



A Sysmex Group Company



Instrucțiuni de utilizare (IFU)
REF: CE-LPA 001-S/CE-LPA 001/
CE-LPA 001-30/CE-LPA 001-50

Prenatal Enumeration Probe Kit



NUMAI PENTRU UTILIZARE PROFESIONALĂ



Informații suplimentare și în alte limbi sunt disponibile pe ogt.com/IFU

Scopul vizat

Kitul de sondă pentru enumerare prenatală CytoCell® este un test calitativ, neautomat, de hibridizare *in situ* fluorescentă (FISH) utilizat pentru detectarea regiunilor centromerice alfa ale cromozomilor Xp11.1-q11.1, Yp11.1-q11.1 și 18p11.1-q11.1 și a regiunilor cromozomilor 13q14.2 și 21q22.1 din celulele fixate în soluție Carnoy (3:1 metanol/acid acetic), derivate din probe de lichid amniotic, la enumerarea cromozomilor X, Y, 13, 18 și 21 în sarcinile cu risc crescut în care se suspectează sindromul Turner, Patau, Edwards sau Down.

Indicații de utilizare

Acest dispozitiv este conceput pentru a fi utilizat complementar la alte teste clinice și de laborator în cadrul algoritmilor stabiliți de diagnostic și tratament în situațiile în care cunoașterea statutului privind numărul de copii ale regiunilor centromerice alfa ale cromozomilor Xp11.1-q11.1 și 18p11.1-q11.1, cum ar fi screeningul cu ultrasunete și testarea biochimică, și ale regiunilor cromozomilor 13q14.2 și 21q22.1, ar fi importante pentru gestionarea pacientului.

Limitări

Acest dispozitiv este conceput pentru a detecta materialul cromozomial care include regiunile centromerice acoperite de clonele verde, portocaliu și aqua din componenta sondei de enumerare prenatală X, Y și 18, pentru cromozomii X, Y și respectiv 18. Este posibil ca acest dispozitiv să nu detecteze inserțiile sau pierderile genomice în afara acestor regiuni ori pierderile sau inserțiile parțiale ale acestor regiuni.

Acest dispozitiv este, de asemenea, conceput pentru a detecta materialul cromozomial care include regiunile cromozomiale 13q14.2 și 21q22.1 acoperite de clonele verzi și portocalii din componenta sondei de enumerare prenatală 13 și 21. Este posibil ca acest produs să nu detecteze inserțiile sau pierderile genomice în afara acestor regiuni ori pierderile sau inserțiile parțiale ale acestor regiuni.

Acest dispozitiv nu este destinat pentru: utilizarea ca dispozitiv de diagnosticare de sine stătător, utilizarea ca dispozitiv de diagnosticare tip companion, screening la nivel de populație, testare la locul de acordare a asistenței medicale sau autotestare.

Acest dispozitiv nu a fost validat pentru utilizarea pe tipuri de probe, tipuri de boli sau scopuri altele decât cele specificate în scopul vizat. Acest dispozitiv nu a fost validat pentru utilizarea în detectarea inserțiilor cromozomilor X și/sau Y.

Acest dispozitiv este destinat ca test complementar altor teste diagnostice de laborator, iar acțiunea terapeutică nu trebuie inițiată exclusiv pe baza rezultatului FISH.

Raportarea și interpretarea rezultatelor FISH trebuie să fie efectuate de personal calificat corespunzător, concordante cu standardele de practică profesională și trebuie să ia în considerare alte rezultate ale testelor, alte informații clinice și diagnostice relevante.

Acest dispozitiv este destinat exclusiv utilizării profesionale în laborator.

Nerespectarea protocolului poate afecta performanța și poate duce la rezultate fals pozitive/negative.

Principiul testului

Hibridizarea fluorescentă *in situ* (FISH) este o tehnică care permite detecția secvențelor de ADN pe cromozomii în metafază sau nucleii în interfază din probe citogenetice fixate. Această tehnică presupune utilizarea sondelor de ADN care se hibridizează la cromozomi întregi sau la secvențe unice separate și servește ca un important test complementar citogeneticilor clasice. Dezvoltările recente au însemnat că această tehnică valoroasă poate fi aplicată acum ca instrument de diagnostic esențial în analiza cromozomială prenatală, hematologică și patologică. ADN-ul țintă, după fixare și denaturare, este disponibil pentru aliniere la o sondă de ADN denaturată în mod similar și marcată fluorescent, care are o secvență complementară. După hibridizare, sonda de ADN nelegată și legată în mod nespecific este îndepărtată, iar ADN-ul este contracolorat pentru vizualizare. După aceea, microscopia de fluorescență permite vizualizarea sondei hibridizate pe materialul țintă.

Informații privind sonda

Analiza citogenetică moleculară joacă un rol esențial în evaluarea prenatală a sarcinilor cu risc crescut, permițând identificarea precisă a anomaliilor cromozomiale și evaluarea riscului de recurență. Cele mai frecvente anomalii cromozomiale sunt aneuploidiile, definite ca un număr anormal de copii ale cromozomilor, persoanele afectate prezentând de obicei trisomie (trei copii ale unui cromozom) sau monosomie (o singură copie a unui cromozom).¹ Aneuploidiile bine cunoscute, semnificative clinic, includ trisomiile 13, 18 și 21, precum și monosomia X. Aceste anomalii reprezintă factori majori care contribuie la tulburările de dezvoltare și la rezultatele reproductive adverse și se numără printre cele mai frecvente indicații pentru diagnosticul prenatal invaziv.²

Trisomia 21 (sindromul Down), cea mai frecventă trisomie autosomală viabilă, este caracterizată prin afectare cognitivă, anomalii cardiace congenitale și morbiditate multisistemică și rămâne o indicație cheie pentru testarea genetică prenatală.^{3,4} Trisomia 13 (sindromul Patau) este caracterizată prin malformații cerebrale (holoprocencefalie), dismorfism facial, anomalii oculare, polidactilii postaxiale, malformații viscerale (cardiopatie) și retard psihomotor sever.⁵ Trisomia 18 (sindromul Edwards) este asociată cu malformații congenitale severe, mortalitate perinatală ridicată și fenotipuri ultrasonografice bine definite, subliniind necesitatea detectării prenatale precise și a confirmării genetice.^{6,7} Monosomia X (sindromul Turner), denumită și sindromul hipoplaziei ovariene congenitale, este cea mai frecventă anomalie cromozomială sexuală la femei și rezultă din absența completă sau parțială a unui cromozom X.⁸

Diagnosticul prenatal este oferit în sarcinile cu risc crescut de anomalii cromozomiale, cum ar fi trisomia 13, 18, 21 și monosomia X. FISH este o metodă citogenetică moleculară validată pentru detectarea și enumerarea rapide ale numărului de copii ale cromozomilor în nucleii interfazici. FISH permite detectarea țintită a aneuploidiilor comune și oferă rezultate rapide pentru a sprijini luarea deciziilor clinice și este utilizată pe scară largă în diagnosticul modern al aneuploidiilor, în special acolo unde este necesară confirmarea promptă a stării numărului de copii ale cromozomilor.^{9,10,11}

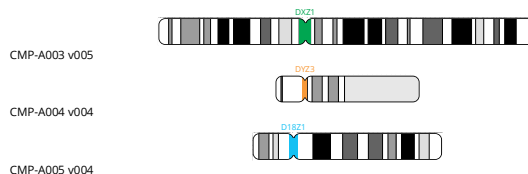
Specificații privind sonda

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Centromer X, Xp11.1 – q11.1 (DXZ1) Verde

Centromer Y, Yp11.1 – q11.1 (DYZ3) Portocaliu

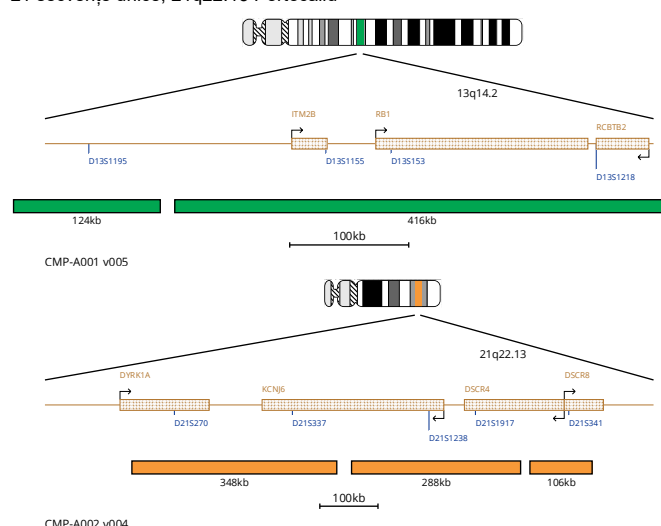
Centromer 18, 18p11.1 – q11.1 (D18Z1) Aqua



LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

13 secvențe unice, 13q14.2 Verde

21 secvențe unice, 21q22.13 Portocaliu



Kitul conține două componente ale sondei pentru două hibridizări separate.

LPA002

Componenta sondei LPA002 este un amestec de sonde ADN fluorescente marcate direct cu verde, portocaliu și aqua:

- Sonda verde DXZ1 marchează direct secvențele de ADN satelit alfa din regiunea DXZ1 a cromozomului X.
- Sonda portocalie DYZ3 marchează direct secvențele de ADN satelit alfa din regiunea DYZ3 a cromozomului Y.
- Sonda aqua D18Z1 marchează direct secvențele de ADN satelit alfa din regiunea D18Z1 a cromozomului 18.

LPA003

Componenta sondei LPA003 este un amestec de sonde ADN fluorescente marcate direct cu verde și portocaliu, care conțin secvențe unice:

- Amestecul de sonde verzi conține o sondă de 124 kb și o sondă de 416 kb la 13q14.2 care acoperă genele ITM2B, RB1 și RCBTB2, inclusiv markerii D13S1195, D13S1155, D13S153 și D13S1218.
- Amestecul de sonde portocalii conține o sondă de 348 kb, o sondă de 288 kb și o sondă de 106 kb la 21q22.13 care acoperă genele DYRK1A, KCNJ6, DSCR4 și DSCR8, inclusiv markerii D21S270, D21S337, D21S1238, D21S1917 și D21S341.

Materiale furnizate

Sonda: 50 µl per flacon în kitul de 5 teste, 100 µl per flacon în kitul de 10 teste, 300 µl per flacon în kitul de 30 teste, 500 µl per flacon în kitul de 50 teste. Componentele sondei sunt furnizate preamestecate în soluție de hibridizare (<65% formamidă; <20 mg sulfat de dextran; <10% soluție salină - citrat de sodiu (SSC)) 20x și sunt gata de utilizare.

Contracolorant: 150 µl per flacon în kitul de 5 teste, 500 µl per flacon în kitul de 10 teste, 1000 µl per flacon în kitul de 30 teste sau 1200 µl per flacon în kitul de 50 teste.

Contracolorantul este DAPI Antifade ES (0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) în mediu de montare pe bază de glicerol).

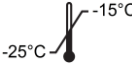
Atenționări și precauții

- Pentru diagnosticare *in vitro*. Numai pentru utilizare profesională în laborator.
- Operatorii trebuie să se asigure că sunt consultate și respectate în permanență instrucțiunile de utilizare corecte și cele mai recente.
- Amestecurile de sonde conțin formamidă, care este teratogen; nu inhalați vaporii și nu permiteți contactul cu pielea. Manevrați cu atenție; purtați mănuși și halat de laborator.
- Manevrați DAPI cu atenție; purtați mănuși și halat de laborator.
- Nu utilizați dacă flacoanele sunt deteriorate sau conținutul flaconului este compromis în vreun fel.
- Urmați reglementările locale privind eliminarea pentru locația dvs., împreună cu recomandările din Fișa cu date de securitate pentru a determina eliminarea în siguranță a acestui produs. Acest lucru este valabil și pentru conținutul deteriorat al kitului de testare.
- Eliminați toți reactivii utilizați și orice alte materiale contaminate de unică folosință urmând procedurile pentru deșeurile infecțioase sau potențial infecțioase. Este responsabilitatea fiecărui laborator să manipuleze deșeurile solide și lichide în conformitate cu natura și gradul de periculozitate al acestora și să le trateze și să le elimine (sau să dispună tratarea și eliminarea) în conformitate cu orice reglementări aplicabile.
- Operatorii trebuie să fie capabili să distingă culorile aqua, portocaliu și verde.
- Nerespectarea protocolului specificat, a utilizării echipamentelor și a reactivilor poate afecta performanța și poate duce la rezultate fals pozitive/negative.
- Sonda nu trebuie diluată sau amestecată cu alte sonde.
- Neutilizarea de 10 µl din sondă în timpul etapei de predenaturare a protocolului poate afecta performanța și poate duce la rezultate fals pozitive/negative.
- Toate produsele trebuie validate înainte de utilizare.
- Controalele interne ar trebui efectuate prin utilizarea populațiilor de celule neafectate în probele de testare.
- Trebuie luate măsuri de precauție pentru a preveni contaminarea dintre flacoanele care conțin LPA002 și LPA003.

Definiții de temperatură

- 20 °C/Congelat/La congelator: -25 °C până la -15 °C
- 37 °C: +37 °C ± 1 °C
- 72 °C: +72 °C ± 1 °C
- 75 °C: +75 °C ± 1 °C
- Temperatura camerei (RT): +15 °C până la +25 °C

Depozitare și manipulare

 Kitul trebuie păstrat la temperaturi cuprinse între -25 °C și -15 °C în congelator până la data de expirare, indicată pe eticheta kitului. Flacoanele cu sondă și contracolorant trebuie păstrate la întuneric.



Sonda FISH, contracolorantul DAPI Antifade ES și soluția de hibridizare rămân stabile pe parcursul ciclurilor de congelare-decongelare din timpul utilizării normale (un ciclu constituie scoaterea flaconului din congelator și repunerea acestuia în congelator). **Sonde FISH:** 5 cicluri pentru kitul de 5 teste, 10 cicluri pentru kitul de 10 teste, 30 de cicluri pentru kitul de 30 de teste, 50 de cicluri pentru kitul de 50 de teste. **Contracolorant:** 10 cicluri pentru kitul de 5 teste, 20 de cicluri pentru kitul de 10 teste, 60 de cicluri pentru kitul de 30 de teste și 100 de cicluri pentru kitul de 50 de teste. Expunerea la lumină trebuie redusă la minimum și evitată ori de câte ori este posibil. Păstrați componentele în recipient rezistent la lumină furnizat. Componentele utilizate și depozitate în alte condiții decât cele menționate pe etichetă pot să nu funcționeze conform așteptărilor și pot afecta negativ rezultatele testului. Trebuie depuse toate eforturile pentru a limita expunerea la lumină.

Echipamente și materiale necesare, dar care nu sunt furnizate

Trebuie utilizate echipamente calibrate:

- Placă fierbinte (cu placă solidă și control precis al temperaturii până la 80 °C)
- Micropipete cu volum variabil, calibrate și vârful, în intervalul 1 µl - 200 µl
- Baie de apă cu control precis al temperaturii la 37 °C și 72 °C
- Eprubete de microcentrifugă (0,5 ml)
- Microscop de fluorescență (vă rugăm să consultați secțiunea Recomandare privind microscopul de fluorescență)
- Microscop în contrast de fază
- Vase Coplin din plastic, ceramică sau sticlă rezistentă la căldură, curate
- Pensă
- pH-metru calibrat (sau benzi indicatoare de pH capabile să măsoare valori ale pH-ului de 6,5 – 8,0)
- Recipient umidificat
- Ulei de imersie pentru lentile de microscop de grad de fluorescență
- Centrifugă pentru banc de lucru
- Lame de microscop
- Lamele de 24x24 mm
- Cronometru
- Incubator la 37 °C
- Adeziv din soluție de cauciuc
- Mixer vortex
- Cilindri gradați
- Agitator magnetic
- Termometru calibrat

Echipamente opționale, care nu sunt furnizate

- Cameră de uscare de citogenetică

Reactivi necesari, dar care nu sunt furnizați

- Soluție salină - citrat de sodiu (SSC - saline-sodium citrate) 20x
- Etanol 100%
- Tween-20
- Hidroxid de sodiu (NaOH) 1M
- Acid clorhidric (HCl) 1M
- Apă purificată

Recomandare privind microscopul de fluorescență

Utilizați o lampă cu mercur de 100 wați sau echivalent și obiective plane apocromate cu imersie în ulei de 60/63x sau 100x pentru vizualizare optimă. Fluoroforii utilizați în acest kit de sonde vor fi excitați și vor emite la următoarele lungimi de undă:

Fluorofor	Excitația _{max} [nm]	Emisia _{max} [nm]
Aqua	418	467
Verde	495	521
Portocaliu	551	572

Asigurați-vă de atașarea la microscop a unor filtre de excitație și emisie adecvate care acoperă lungimile de undă enumerate mai sus.

Filtrul cu bandă de trecere triplă DAPI/FITC/TRITC este optim pentru vizualizarea simultană a fluoroforilor verzi și portocalii, precum și pentru contracolorare. Fluoroforul Aqua are specificitate pentru spectrul Aqua și DEAC (este necesar un filtru cu bandă de trecere unică Aqua sau DEAC).

Verificați microscopul de fluorescență înainte de utilizare, pentru a vă asigura că acesta funcționează corect. Utilizați ulei de imersie care este adecvat pentru microscopia de fluorescență și este formulat pentru autofluorescență redusă. Evitați amestecul agentului anti-diminuare a colorării DAPI cu uleiul de imersie pentru microscop, deoarece acest lucru ar estompa semnalele. Urmați recomandările producătorului cu privire la durata de viață a lămpii și vârsta filtrelor.

Prepararea probelor

Kitul este conceput pentru utilizare pe celule fixate în soluție Carnoy (3:1 metanol/acid acetic) derivate din probe de lichid amniotic, pentru enumerarea cromozomilor X, Y, 13, 18 și 21 la pacienți cu sarcini cu risc crescut în care se suspectează sindromul Turner, Patau, Edwards sau Down, care sunt pregătite conform ghidurilor de laborator sau ale instituției. Recoltarea probelor de lichid amniotic trebuie efectuată conform instrucțiunilor laboratorului sau instituției. Probele care apar sângeroase sau maronii nu trebuie utilizate, deoarece pot conține sânge matern și pot duce la rezultate false. Preparați probele uscate la aer pe lame de microscop în conformitate cu procedurile standard de citogenetică. *Manualul de laborator de analize citogenetice* (Cytogenetics Laboratory Manual) al AGT (Association of Genetic Technologists) conține recomandări pentru colectarea specimenelor, cultura, recoltarea și crearea lamelor.¹²

Prepararea soluțiilor

Soluțiile de etanol

Diluati etanol 100% cu apă purificată prin utilizarea următoarelor proporții și amestecați temeinic:

- Etanol 70% - 7 părți etanol 100% la 3 părți apă purificată
- Etanol 85% - 8,5 părți etanol 100% la 1,5 părți apă purificată

Păstrați soluțiile timp de maximum 6 luni la temperatura camerei, într-un recipient ermetic.

Soluție SSC 2x

Diluati 1 parte soluție SSC 20x cu 9 părți apă purificată și amestecați temeinic. Verificați pH-ul și ajustați la pH de 7,0 prin utilizarea de NaOH sau HCl, după cum este necesar. Păstrați soluția timp de maximum 4 săptămâni la temperatura camerei într-un recipient ermetic.

Soluție SSC 0,4x

Diluati 1 parte soluție SSC 20x cu 49 părți apă purificată și amestecați temeinic. Verificați pH-ul și ajustați la pH de 7,0 prin utilizarea de NaOH sau HCl, după cum este necesar. Păstrați soluția timp de maximum 4 săptămâni la temperatura camerei într-un recipient ermetic.

Soluție SSC 2x, Tween-20 0,05%

Diluati 1 parte soluție SSC 20x cu 9 părți apă purificată. Adăugați 5 μl de Tween-20 per 10 ml și amestecați temeinic. Verificați pH-ul și ajustați la pH de 7,0 prin utilizarea de NaOH sau HCl, după cum este necesar. Păstrați soluția timp de maximum 4 săptămâni la temperatura camerei într-un recipient ermetic.

Protocolul FISH

(Notă: Asigurați-vă de faptul că expunerea sondei la luminile din laborator este limitată în toate momentele temporale.)

Prepararea lamei

- 1. Depuneți punctiform proba de celule pe o lamă de microscop din sticlă. Lăsați să se usuce. (Opțional, dacă se utilizează o cameră de uscarea citogenetică: Camera trebuie să funcționeze la aproximativ 25 °C și umiditate de 50% pentru depunerea punctiformă optimă a probei de celule. Dacă nu este disponibilă o cameră de uscarea de citogenetică, utilizați ca alternativă o hotă).
- 2. Imersați lama în SSC 2x timp de 2 minute la temperatura camerei (RT - room temperature), fără agitare.
- 3. Deshidrați în serii de etanol (70%, 85% și 100%), fiecare timp de 2 minute la RT.
- 4. Lăsați să se usuce.

Pre-denaturarea

- 5. Scoateți sonda din congelator și lăsați să se încălzească la RT. Centrifugați scurt eprubetele înainte de utilizare.
- 6. Asigurați-vă de faptul că soluția de sondă este amestecată uniform, cu o pipetă.
- 7. Îndepărtați 10 μl de sondă per test și transferați într-o eprubetă de microcentrifugă. Puneți la loc rapid sonda rămasă în congelator.
- 8. Plasați sonda și lama cu probă pentru preîncălzire pe o placă fierbinte de 37 °C (+/- 1 °C) timp de 5 minute.
- 9. Depuneți punctiform 10 μl de amestec de sondă pe proba de celule și aplicați cu atenție o lamelă. Sigilați cu adeziv din soluție de cauciuc și lăsați adezivul să se usuce complet.

Denaturarea

- 10. Denaturați simultan proba și sonda prin încălzirea lamei pe o placă fierbinte la 75 °C (+/- 1 °C) timp de 2 minute.

Hibridizarea

- 11. Plasați lama într-un recipient umed, impermeabil pentru lumină, la 37 °C (+/- 1 °C) și lăsați-o să stea peste noapte.

Spălările post-hibridizare

- 12. Scoateți DAPI din congelator și lăsați să se încălzească la RT.
- 13. Îndepărtați cu atenție lamela și toate urmele de adeziv.
- 14. Imersați lama în SSC 0,4x (pH 7,0) la 72 °C (+/- 1 °C) timp de 2 minute fără agitare.
- 15. Lăsați lama să se scurgă și imersați-o în SSC x2, Tween-20 0,05% la RT (pH 7,0) timp de 30 secunde fără agitare.
- 16. Lăsați lama să se scurgă și aplicați 10 μl de agent anti-diminuare a colorării DAPI pe fiecare probă.
- 17. Acoperiți cu o lamelă, îndepărtați orice eventuale bule și lăsați culoarea să se dezvolte la întuneric timp de 10 minute.
- 18. Vizualizați cu un microscop de fluorescență (consultați secțiunea **Recomandare privind microscopul de fluorescență**).

Recomandări procedurale

- 1. Coacerea sau îmbătrânirea lamelor poate reduce semnalul de fluorescență.
- 2. Condițiile de hibridizare pot fi influențate în mod negativ de utilizarea unor reactivi diferiți de cei furnizați sau recomandați de Cytocell Ltd.
- 3. Utilizați un termometru calibrat pentru măsurarea temperaturilor soluțiilor, băilor de apă și incubatoarelor, deoarece aceste temperaturi sunt critice pentru performanța optimă a produsului.
- 4. Concentrațiile, pH-ul și temperaturile de spălare sunt importante, deoarece o strictețe redusă poate avea ca rezultat legarea nespecifică a sondei, iar o strictețe prea mare poate avea ca rezultat lipsa de semnal.
- 5. Denaturarea incompletă poate avea ca rezultat lipsa de semnal, iar denaturarea exagerată poate avea ca rezultat, de asemenea, legarea nespecifică.
- 6. Hibridizarea exagerată poate avea ca rezultat semnale suplimentare sau neașteptate.
- 7. Utilizatorii trebuie să optimizeze protocolul pentru propriile lor probe înainte de utilizarea testului în scopuri diagnostice.
- 8. Condițiile suboptimale pot avea ca rezultat legarea nespecifică, care poate fi interpretată eronat ca semnal al sondei.

Interpretarea rezultatelor

Evaluarea calității lamei

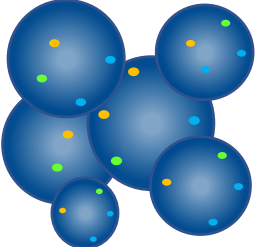
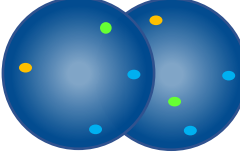
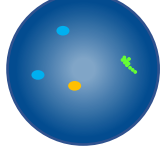
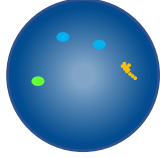
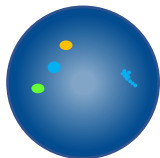
Lama nu trebuie analizată dacă:

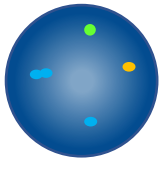
- Semnalele sunt prea slabe pentru a fi analizate în filtre unice - pentru a continua analiza, semnalele trebuie să apară luminoase, distincte și ușor evaluabile
- Există un număr mare de celule agregate/suprapuse care obstrucționează analiza
- >50% dintre celule nu sunt hibridizate

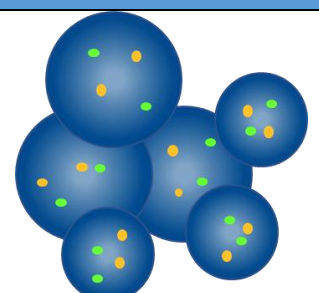
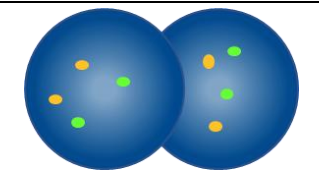
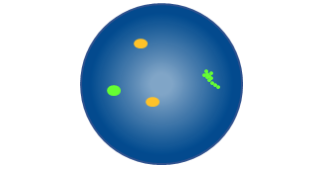
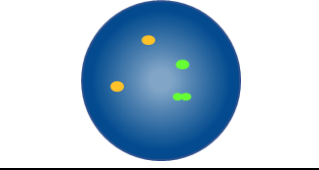
- Există un exces de particule fluorescente între celule și/sau o ceață fluorescentă care interferează cu semnalele - în lamele optime, fundalul trebuie să apară întunecat sau negru și curat
- Marginile nucleilor celulelor nu pot fi distinse și nu sunt intacte

Linii directoare privind analiza

- Fiecare probă trebuie analizată și interpretată de doi analiști. Orice discrepanță trebuie rezolvată prin evaluarea de către un al treilea analist
- Fiecare analist trebuie să fie calificat adecvat în conformitate cu standardele recunoscute la nivel național
- Fiecare analist ar trebui să evalueze independent suficienți nuclei din fiecare probă, astfel încât scorurile combinate ale analiștilor să îndeplinească criteriile minime specificate de ghidurile instituționale, regionale sau naționale. Primul analist trebuie să înceapă analiza din partea stângă a lamei, iar cel de-al doilea analist, din partea dreaptă.
- Fiecare analist trebuie să își documenteze rezultatele în fișe separate
- Analizați numai nucleii intacti, nu și pe cei suprapuși sau aglomerați sau nucleii acoperiți de resturi citoplasmice sau cu un grad ridicat de autofluorescență
- Evitați zonele în care există un exces de resturi citoplasmice sau hibridizare nespecifică
- Intensitatea semnalului poate varia, chiar și în cazul unui singur nucleu. În astfel de cazuri, utilizați filtre unice și/sau ajustați planul focal
- În condiții suboptimale, semnalele pot apărea difuze. Dacă două semnale de aceeași culoare se ating unul pe celălalt, sau dacă distanța dintre ele nu este mai mare decât două lățimi de semnal, sau atunci când există un fir slab care conectează cele două semnale, considerați ca un singur semnal
- Dacă aveți orice dubii cu privire la caracterul analizabil al unei celule, nu o analizați

Linii directoare privind analiza – LPA002	
	Nu se analizează — nucleii se află prea aproape unii de ceilalți pentru a le putea determina hotarele
	Nucleii suprapuși nu se analizează — nu sunt vizibile toate zonele celor doi nuclei
	Considerați ca un semnal verde, un semnal portocaliu și două semnale aqua — semnalul verde este difuz
	Considerați ca un semnal verde, un semnal portocaliu și două semnale aqua — semnalul portocaliu este difuz
	Considerați ca un semnal verde, un semnal portocaliu și două semnale aqua — unul dintre cele două semnale aqua este difuz

	Considerați ca un semnal verde, un semnal portocaliu și două semnale aqua – intervalul dintre semnalele aqua este mai mic decât două lățimi ale sondei
--	--

Linii directoare privind analiza – LPA003	
	Nu se analizează — nucleii se află prea aproape unii de ceilalți pentru a le putea determina hotarele
	Nucleii suprapuși nu se analizează — nu sunt vizibile toate zonele celor doi nucleii
	Considerați ca două semnale portocalii și două semnale verzi — unul dintre cele două semnale verzi este difuz
	Considerați ca două semnale portocalii și două semnale verzi — breșa în cadrul unui semnal verde este mai mică decât lățimea a două semnale

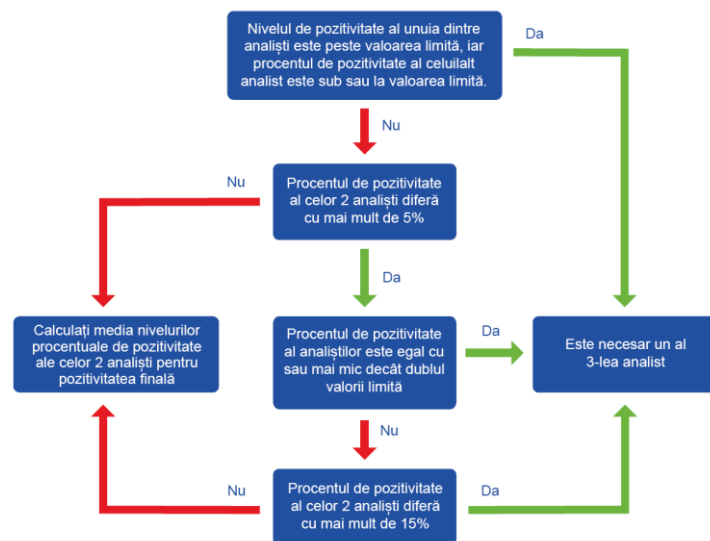
Cerințe pentru al treilea analist

În funcție de numărul de nucleii anormali pe care l-a observat fiecare analist, poate fi necesar un al treilea analist. Al treilea analist va analiza același număr de nucleii ca primii doi analiști, conform specificațiilor din ghidurile instituționale, regionale sau naționale. Regulile pentru un al treilea analist sunt detaliate în textul și graficul de mai jos.

Un al treilea analist este necesar dacă:

- Procentul de pozitivitate al unuia dintre analiști este peste valoarea limită, iar procentul de pozitivitate al celorlalți analiști este sub sau la valoarea limită.
- Procentul de pozitivitate al celor doi analiști diferă cu mai mult de 5%, iar procentul de pozitivitate al oricărui dintre ei este egal sau mai mic decât dublul valorii limită.
- Procentul de pozitivitate al celor doi analiști diferă cu mai mult de 15%.

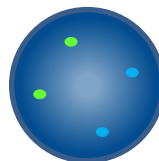
Dintre cele trei scoruri obținute, se va efectua media celor două valori procentuale pozitive cele mai apropiate pentru pozitivitatea finală. Dacă cele 3 scoruri sunt echidistante, atunci valoarea de pozitivitate mediană trebuie utilizată.



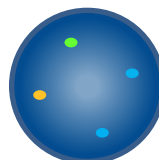
Rezultate așteptate

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Modele de semnale normale așteptate

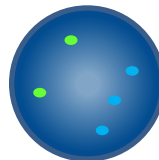


Într-o celulă feminină normală, sunt așteptate două semnale verzi și două semnale aqua (2V2A).

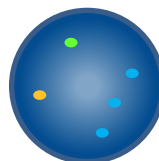


Într-o celulă masculină normală, sunt așteptate un semnal verde, unul portocaliu și două semnale aqua (1V1P2A).

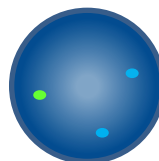
Modele de semnale anormale așteptate



Într-o celulă feminină cu trisomia 18, modelul de semnale așteptat va fi două semnale verzi și trei semnale aqua (2V3A).

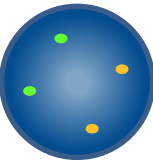


Într-o celulă masculină cu trisomia 18, modelul de semnale așteptat va fi un semnal verde, un semnal portocaliu și trei semnale aqua (1V1P3A).



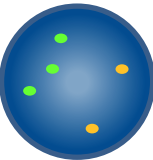
Într-o celulă cu sindromul Turner, modelul de semnale așteptat va fi un semnal verde și două semnale aqua (1V2A).

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe
Model de semnale normale așteptat

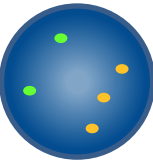


Într-o celulă normală, sunt așteptate două semnale verzi și două semnale portocalii (2V2P).

Modele de semnale anormale așteptate



Într-o celulă cu trisomia 13, se vor aștepta trei semnale verzi și două semnale portocalii (3V2P).



Într-o celulă cu trisomie 21, se vor aștepta două semnale verzi și trei semnale portocalii (2V3P).

În specimene cu aneuploidie/neechilibrate sunt posibile și alte modele de semnale.

Interferențe/substanțe interferente relevante cunoscute
Fără interferențe/substanțe interferente relevante cunoscute.

Reactivitate încrucișată cunoscută

Sonda DXZ1 poate prezenta hibridizare încrucișată cu centromerii cromozomilor 1, 11, 17 și Y.
Sonda DYZ3 poate demonstra hibridizare încrucișată cu centromerii cromozomilor 13, 14, 15, 20, 21, 22 și X.
Sonda D18Z1 poate prezenta hibridizare încrucișată cu centromerii cromozomilor 2, 4, 8, 9, 13, 14, 15, 20, 21 și 22.

Raportarea incidentelor grave

Pentru un pacient/utilizator/terț din Uniunea Europeană și din țările cu regim de reglementare identic (Regulamentul (UE) 2017/746 privind dispozitivele medicale de diagnostic in vitro); dacă, în timpul utilizării acestui dispozitiv sau ca urmare a utilizării acestuia, a avut loc un incident grav, vă rugăm să îl raportați producătorului și autorității dumneavoastră naționale competente.
Pentru incidente grave din alte țări, vă rugăm să raportați producătorului și, dacă este cazul, autorității dumneavoastră naționale competente.
Adresa de contact pentru vigilență a producătorului: vigilance@oqt.com
Pentru autoritățile naționale competente din UE, o listă de puncte de contact de vigilență se găsește la: https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

Caracteristici de performanță specifice

Specificitatea analitică

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Specificitatea analitică este definită ca procentul de semnale care se hibridizează la locusul corect și nu în altă locație. Au fost analizate 4 locusuri cromozomiale în fiecare dintre cele 20 de celule în metafază din 5 probe, obținându-se câte 100 de puncte de date pentru cromozomii X și Y și 200 de puncte de date pentru cromozomul 18. Locația fiecărei sonde hibridizate a fost mapată și a fost înregistrat numărul de semnale FISH de cromozomi în metafază care s-au hibridizat în locusul corect.

Specificitatea analitică a fiecărei sonde din kit a fost calculată ca numărul de semnale FISH de cromozomi în metafază hibridizați la locusul corect împărțit la numărul total de semnale FISH de cromozomi în metafază hibridizați. Acest rezultat a fost exprimat ca procent cu un interval de încredere de 95%.

Tabelul 1. Specificitate analitică pentru LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Ținta	Numărul de cromozomi în metafază hibridizați	Numărul de locusuri cu hibridizare corectă	Specificitatea analitică	Interval de încredere 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

Specificitatea analitică este definită ca procentul de semnale care se hibridizează la locusul corect și nu în altă locație. Au fost analizate 4 locusuri cromozomiale în fiecare dintre cele 20 de celule în metafază din 5 probe, obținându-se câte 200 de puncte de date pentru cromozomii 13 și 21. Locația fiecărei sonde hibridizate a fost mapată și a fost înregistrat numărul de semnale FISH de cromozomi în metafază care s-au hibridizat în locusul corect.

Specificitatea analitică a fiecărei sonde din kit a fost calculată ca numărul de semnale FISH de cromozomi în metafază hibridizați la locusul corect împărțit la numărul total de semnale FISH de cromozomi în metafază hibridizați. Acest rezultat a fost exprimat ca procent cu un interval de încredere de 95%.

Tabelul 2. Specificitate analitică pentru LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Ținta	Numărul de cromozomi în metafază hibridizați	Numărul de locusuri cu hibridizare corectă	Specificitatea analitică	Interval de încredere de 95%
13q14.2	200	200	100%	98,12-100%
21q22.1	200	200	100%	98,12-100%

Sensibilitatea analitică

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Sensibilitatea analitică este procentul de celule de interfază cărora li se poate atribui un scor cu modelul de semnale normale așteptat. Au fost analizate minimum 50 de celule în interfază pentru fiecare dintre cele 25 de suspensii celulare fixate din probe de lichid amniotic de la bărbați cariotipic normali și 25 de femei cariotipic normale, considerate ca având un complement normal al cromozomului 18, rezultând un număr total minim de 2500 de nuclee. Datele privind sensibilitatea au fost analizate pe baza procentului de celule care prezintă un model de semnale normale așteptat și au fost exprimate ca procent cu un interval de încredere de 95%.

Tabelul 3. Sensibilitate analitică pentru LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Tip de probă	Criterii de sensibilitate	Rezultat de sensibilitate
Lichidul amniotic	>95%	95,99% (95,15-96,69%)

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Sensibilitatea analitică este procentul de celule de interfază cărora li se poate atribui un scor cu modelul de semnale normale așteptat. Au fost analizate minimum 50 de celule în interfază pentru fiecare dintre cele 25 de suspensii celulare fixate din probe de lichid amniotic de la bărbați cariotipic normali sau femei cariotipic normale, considerate ca având un complement normal de cromozomi 13 și 21, rezultând un minim de 1250 de nuclee evaluați pentru fiecare tip de probă. Datele privind sensibilitatea au fost analizate pe baza procentului de celule care prezintă un model de semnale normale așteptat și au fost exprimate ca procent cu un interval de încredere de 95%.

Tabelul 4. Sensibilitate analitică pentru LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Tip de probă	Criterii de sensibilitate	Rezultat de sensibilitate
Lichidul amniotic	>95%	96,24% (94,84-97,64%)

Caracterizarea valorilor limită de normalitate

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Valoarea normală de referință este definită ca procentul de celule care prezintă un model de semnale fals pozitive la care o persoană ar fi considerată normală și care nu este concordant cu un diagnostic clinic. Au fost analizate minimum 50 de celule în interfază pentru fiecare dintre cele 25 de suspensii celulare fixate din probe de lichid amniotic de la bărbați cariotipic normali și 25 de femei cariotipic normale, considerate ca având un complement normal al cromozomului 18, rezultând un număr total minim de 2500 de nuclee.

Valoarea normală de referință a fost determinată prin utilizarea funcției β -inversă (BETAINV) din MS Excel. Aceasta a fost calculată ca procentul de celule în interfață care prezintă un model de semnale fals pozitive prin utilizarea limitei superioare a unui interval de încredere de 95% unilateral al distribuției binomiale într-o probă de la un pacient normal.

Tabelul 5. Caracterizarea valorilor limită normale pentru LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Tip de probă	Model de semnale	Rezultat de referință
Lichidul amniotic	1V1P3A	11,62%
	2V3A	8,97%
	1V2A	13,98%

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Valoarea normală de referință este definită ca procentul de celule care prezintă un model de semnale fals pozitive la care o persoană ar fi considerată normală și care nu este concordant cu un diagnostic clinic. Au fost analizate minimum 50 de celule în interfață pentru fiecare dintre suspensiile de celule din lichidul amniotic de la 25 de bărbați cariotipic normali sau femei cariotipic normale, rezultând un minim de 1250 de nucleu evaluați pentru fiecare tip de probă.

Valoarea normală de referință a fost determinată prin utilizarea funcției β -inversă (BETAINV) din MS Excel. Aceasta a fost calculată ca procentul de celule în interfață care prezintă un model de semnale fals pozitive prin utilizarea limitei superioare a unui interval de încredere de 95% unilateral al distribuției binomiale într-o probă de la un pacient normal.

Tabelul 6. Caracterizarea valorilor limită normale pentru LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Tip de probă	Model de semnale	Rezultat de referință
Lichidul amniotic	2V3P	8,97%
	3V2P	

Laboratoarele trebuie să verifice valorile de referință în baza propriilor date.^{13,14}

Precizia

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Precizia acestui produs a fost măsurată în termeni de precizie în cadrul aceleiași zile (între probe), precizie între zile diferite (între zile) și precizie între loturi diferite în cadrul aceluiași centru (între loturi).

Au fost utilizate 3 probe pentru a evalua precizia acestui produs: 1 probă de lichid amniotic masculin normal, considerată XY și având un complement normal al cromozomului 18, 1 probă de lichid amniotic feminin normal, considerată XX și având un complement normal al cromozomului 18 și 1 probă de lichid amniotic feminin slab pozitiv pentru trisomia 18.

Precizia în zile diferite și în cadrul aceleiași zile a fost evaluată prin testarea probelor în triplicat pe parcursul a 10 zile neconsecutive. Precizia între loturi a fost evaluată prin testarea a 3 loturi independente de produse în triplicat, utilizând aceleași probe. Rezultatele au fost prezentate ca fiind concordanta globală cu clasificarea așteptată (pozitiv sau negativ).

Tabelul 7. Reproducibilitate și precizie pentru LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Variabilă	Tip de probă	Concordanța
În cadrul aceleiași zile	Lichid amniotic negativ la femei	100,0%
	Lichidul amniotic la femei cu trisomie 18	90,0%
În zile diferite	Lichid amniotic negativ la femei	100,0%
	Lichidul amniotic la femei cu trisomie 18	90,0%
	Lichidul amniotic negativ la bărbați	100,0%
Seturi de sonde diferite	Lichid amniotic negativ la femei	100,0%
	Lichidul amniotic la femei cu trisomie 18	100,0%
	Lichidul amniotic negativ la bărbați	100,0%

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Precizia acestui produs a fost măsurată în termeni de precizie în cadrul aceleiași zile (între probe), precizie între zile diferite (între zile) și precizie între loturi diferite în cadrul aceluiași centru (între loturi).

Au fost utilizate 3 probe pentru a evalua precizia acestui produs: 1 probă normală de lichid amniotic considerată ca având un complement normal al cromozomilor 13 și 21, 1 probă de lichid amniotic cu trisomia 13 slab pozitivă și 1 probă de lichid amniotic cu trisomia 21 slab pozitivă.

Precizia în zile diferite și în cadrul aceleiași zile a fost evaluată prin testarea probelor în triplicat pe parcursul a 10 zile neconsecutive. Precizia între loturi a fost evaluată prin testarea a 3 loturi independente de produse în triplicat, utilizând aceleași probe. Rezultatele au fost prezentate ca fiind concordanta globală cu clasificarea așteptată (pozitiv sau negativ).

Tabelul 8. Reproducibilitate și precizie pentru LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Variabilă	Tip de probă	Concordanța
Între zile diferite și în cadrul aceleiași zile	Lichidul amniotic negativ	100,0%
	Lichidul amniotic cu trisomia 13 slab pozitivă	100,0%
	Lichidul amniotic cu trisomia 21 slab pozitivă	96,7%
Seturi de sonde diferite	Lichidul amniotic negativ	88,9%
	Lichidul amniotic cu trisomia 13 slab pozitivă	100,0%
	Lichidul amniotic cu trisomia 21 slab pozitivă	100,0%

Performanța clinică

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Pentru a asigura faptul că sonda de enumerare prenatală X, Y și 18 detectează rearanjamentele de destinație, performanța clinică a fost stabilită în cadrul unui studiu efectuat pe probe reprezentative ale populației de destinație pentru produs: Material rezidual fixat cu metanol/acid acetic 3:1 din probe de lichid amniotic prenatal. Mărimea eșantionului pentru studiu a fost de 71 de specimene, cu o populație de 3 specimene pozitive pentru trisomia 18, 2 specimene pozitive pentru monosomia X și 66 de specimene negative. Toate probele au fost dezidentificate și randomizate, pentru a preveni eroarea sistematică a analizei. Rezultatele au fost comparate cu statutul cunoscut al probei. Sonda a identificat corect statutul probelor în toate cazurile.

Rezultatele acestor teste au fost analizate pentru a furniza valorile privind sensibilitatea clinică, specificitatea clinică și rata de rezultate fals pozitive (FPR, false positive rate) pentru semnalele pozitive, prin utilizarea unei abordări unidimensionale.

Tabelul 9. Performanța clinică pentru Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Variabilă	Rezultat
Sensibilitate clinică (rata de rezultate adevărat pozitive - TPR, true positive rate)	100,0%
Specificitate clinică (rata de rezultate adevărat negative - TNR, true negative rate)	100,0%
Rata de rezultate fals pozitive (FPR, false positive rate) = 1 - specificitatea	0,0%

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Pentru a asigura faptul că sonda de enumerare prenatală 13 și 21 detectează rearanjamentele de destinație, performanța clinică a fost stabilită în cadrul a trei studii efectuate pe probe reprezentative ale populației de destinație pentru produs: Material rezidual fixat cu metanol/acid acetic 3:1 din probe de lichid amniotic prenatal. Mărimea eșantionului pentru studiu a fost de 172 de specimene, cu o populație de 15 specimene pozitive pentru trisomia 13 și 157 de specimene negative pentru trisomia 13 și un total de 109 specimene pozitive pentru cu trisomia 21 și 63 de specimene negative pentru trisomia 21. Rezultatele au fost comparate cu statutul cunoscut al probei. Sonda a identificat corect statutul probelor în toate cazurile.

Rezultatele acestor teste au fost analizate pentru a furniza valorile privind sensibilitatea clinică, specificitatea clinică și rata de rezultate fals pozitive (FPR, false positive rate) pentru semnalele pozitive, prin utilizarea unei abordări unidimensionale.

Tabelul 10. Performanța clinică pentru Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Variabilă	Rezultat
Sensibilitate clinică (rata de rezultate adevărat pozitive - TPR, true positive rate)	100,0%
Specificitate clinică (rata de rezultate adevărat negative - TNR, true negative rate)	100,0%
Rata de rezultate fals pozitive (FPR, false positive rate) = 1 - specificitatea	0,0%

Rezumatul siguranței și performanței (SSP)

SSP-ul se pune la dispoziția publicului prin intermediul bazei de date europene privind dispozitivele medicale (Eudamed), unde este conectat la UDI-DI de bază. URL-ul Eudamed: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> UDI-DI de bază: 50558449LPA001GG

Dacă Eudamed nu este complet funcțional, SSP-ul va fi pus la dispoziția publicului la cerere, prin e-mail la adresa SSP@ogt.com.

Informații suplimentare

Pentru informații suplimentare referitoare la produs, vă rugăm să contactați departamentul de asistență tehnică CytoCell. Tel.: +44 (0)1223 294048 E-mail: techsupport@cytoCELL.com Internet: www.ogt.com

Referințe

1. Alliance G, (2010). Chromosomal Abnormalities [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK132134/>.

2. 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. Disponibil la: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/870>.

5. Orphanet: Trisomy 13 [Internet]. www.orpha.net. Disponibil la: <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. În: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Actualizat la 15 februarie 2025. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570597/>.

8. Shankar Kikkeri N, et al., (2023). Turner Syndrome; disponibil la: <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. Disponibil la: <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.

Glosar de simboluri

EN ISO 15223-1:2021 - „Dispozitive medicale - Simboluri care trebuie utilizate cu informațiile care urmează să fie furnizate de producător - Partea 1: Cerințe generale” (© Organizația Internațională pentru Standardizare)		
Simbol	Titlu	Număr/numere de referință
	ro: Producător	5.1.1
	ro: Reprezentant autorizat în Comunitatea Europeană/Uniunea Europeană	5.1.2
	ro: Data de expirare	5.1.4
	ro: Seria de fabricație	5.1.5
	ro: Număr de catalog	5.1.6
	ro: A se feri de lumina solară	5.3.2
	ro: Limită de temperatură	5.3.7
	ro: Consultați instrucțiunile de utilizare	5.4.3
 oqt.com/IFU	ro: Consultați instrucțiunile electronice de utilizare	5.4.3
	ro: Atenție	5.4.4
	ro: Dispozitiv medical pentru diagnostic <i>in vitro</i>	5.5.1
	ro: Conține o cantitate suficientă pentru <n> teste	5.5.5
	ro: Identificator unic de dispozitiv	5.7.10
Simboluri EDMA pentru reactivi și componente IVD, revizuire octombrie 2009		
Simbol	Titlu	Număr/numere de referință
	ro: Conținut (sau conține)	N/A

Brevete și mărci comerciale

CytoCell este o marcă înregistrată a CytoCell Limited.



CytoCell Limited
Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
REGATUL UNIT

Tel.: +44 (0)1223 294048
E-mail: probes@cytoCELL.com
Internet: www.oqt.com



Sysmex Europe SE
Deelböge 19 D
22297 Hamburg
GERMANIA

Internet: www.sysmex-europe.com

Istoricul versiunilor IFU
V001 2026-03-09: Instrucțiuni de utilizare noi pentru Regulamentul (UE) 2017/746