



CE 2797

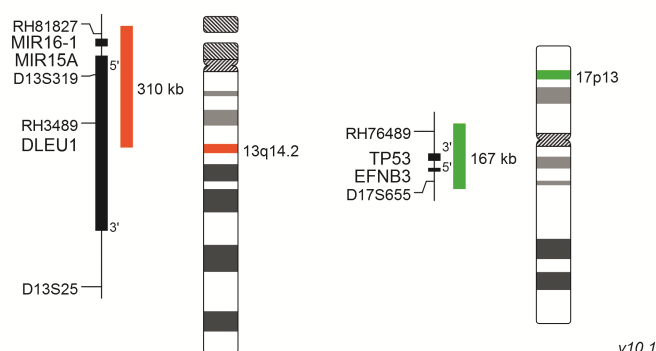
Instruções de utilização

Apenas para uso profissional



Mais informações e outras línguas disponíveis em www.metasystems-probes.com
correio eletrónico: info@metasystems-probes.com

Produto	Marcação	N.º de referência	UDI-DI	Tamanho da embalagem
XL DLEU/TP53	verde/laranja	D-5067-100-OG	04251315812161	100 µl

**Uso pretendido**

A sonda XL DLEU/TP53 é um teste qualitativo, não automatizado, para a detecção de deleções da região do gene *DLEU1/MIR15A/MIR16-1* em 13q14.2 e da região do gene *TP53* em 17p13 por hibridação in situ por fluorescência (FISH). O produto destina-se a ser um auxiliar de diagnóstico e a ajudar na monitoração da doença. A população do teste para a detecção de deleções da região do gene *DLEU1/MIR15A/MIR16-1* é constituída por pacientes com leucemia linfocítica crónica (LLC), mieloma múltiplo (MM) e linfomas não-Hodgkin (LNH), confirmados ou suspeitos. A população do teste para a detecção de deleções da região do gene *TP53* é constituída por pacientes com leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), neoplasias mielodisplásicas (SMD), mieloma múltiplo (MM) e linfomas não-Hodgkin (LNH), confirmados ou suspeitos. A hibridação deve ser efetuada em células fixadas em metanol/ácido acético derivadas de medula óssea ou de sangue periférico para LLA, LMA, LLC e SMD, em plasmócitos fixados em metanol/ácido acético para o MM e em células fixadas em metanol/ácido acético derivadas de gânglios linfáticos envolvidos, medula óssea envolvida ou outro tecido envolvido para o LNH.

Descrição do produto

A sonda XL DLEU/TP53 consiste numa sonda marcada com laranja que hibridiza com a região do gene *DLEU1/MIR15A/MIR16-1* em 13q14.2 incluindo *D13S319* e uma sonda marcada com verde que hibridiza com a região do gene *TP53* em 17p13.

Reatividade cruzada conhecida

Não são conhecidas hibridações cruzadas.

Materiais fornecidos

100 µl (10 testes) de XL DLEU/TP53, a sonda é dissolvida em solução de hibridação [$> 50\%$ v/v de formamida, $< 30\%$ p/v de sulfato de dextrano e $< 2\times$ SSC (citrate salino-sódico)] e está pronta a utilizar.

Limitações

A análise, a interpretação dos dados e a comunicação dos resultados de diagnóstico obtidos por FISH devem ser efetuadas de acordo com as normas profissionais e as diretrizes relevantes por pessoal qualificado e experiente. O produto não se destina a ser utilizado como diagnóstico autónomo, rastreio de doenças ou como diagnóstico complementar. Por conseguinte, os resultados de diagnóstico obtidos com este produto devem ser interpretados em conjunto com outros métodos de diagnóstico. Os desvios aos protocolos do fabricante podem afetar a robustez e o desempenho do teste e podem resultar em resultados enganadores. Os mapas de sondas são criados de acordo com o objetivo pretendido do produto. As barras de cor sólida não significam necessariamente que a sonda cobre completamente a região genómica indicada. Apenas são apresentados os intervalos superiores a 10 kb. Por conseguinte, recomenda-se cautela ao interpretar os resultados gerados através de uma utilização não indicada no rótulo. Estão disponíveis mais informações mediante pedido.

Como fabricante e distribuidor de IVD com sede na Alemanha, a MetaSystems Probes segue os regulamentos europeus e alemães actuais, que proibem qualquer declaração relativa à interpretação de dados relacionados com o paciente, bem como recomendações de diagnóstico e terapêuticas, respetivamente.

Armazenamento e manuseamento

As sondas devem ser armazenadas no escuro a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Foi demonstrado que o desempenho da sonda não é afetado durante um máximo de 20 ciclos de congelação-descongelação. As sondas são sensíveis à luz, pelo que a exposição à luz deve ser limitada ao mínimo durante o manuseamento.

Expedição

Os produtos produzidos pela MetaSystems Probes são enviados à temperatura ambiente.

Equipamentos e materiais necessários mas não fornecidos

- Banho-maria com controlo preciso da temperatura
- Placa quente, com placa sólida e controlo preciso da temperatura
- Micro-pipetas ajustáveis com volumes de 1 µl a 1 ml, calibradas
- Medidor de pH, calibrado
- Congelador -20 °C (±5 °C)
- Câmara de humidade 37 °C (± 1 °C)
- Microscópio de fluorescência com filtros adequados (ver abaixo)
- Óleo de imersão, recomendado pelo fabricante do microscópio (grau de fluorescência)
- Termómetro
- DAPI/antifade
- Cimento de borracha
- Lâminas de microscópio
- Lamela (vidro): 22 mm x 22 mm e 24 mm x 32 mm
- Luvas
- Frascos de Coplin
- Fórceps
- 20x SSC
- Tween-20
- Água destilada
- Microcentrifuga
- Temporizador

Especificação do fluorocromo

Marcação	Excitação máx.	Emissão máx.
Verde	505 nm	530 nm
Laranja	552 nm	576 nm

Recomendação de Microscópio de Fluorescência

- Iluminação por fluorescência: Sistemas adequados de iluminação por fluorescência com iódetos metálicos ou LED ou iluminadores convencionais com lâmpadas de mercúrio de 100 watts.
- Objetivas adequadas para iluminação epi-fluorescente.
- Filtros de fluorescência: Para a visualização/contagem, utilizar um conjunto de filtros multibanda adequado. Para captar imagens ou observar canais de cor individuais no microscópio, utilizar conjuntos de filtros de passagem de banda única adequados para os respectivos fluorocromos (por exemplo, da MetaSystems).

Princípio de teste

A hibridização in situ por fluorescência (FISH) utiliza fragmentos de ADN nos quais são incorporados nucleótidos acoplados a fluoróforos para detectar sequências de ADN complementares em células fixas sob um microscópio de fluorescência. O ADN das sondas selecionadas e o ADN do doente são desnaturados, o que significa que as duas cadeias de ADN da dupla hélice são separadas. Durante a renaturação subsequente, as sondas de ADN hibridizam com sequências complementares do ADN do doente.

Preparação da amostra

Comentários gerais

O produto foi concebido para ser utilizado conforme especificado no objetivo pretendido.

Nem todos os métodos de preparação indicados devem ser relevantes para o produto. As suspensões celulares são preparadas a partir de culturas de curta duração não estimuladas de aspirados de medula óssea, de sangue total ou de células individuais libertadas de gânglios linfáticos afetados, após uma extração cuidadosa do tecido nodal. No caso do mieloma múltiplo, recomenda-se o enriquecimento de plasmócitos CD138+ (por exemplo, triagem magnética de células) ou a sua identificação in situ com um anticorpo fluorescente apropriado (clg-FISH). A preparação das células é normalmente processada de acordo com protocolos dedicados à análise citogenética, incluindo parada mitótica, tratamento hipotónico e fixação com ácido metanol-acético. As suspensões celulares fixadas desta forma são colocadas em lâminas de vidro limpas antes da hibridização. As amostras devem ser preparadas de acordo com as normas dos procedimentos citogenéticos (por exemplo, The AGT Cytogenetics Laboratory Manual, 4th Edition, para o linfoma ver também Campbell et al (2015) Pathology 37:493-507 e Ross (2004) Curr Diagn Pathol 10:345-350, para o enriquecimento de células CD138+ ver também Cumova et al (2010) Int J Hematol 92:314-319 e para clg-FISH ver também Gole et al (2012) Blood 120:4792).

Estabilidade das lâminas hibridizadas

- As lâminas FISH hibridizadas podem ser analisadas durante pelo menos seis meses se forem armazenadas no escuro a -20 °C (±5 °C).

Recomendações adicionais para o processo

- Recomenda-se vivamente a utilização de um termómetro calibrado para medir as temperaturas das soluções, banhos de água e incubadoras, uma vez que estas temperaturas são críticas para o desempenho ótimo do produto.
- Verificar cuidadosamente a temperatura das soluções pré-aquecidas.
- Verificar cuidadosamente o valor do pH de todas as soluções. Este deve situar-se entre 7,0 e 7,5 à temperatura ambiente.
- As concentrações dos tampões (rigor), o pH e a temperatura são importantes porque um rigor baixo pode levar a uma ligação não específica da sonda e um rigor demasiado elevado pode levar a uma redução da intensidade do sinal ou ao desaparecimento dos sinais.
- Antes de abrir: centrifugar brevemente para recolher a sonda no fundo do tubo.

Protocolo de FISH para sondas de ADN da MetaSystems

Preparação de lâminas

- Dispensar a amostra de células numa lâmina de microscópio. Deixar secar ao ar. Se as lâminas não forem utilizadas nos dias seguintes, conservar a -20 °C (±5 °C).
- Aplicar 10 µl de sonda.
- Cobrir com lamela de 22 mm x 22 mm.
- Selar com cimento de borracha.

Desnaturação

- Desnaturar a amostra e a sonda simultaneamente, aquecendo a lâmina numa placa quente a 75 °C (±1 °C) durante 2 min.

Hibridização

- Incubar numa câmara de humidade a 37 °C (±1 °C) de um dia para o outro.

Lavagens pós-hibridização

Soluções necessárias

- 0,4x SSC (pH 7,0 - 7,5) a 72 °C (±1 °C)
- 2x SSC, 0,05 % Tween-20 (pH 7,0) à temperatura ambiente

Procedimento

- Remover cuidadosamente a lamela e todos os vestígios de cola.
- Lavar a lâmina em 0,4x SSC (pH 7,0) a 72 °C (±1 °C) durante 2 min.
- Escorrer a lâmina e lavar com 2x SSC, 0,05 % Tween-20 (pH 7,0) à temperatura ambiente durante 30 segundos.
- Enxaguar brevemente em água destilada para evitar a formação de cristais e deixar secar ao ar.

Contraindicação

Soluções necessárias:

- DAPI/antifade (por exemplo, MetaSystems Probes DAPI/antifade, D-0902-500-DA)

Procedimento:

- Aplicar 10 µl de DAPI/antifade e sobrepor com uma lamela de 24 mm x 32 mm.
- Permitir a penetração do DAPI/antifade durante 10 minutos.
- Proceder à microscopia e análise.
- Armazenar as lâminas a -20 °C (±5 °C).

Resultados esperados

São apresentadas apenas as constelações de sinais mais frequentes, podendo ser observados outros padrões de sinais relevantes.

Célula normal:

Dois sinais verdes (2G) e dois laranjas (2O).



Célula aberrante (resultados típicos):

Dois sinais verdes (2G) e um laranja (1O) resultantes da perda de um sinal laranja.



Célula aberrante (resultados típicos):

Um sinal verde (1G) e dois sinais laranja (2O) resultantes da perda de um sinal verde.



Desempenho analítico

Os dados de desempenho analítico foram recolhidos utilizando núcleos em interfase de culturas de linfócitos estimuladas por PHA. A colheita de células foi efetuada de acordo com as normas citogenéticas. A equivalência dos resultados entre culturas de medula óssea não estimuladas e linfócitos estimulados com PHA foi assegurada por um estudo comparativo.

Especificidade analítica

A especificidade é calculada como a percentagem de alvos corretos detectados em relação ao número total de alvos detectados.

A especificidade analítica calculada é de 100% após 20 metáfases avaliadas de 5 homens cariotipicamente normais diferentes.

Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica é calculada como a percentagem de núcleos interfásicos que têm o padrão de sinal normal esperado em relação ao número total de núcleos interfásicos analisados. Foi analisado o padrão de sinal de 400 núcleos de cada um de 10 indivíduos cariotipicamente normais.

O grau de desvio da média é representado pelo desvio padrão relativo (% RSD).

Padrão	Sensibilidade	% RSD
2G 2O (normal)	97.3 %	1.3 %

Ponto de corte

O ponto de corte de um teste qualitativo é o limiar acima do qual o resultado é considerado positivo e abaixo do qual o resultado é considerado negativo.

O valor de corte foi calculado com base em hibridizações de sondas em núcleos interfásicos de 10 indivíduos cariotipicamente normais. Os valores de corte baseiam-se em 400 núcleos marcados cada.

Padrão	Corte
2G 1O	2.9 %
1G 2O	4.2 %

O valor de corte é informativo e depende de vários parâmetros relacionados com o laboratório. Por conseguinte, para utilização em diagnóstico, os valores de corte têm de ser determinados individualmente por cada laboratório.

Precisão (Reprodutibilidade/Repetibilidade)

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados dos estudos de sensibilidade analítica efetuados em diferentes condições (dia, lote e amostra). Para cada condição, foram efetuadas três análises com 100 núcleos cada.

A reprodutibilidade é dada como o grau de desvio da média pelo desvio padrão relativo (% RSD).

Condições	Reprodutibilidade % RSD
Dia a dia o mesmo lote e a mesma pessoa em três dias	2.2 %
Lote a lote o mesmo indivíduo e dia com três lotes	2.7 %
Amostra para amostra mesmo lote e dia com três indivíduos	1.8 %

A repetibilidade é o grau de concordância entre estudos efetuados nas mesmas condições. Não foram efetuados estudos de repetibilidade separados, uma vez que o grau de desvio da média em estudos de reprodutibilidade em condições diferentes foi determinado com ≤ 5 % de desvio-padrão relativo (% RSD). Por conseguinte, concluiu-se um grau de desvio da média em condições iguais com ≤ 5 % de desvio-padrão relativo (% RSD).

Desempenho clínico

Literatura publicada

As alegações de desempenho clínico do produto em relação ao objetivo pretendido foram apoiadas por literatura científica relevante para o produto e para a patologia que está a ser analisada com o produto.

- Demyanets et al (2020) Ann Hematol 99:2599-2609
- Rabani et al (2020) Leuk Res 99:106476
- Schinke et al (2020) Cancer 126:3504-3515
- Ahmed et al (2021) Pak Armed Forces Med J 71:579-583

Experiência publicada adquirida com os testes de diagnóstico de rotina

Os dados dos testes de diagnóstico de rotina foram obtidos de laboratórios de diagnóstico europeus e publicados na página web da MetaSystems Probes (ver a respectiva folha de dados de desempenho na secção de descarregamento correspondente a este produto específico). A presença do marcador alvo nos casos positivos e a ausência nos casos negativos detectados por FISH foi confirmada por tecnologias de referência (análise de bandas cromossómicas e sequenciação do genoma completo). A coorte de teste inclui pacientes com LLA, MM e LNH, confirmados ou suspeitos. As amostras foram obtidas a partir de células CD138+, de medula óssea ou de sangue periférico.

Rearranjo	N.º de casos	Sensibilidade do diagnóstico	Especificidade do diagnóstico
Deleções da região do gene <i>DLEU1/MIR15A/MIR16-1</i> em 13q14.2	530	100 %	100 %
Deleções da região do gene <i>TP53</i> em 17p13	530	97.2 %*	100 %

*A sensibilidade do diagnóstico foi calculada em apenas 97,2 % porque um caso mostrou um padrão de sinal normal por FISH e uma deleção por WGS. A deleção estende-se desde o telómero até ao intrão 1 do TP53 e abrange aproximadamente 50 % da sonda marcada com laranja. Este caso foi classificado como falso negativo.

Outras fontes de dados de desempenho clínico

A avaliação dos dados de validação de diagnóstico recolhidos como parte do IVDD e classificados como outras fontes de dados de desempenho clínico mostra que o XL DLEU/TP53 identificou corretamente todos os 5 casos aberrantes analisados.

Procedimento de controlo de qualidade

Antes da utilização inicial deste produto no diagnóstico, deve verificar-se se o seu desempenho é o esperado. As orientações e recomendações para a implementação de novos testes FISH no diagnóstico devem ser consideradas (por exemplo, CLSI Fluorescence In Situ Hybridization Methods for Clinical Laboratories; Approved Guideline - Second Edition).

Instruções de segurança

Todas as sondas produzidas pela MetaSystems Probes são apenas para uso profissional e devem ser utilizadas por pessoal qualificado e treinado. Para garantir uma operação segura e resultados reprodutíveis, por favor, observe os avisos de segurança e sinais de precaução abaixo.

	
	PERIGO
Contém:	Formamida
Advertências de perigo:	H360FD Pode afetar a fertilidade. Pode afetar o nascituro. H351 Suspeito de provocar cancro. H373 Pode afetar os órgãos após exposição prolongada ou repetida.
Recomendações de prudência:	P201 Obter instruções especiais antes da utilização. P260 Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/spray. P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção. P308+ P313 Em caso de exposição ou de preocupação: Obter aconselhamento/ atenção médica. P501 Eliminar o conteúdo/recipiente de acordo com os regulamentos locais/ regionais/nacionais/internacionais.
Etiquetagem especial:	Reservado a utilizadores profissionais.
	CUIDADO: Banho de água quente e placas quentes! Para a desnaturação e hibridação, são utilizados banhos de água quente e placas de aquecimento com temperaturas superiores a 37°C. Ter cuidado para não entrar em contacto direto com superfícies ou líquidos quentes. Usar luvas e uma bata de laboratório. Em caso de contacto com a pele, arrefecer imediatamente com água fria.
	ATENÇÃO: Boas Práticas de Laboratório! Utilizar de acordo com os princípios das boas práticas de laboratório.

Comunicação de eventos adversos

Qualquer incidente grave relacionado com o dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e à autoridade competente do Estado-membro em que o utilizador e/ou o doente está estabelecido.

Resolução de problemas

Problema	Causa(s) potencial(ais)	Solução recomendada
Não são detectados sinais de FISH no microscópio.	• Obturador de luz reflectida fechado / cursor de paragem no caminho da luz.	• Abra o obturador / mova o seletor de paragem para fora do caminho da luz.
	• A lâmpada fluorescente está desligada.	• Ligar a lâmpada fluorescente.
	• O filtro de fluorescência incorreto está no caminho da luz.	• Deslocar o filtro correto para o caminho da luz.
	• O objetivo está fora de posição.	• Balançar o objetivo para o caminho da luz.
	• O fototubo está na posição de câmara.	• Caminho direto da luz para as oculares.
Os sinais de hibridação tornam-se fracos após algum tempo.	• O óleo de imersão penetrou entre a lâmina de vidro e o vidro de cobertura.	• Substituir a lamela e DAPI/antifade. Utilizar uma lamela de 24 mm x 32 mm, mesmo que apenas uma pequena região seja hibridizada.
Sinais difusos.	• A preparação não está suficientemente iluminada.	• Verificar o percurso ótico do microscópio. Ajustar corretamente a luz UV. Verificar o tempo de vida da lâmpada UV.
	• O plano de focagem não pode ser ajustado corretamente.	• Utilizar óleo de imersão suficiente. Não misturar óleos de imersão diferentes. Utilizar óleo de imersão adequado para fluorescência. • A camada anti-desbotamento é demasiado espessa para a focagem. Não utilizar demasiado DAPI/antifade. São suficientes 10 µl por lâmina (lamela de 24 mm x 32 mm). • Utilizar lamelas adequadas.
Sinais fracos.	• A preparação de diapositivos é demasiado antiga.	• As lâminas não devem ter mais de duas semanas. Se as lâminas não forem utilizadas durante este período, conservar a -20 °C (±5 °C)
	• A desnaturação não é adequada.	• O envelhecimento, a cozedura ou a fixação adicional podem inibir a hibridação e não são recomendados. • Aumentar a temperatura de desnaturação até 80 °C ou aumentar o tempo de desnaturação para 3 min.
	• É utilizado um filtro passa-banda múltiplo para a visualização.	• Utilizar um filtro passa-banda simples dedicado.
Sinais aqua ou verde fracos ou fundo difuso elevado no canal de cor verde.	• A intensidade do DAPI é demasiado elevada, o que resulta em interferências com o filtro AQUA ou o filtro VERDE.	• Utilizar DAPI/antifade de baixa concentração.
	• O valor do pH das soluções de lavagem é demasiado baixo.	• Assegurar que o valor do pH das soluções se situa entre 7,0 e 7,5. Alguns fluoróforos verdes são muito sensíveis a pH inferior a 7.
Fundo inespecífico elevado.	• As proteínas citoplasmáticas remanescentes das células podem prejudicar a hibridação.	• Pré-tratar as lâminas com Pepsina.
Se as medidas recomendadas não resolverem o problema, ou se o seu problema não estiver listado, contacte a MetaSystems Probes.		

Apoio ao cliente

Por favor, contacte a MetaSystems Probes GmbH (detalhes de contacto ver abaixo) ou o nosso distribuidor autorizado no seu país.



MetaSystems Probes GmbH
1. Industriestrasse 7
68804 Altlußheim
Alemanha

Tel: +49 (0)6205 292760
Fax: +49 (0)6205 2927629
correio eletrónico: info@metasystems-probes.com
sítio Web: www.metasystems-probes.com

A MetaSystems Probes não se responsabiliza por qualquer interesse de propriedade nas marcas e nomes de terceiros.

Para obter um resumo da segurança e do desempenho, visite o sítio Web <https://ec.europa.eu/tools/eudamed/#/screen/home> ou contacte-nos através do endereço info@metasystems-probes.com.

Símbolos utilizados

Símbolo	Descrição
	Indica um <i>dispositivo médico</i> que se destina a ser utilizado como <i>dispositivo médico</i> de diagnóstico in vitro.
	Marca de conformidade que indica que um dispositivo está em conformidade com os requisitos regulamentares aplicáveis na União Europeia.
	Indica o <i>fabricante do dispositivo médico</i> .
	Indica que é necessário ter cuidado ao utilizar o dispositivo ou o comando próximo do local onde o <i>símbolo</i> está colocado, ou que a situação atual exige a sensibilização ou a ação do operador para evitar consequências indesejáveis.
	Indica a necessidade de o utilizador consultar as <i>instruções de utilização</i> .

Revisão de documentos

Revisão	Data de emissão	Indicação de mudança
PT-CE-IVD-RevA250407-250709v10.1	15.09.2025	Instruções de utilização actualizadas de acordo com o REGULAMENTO (UE) 2017/746 relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro. A atualização não afecta diretamente as características dos dispositivos e não tem impacto na composição ou nos ingredientes dos nossos produtos. Também não influencia a forma como os nossos produtos são aplicados, mas desencadeia alterações às informações fornecidas com o produto como rótulos, finalidade pretendida e instruções de utilização.