.5.1
	pt: Suficiente para <n> testes	5.5.5
Símbolos EDMA para reagentes e componentes IVD, revisão de outubro de 2009		
Símbolo	Título	Número(s) de referência

