



A Sysmex Group Company



Istruzioni per l'uso (IFU)

RIF: CE-LPA 001-S / CE-LPA 001 /
CE-LPA 001-30 / CE-LPA 001-50

Prenatal Enumeration Probe Kit



SOLO PER USO PROFESSIONALE



ogt.com/IFU

Ulteriori informazioni e altre lingue sono disponibili su sito ogt.com/IFU

Uso previsto

CytoCell® Prenatal Enumeration Probe Kit è un test qualitativo non automatizzato di ibridazione *in situ* a fluorescenza (FISH) utilizzato per rilevare le regioni centromeriche alfa Xp11.1-q11.1, Yp11.1-q11.1 e 18p11.1-q11.1 del cromosoma e le regioni 13q14.2 e 21q22.1 del cromosoma in cellule fissate in soluzione di Carnoy (metanolo/acido acetico in rapporto 3:1) derivate da campioni di liquido amniotico, per la conta dei cromosomi X, Y, 13, 18 e 21 in gravidanze ad alto rischio in cui si sospetta la sindrome di Turner, Patau, Edwards o Down.

Istruzioni per l'uso

Questo dispositivo è ideato come aggiunta ad altri test clinici e di laboratorio in percorsi diagnostici e di cura clinica riconosciuti, come screening ecografico e test biochimici, dove la conoscenza dello stato del numero di copie delle regioni centromeriche alfa Xp11.1-q11.1 e 18p11.1-q11.1 del cromosoma, nonché delle regioni 13q14.2 e 21q22.1 del cromosoma, risulterebbe importante per la gestione del paziente.

Limitazioni

Questo dispositivo è ideato per rilevare materiale cromosomico che comprende le regioni centromeriche coperte dai cloni verdi, arancioni e blu nel componente di Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe, rispettivamente per i cromosomi X, Y e 18. Con questo dispositivo potrebbero non essere rilevati aumenti o perdite genomiche al di fuori di queste regioni, oppure perdite o aumenti parziali di queste regioni.

Questo dispositivo non è inoltre ideato per rilevare materiale cromosomico che include le regioni 13q14.2 e 21q22.1 del cromosoma, coperte dai cloni verdi e arancioni presenti nel componente Prenatal Enumeration Probe 13 e 21. Con questo dispositivo potrebbero non essere rilevati aumenti o perdite genomiche esterne a tali regioni o aumenti o perdite parziali di queste regioni.

Il dispositivo non è destinato a: utilizzo come diagnostica indipendente, companion diagnostic, screening basato sulla popolazione, test vicino al paziente o autodiagnosi. Questo dispositivo non è stato convalidato per tipi di campioni, tipi di malattie o scopi diversi da quelli indicati nell'uso previsto. Questo dispositivo non è stato convalidato per l'uso nel rilevamento di aumenti del numero di copie X e/o Y del cromosoma.

Questo dispositivo è ideato in aggiunta ad altri test diagnostici di laboratorio e l'azione terapeutica non deve essere messa in atto esclusivamente sulla base del risultato FISH.

La refertazione e l'interpretazione dei risultati FISH devono essere eseguiti da personale adeguatamente formato, devono essere coerenti con gli standard professionali della pratica medica e devono prendere in considerazione altri risultati di test, informazioni cliniche e diagnostiche rilevanti.

Questo dispositivo è ideato esclusivamente all'uso professionale in laboratorio.

La mancata aderenza del protocollo può incidere sulle prestazioni e portare a risultati falsi positivi/negativi.

Principi del test

L'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) è una tecnica che consente di rilevare sequenze di DNA su cromosomi in metafase o in nuclei interfasci di campioni citogenetici fissati. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde di DNA in grado di ibridare per cromosomi interi o singole sequenze uniche, e rappresenta un potente strumento in aggiunta all'analisi citogenetica classica. Grazie ai recenti sviluppi, questa preziosa tecnica può ora essere applicata come strumento diagnostico essenziale nell'analisi cromosomica prenatale, ematologica e patologica. Il DNA

bersaglio, dopo fissazione e denaturazione, è disponibile per l'annealing per una sonda di DNA similmente denaturata, marcata con sostanza fluorescente, a sequenza complementare. Terminata l'ibridazione, la sonda di DNA non legata o legata in modo non specifico viene rimossa e il DNA viene colorato con un colorante di contrasto. L'utilizzo della microscopia a fluorescenza permette quindi la visualizzazione della sonda ibridata sul materiale target.

Informazioni sulla sonda

L'analisi citogenetica molecolare svolge un ruolo fondamentale nella valutazione prenatale delle gravidanze ad alto rischio, consentendo l'identificazione accurata di anomalie cromosomiche e la valutazione del rischio di ricorrenza. Le anomalie cromosomiche più comuni sono le aneuploidie, definite come un numero anormale di copie cromosomiche, con individui affetti che in genere presentano trisomia (tre copie di un cromosoma) o monosomia (una sola copia di un cromosoma).¹ Tra le aneuploidie clinicamente significative più note si annoverano le trisomie 13, 18 e 21, nonché la monosomia X. Queste anomalie rappresentano importanti cause di disturbi dello sviluppo ed esiti riproduttivi avversi e sono tra le indicazioni più comuni per la diagnosi prenatale invasiva.²

La trisomia 21 (sindrome di Down), la trisomia autosomica vitale più comune, è caratterizzata da deficit cognitivo, anomalie cardiache congenite e morbidità multisistemica, e rimane un'indicazione chiave per i test genetici prenatali.^{3,4} La trisomia 13 (sindrome di Patau) è caratterizzata da malformazioni cerebrali (oloprosencefalia), dismorfismi facciali, anomalie oculari, polidattilia postassiale, malformazioni viscerali (cardiopatia) e grave ritardo psicomotorio.⁵ La trisomia 18 (sindrome di Edwards) è associata a gravi malformazioni congenite, elevata mortalità perinatale e fenotipi ecografici ben definiti, sottolineando la necessità di un'accurata diagnosi prenatale e di una conferma genetica.^{6,7} La monosomia X (sindrome di Turner), nota anche come sindrome da ipoplasia ovarica congenita, è la più comune anomalia cromosomica sessuale nelle femmine e deriva dall'assenza completa o parziale di un cromosoma X.⁸

La diagnosi prenatale viene offerta nelle gravidanze ad alto rischio, caratterizzate da un aumentato rischio di anomalie cromosomiche come la trisomia 13, 18, 21 e la monosomia X. La FISH è un metodo di citogenetica molecolare convalidato per il rapido rilevamento e conta del numero di copie cromosomiche nei nuclei in interfase. La FISH consente il rilevamento mirato delle aneuploidie comuni e fornisce risultati rapidi a supporto del processo decisionale clinico ed è ampiamente utilizzata nella moderna diagnostica delle aneuploidie, in particolare laddove è richiesta una rapida conferma dello stato del numero di copie cromosomiche.^{9,10,11}

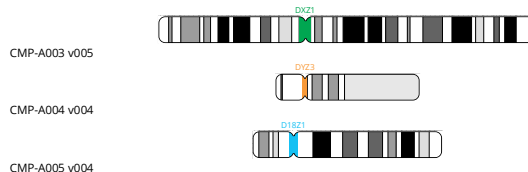
Specifiche della sonda

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Centromero X, Xp11.1 – q11.1 (DXZ1) verde

Centromero Y, Yp11.1 – q11.1 (DYZ3) arancione

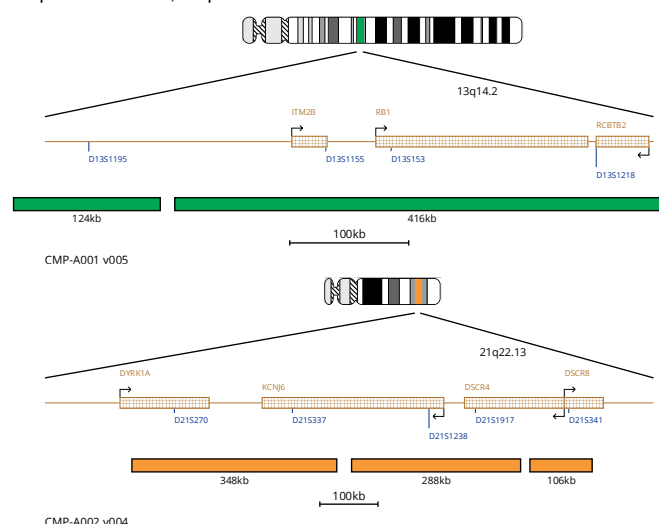
Centromero 18, 18p11.1 – q11.1 (D18Z1) blu



LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Sequenza unica 13, 13q14.2 verde

Sequenza unica 21, 21q22.13 arancione



Il kit contiene due componenti della sonda per due ibridazioni separate.

LPA002

Il componente della sonda LPA002 è una miscela di sonde di DNA fluorescenti marcate direttamente nei colori verde e arancione e blu:

- La sonda verde DXZ1 marca direttamente le sequenze di DNA satellite alfa nella regione DXZ1 del cromosoma X.
- La sonda arancione DYZ3 marca direttamente le sequenze di DNA satellite alfa nella regione DYZ3 del cromosoma Y.
- La sonda blu D18Z1 marca direttamente le sequenze di DNA satellite alfa nella regione D18Z1 del cromosoma 18.

LPA003

Il componente della sonda LPA003 è una miscela di sonde di DNA fluorescenti marcate direttamente nei colori verde e arancione contenenti sequenze uniche:

- La miscela di sonde verdi contiene una sonda da 124 kb e una sonda da 416 kb nella regione 13q14.2 che comprende i geni ITM2B, RB1 e RCBTB2, inclusi i marcatori D13S1195, D13S1155, D13S153 e D13S1218.
- La miscela di sonde arancioni contiene una sonda da 348 kb, una da 288 kb e una da 106 kb nella regione 21q22.13, che comprende i geni DYRK1A, KCNJ6, DSCR4 e DSCR8, inclusi i marcatori D21S270, D21S337, D21S1238, D21S1917 e D21S341.

Materiali forniti

Sonda: 50 µL per flaconcino nel kit da 5 test, 100 µL per flaconcino nel kit da 10 test, 300 µL per flaconcino nel kit da 30 test, 500 µL per flaconcino nel kit da 50 test.

I componenti della sonda sono forniti premiscelati in soluzione di ibridazione <65% formammide; <20 mg di solfato di destrano; <10% di soluzione salina-citrato di sodio 20x (SSC)] e sono pronti all'uso.

Colorante da contrasto: 150 µL per flaconcino nel kit da 5 test, 500 µL per flaconcino nel kit da 10 test, 1.000 µL per flaconcino nel kit da 30 test o 1.200 µL per flaconcino nel kit da 50 test.

Il colorante da contrasto è DAPI Antifade ES [0,125 µg/mL di DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolo) in mezzo di montaggio a base di glicerolo].

Avvertenze e misure precauzionali

- Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale di laboratorio.
- Gli operatori devono assicurarsi di consultare e seguire in ogni momento le Istruzioni per l'uso corrette e più aggiornate.
- Le miscele di sonda contengono formammide, una sostanza teratogena; non respirare fumi ed evitare il contatto con la pelle. Maneggiare con cura; indossare guanti e un camice da laboratorio.
- Maneggiare con cura DAPI; indossare guanti e un camice da laboratorio.
- Non utilizzare il prodotto se il/i flaconcino/i sono danneggiati o se il contenuto del flaconcino risulta compromesso in qualsiasi modo.
- Attenersi ai regolamenti sullo smaltimento per la propria località insieme alle raccomandazioni presenti nella Scheda tecnica di sicurezza per stabilire lo smaltimento sicuro del prodotto. Questo vale anche per il contenuto danneggiato del kit di test.
- Smaltire tutti i reagenti usati e qualsiasi altro materiale monouso contaminato seguendo le procedure previste per i rifiuti infettivi o potenzialmente infettivi. È responsabilità di ciascun laboratorio gestire i rifiuti solidi e liquidi in base alla loro natura e al grado di pericolosità, e trattarli e smaltirli (o farli trattare e smaltire) in conformità con le normative applicabili.
- Gli operatori devono essere in grado di distinguere i colori blu, arancione e verde.
- La mancata aderenza al protocollo descritto, alle attrezzature e ai reagenti può incidere sulle prestazioni e portare a risultati falsi positivi/negativi.
- La sonda non deve essere diluita o mescolata con altre sonde.
- Il mancato utilizzo di 10 µL di sonda durante lo stadio di pre-denaturazione del protocollo può incidere sulle prestazioni e portare a risultati falsi positivi/negativi.
- Tutti i prodotti devono essere convalidati prima dell'uso.
- I controlli interni devono essere effettuati utilizzando popolazioni cellulari non affette dalla patologia nei campioni oggetto dell'analisi.
- Occorre adottare precauzioni per evitare la contaminazione tra i flaconcini contenenti LPA002 e LPA003.

Definizioni della temperatura

- 20 °C/congelato/nel congelatore: da -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): da +15 °C a +25 °C

Conservazione e utilizzo

 Conservare il kit in congelatore a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta del kit. Conservare i flaconcini della sonda e del colorante di contrasto al buio.

 La sonda FISH, il colorante da contrasto DAPI Antifade ES e la soluzione di ibridazione rimangono stabili durante i cicli di congelamento e scongelamento che si verificano durante il normale utilizzo (dove un ciclo consiste nella rimozione del flaconcino dal congelatore e nel suo successivo riposizionamento). **Sonde FISH:** 5 cicli per il kit da 5 test, 10 cicli per il kit da 10 test, 30 cicli per il kit da 30 test, 50 cicli per il kit da 50 test.

Colorante da contrasto: 10 cicli per il kit da 5 test, 20 cicli per il kit da 10 test, 60 cicli per il kit da 30 test e 100 cicli per il kit da 50 test. L'esposizione alla luce dovrebbe essere ridotta al minimo ed evitata ove possibile. Conservare i componenti nel contenitore a prova di luce fornito. I componenti utilizzati e conservati in condizioni diverse da quelle indicate sull'etichetta potrebbero non funzionare come previsto e potrebbero influire negativamente sui risultati del test. È necessario intraprendere tutti gli sforzi per limitare l'esposizione alla luce.

Apparecchiature e materiali necessari ma non forniti

È necessario utilizzare apparecchiature calibrate:

- Piastra riscaldante (con una piastra solida e controllo accurato della temperatura fino a 80 °C)
- Micropipette a volume calibrato variabile compreso tra 1 µL - 200 µL
- Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 37 °C e 72 °C
- Provette da microcentrifuga (0,5 mL)

- Microscopio a fluorescenza (riferirsi alla sezione Configurazione ottimale del microscopio a fluorescenza)
- Microscopio a contrasto di fase
- Contenitori di Coplin in plastica, ceramica o vetro resistente al calore
- Pinzette
- Misuratore calibrato del pH (o strisce indicatrici del pH capace di misurare pH da 6,5 a 8,0)
- Contenitore umidificato
- Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza
- Centrifuga da banco
- Vetrini da microscopia
- Coprioggetto 24x24 mm
- Timer
- Incubatore a 37 °C
- Colla per vetrini
- Miscelatore a vortice
- Cilindri graduati
- Agitatore magnetico
- Termometro calibrato

Apparecchiature opzionali non fornite

- Stufa per asciugatura citogenetica

Reagenti necessari ma non forniti

- Soluzione 20x di citrato salino di sodio (SSC)
- 100% etanolo
- Tween-20
- 1M sodio idrossido (NaOH)
- 1M acido idroclorico (HCl)
- Acqua purificata

Configurazione ottimale del microscopio a fluorescenza

Per una visualizzazione ottimale della sonda si raccomanda di utilizzare una lampada a mercurio da 100 watt ed obiettivi plan apochromat 60/63x e 100x. I fluorofori utilizzati in questo kit della sonda ecciteranno ed emetteranno alle seguenti lunghezze d'onda:

Fluoroforo	Eccitazione _{max} [nm]	Emissione _{max} [nm]
Blu	418	467
Verde	495	521
Arancione	551	572

Assicurare un'eccitazione appropriata e assicurarsi che i filtri di emissione che coprono le lunghezze d'onda elencate sopra siano adatti al microscopio.

Il filtro bandpass triplo DAPI/FITC/TRITC è ottimale per visualizzare simultaneamente i fluorofori verde e arancione, nonché il colorante da contrasto. Il fluoroforo blu è specifico per lo spettro Blu e DEAC (è necessario un filtro bandpass singolo Blu o DEAC).

Controllare il microscopio a fluorescenza prima dell'uso per garantire che stia funzionando correttamente. Utilizzare un olio a immersione adatto alla microscopia a fluorescenza e formulato per bassa autofluorescenza. Evitare di mescolare DAPI Antifade con l'olio a immersione per microscopio poiché questo oscurerà i segnali. Seguire le raccomandazioni del fabbricante in relazione alla vita della lampada e all'età dei filtri.

Preparazione del campione

Il kit è progettato per l'uso su cellule fissate con soluzione di Carnoy (metanolo/acido acetico in rapporto 3:1) derivate da campioni di liquido amniotico, per la conta dei cromosomi X, Y, 13, 18 e 21 in pazienti in gravidanze ad alto rischio in cui si sospetta la sindrome di Turner, di Patau, di Edwards o di Down, che vengono preparate secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituto. Il prelievo del campione di liquido amniotico deve essere eseguito secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituzione. I campioni che appaiono con tracce di sangue o marroni non devono essere utilizzati, poiché potrebbero contenere sangue materno e portare a risultati falsi. Stendere i campioni essiccati su vetrini da microscopia secondo le procedure citogenetiche standard. L'AGT *Cytogenetics Laboratory Manual*, contiene raccomandazioni per il prelievo, la coltura, la raccolta di esemplari e per la realizzazione di vetrini.¹²

Preparazione della soluzione

Soluzioni di etanolo

Diluire 100% etanolo con acqua purificata utilizzando i seguenti rapporti e miscelare accuratamente:

- 70% etanolo - 7 parti 100% etanolo per 3 parti di acqua purificata
- 85% etanolo - 8,5 parti 100% etanolo per 1,5 parti di acqua purificata

Conservare le soluzioni fino a 6 mesi a temperatura ambiente in un contenitore a chiusura ermetica.

Soluzione 2xSSC

Diluire 1 parte di soluzione 20xSSC con 9 parti di acqua purificata e miscelare in modo accurato. Controllare il pH e correggere a pH 7,0 mediante NaOH oppure HCl come richiesto. Conservare la soluzione fino a 4 settimane a temperatura ambiente in un contenitore a chiusura ermetica.

Soluzione 0,4xSSC

Diluire 1 parte di soluzione 20xSSC con 49 parti di acqua purificata e miscelare in modo accurato. Controllare il pH e correggere a pH 7,0 mediante NaOH oppure HCl come richiesto. Conservare la soluzione fino a 4 settimane a temperatura ambiente in un contenitore a chiusura ermetica.

Soluzione 2xSSC, 0,05% Tween-20

Diluire 1 parte di soluzione 20xSSC con 9 parti di acqua purificata. Aggiungere 5 µL di Tween-20 per 10 mL e miscelare accuratamente. Controllare il pH e correggere a pH 7,0 mediante NaOH oppure HCl come richiesto. Conservare la soluzione fino a 4 settimane a temperatura ambiente in un contenitore a chiusura ermetica.

Protocollo FISH

(Nota: durante l'intera procedura limitare l'esposizione della sonda alle luci di laboratorio)

Preparazione del vetrino

- 1. Caricare il campione cellulare su un vetrino da microscopia. Lasciare asciugare il vetrino. **(Opzionale, se si utilizza una stufa per asciugatura citogenetica:** La camera deve essere azionata a un'umidità di circa 25 °C e al 50% di umidità per una caricatura del campione cellulare ottimale. Se non è disponibile una stufa per asciugatura citogenetica, utilizzare una cappa fumaria come alternativa).
- 2. Immergere il vetrino in 2xSSC per 2 minuti a temperatura ambiente (TA) senza agitazione.
- 3. Disidratare in una serie di etanolo (70%, 85% e 100%), ciascuna per 2 minuti a TA.
- 4. Lasciare asciugare il vetrino.

Pre-denaturazione

- 5. Rimuovere la sonda dal congelatore e lasciarla riscaldare a TA. Centrifugare brevemente le provette prima dell'uso.
- 6. Assicurarsi che la soluzione della sonda sia miscelata in modo uniforme mediante una pipetta.
- 7. Pipettare 10 µL di sonda per test e inserirla in una provetta da microcentrifuga. Riporre velocemente la sonda rimanente nel congelatore.
- 8. Posizionare la sonda e il vetrino del campione a preriscaldare su una piastra riscaldante a 37 °C (+/- 1 °C) per 5 minuti.
- 9. Caricare 10 µL di miscela della sonda sul campione cellulare e coprire delicatamente con un coprioggetto. Sigillare con soluzione collante gommosa e far asciugare completamente.

Denaturazione

- 10. Denaturare il campione e la sonda contemporaneamente riscaldando il vetrino su una piastra riscaldante a 75 °C (+/- 1 °C) per 2 minuti.

Ibridazione

- 11. Posizionare il vetrino su un contenitore umido a prova di luce a 37 °C (+/- 1 °C) durante la notte.

Lavaggi post-ibridazione

- 12. Rimuovere il DAPI dal congelatore e lasciarlo riscaldare a TA.
- 13. Rimuovere attentamente il coprioggetto e tutte le tracce di colla.
- 14. Lavare il vetrino in 0,4xSSC (pH 7,0) a 72 °C (+/- 1 °C) per 2 minuti, senza agitazione.
- 15. Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
- 16. Scolare i vetrini e applicare 10 µL di DAPI antifade su ciascun campione.
- 17. Coprire con un vetrino coprioggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
- 18. Analizzare con un microscopio a fluorescenza (vedere **Configurazione ottimale del microscopio a fluorescenza**).

Raccomandazioni per l'uso

- 1. L'eccessivo riscaldamento o l'invecchiamento dei vetrini potrebbe ridurre la fluorescenza del segnale.
- 2. Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti differenti rispetto a quelli forniti o raccomandati da Cytocell Ltd.
- 3. Utilizzare un termometro calibrato per la misurazione delle temperature delle soluzioni, dei bagni termostati e degli incubatori, in quanto queste temperature sono di fondamentale importanza per la performance ottimale del prodotto.
- 4. Le concentrazioni del lavaggio (stringenza), il pH e la temperatura sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame non specifico della sonda e condizioni di stringenza troppo elevate possono condurre alla mancanza del segnale.
- 5. La denaturazione incompleta può tradursi in una mancanza del segnale, mentre una denaturazione eccessiva può anche tradursi in un legame non specifico.
- 6. Come esito di una sovra-ibridazione, possono verificarsi segnali aggiuntivi o imprevisti.
- 7. Prima di utilizzare il test per obiettivi diagnostici, è necessario ottimizzare il protocollo per i propri campioni.
- 8. Condizioni sub-ottimali possono avere come esito un legame non specifico che può essere interpretato erroneamente come segnale di sonda.

Interpretazione dei risultati

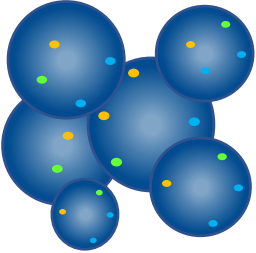
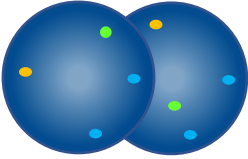
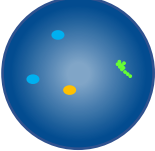
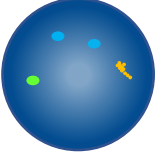
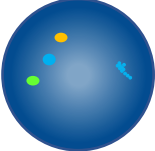
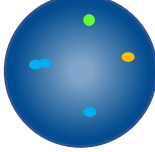
Valutazione della qualità dei vetrini

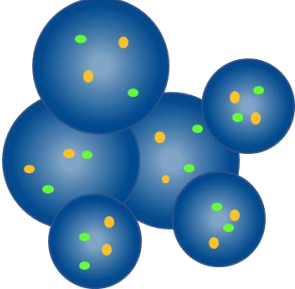
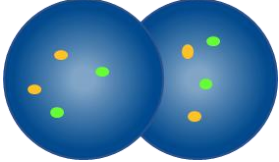
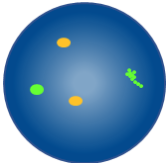
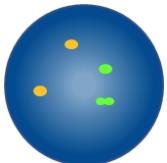
Il vetrino non deve essere analizzato se:

- I segnali sono troppo deboli da analizzare in filtri singoli; al fine di procedere con l'analisi, i segnali devono apparire brillanti, distinti e facilmente valutabili
- Vi sono numerose cellule raggruppate/sovrapposte che impediscono l'analisi
- Il >50% delle cellule non è ibridato
- Vi è un eccesso di particelle fluorescenti tra le cellule e/o una foschia fluorescente che interferisce con i segnali; in vetrini ottimali lo sfondo dovrebbe apparire scuro o nero e pulito
- I confini del nucleo cellulare non possono essere distinti e non sono intatti

Linee guida di analisi

- Ogni campione deve essere analizzato e interpretato da due analisti. Eventuali discrepanze devono essere risolte mediante valutazione da parte di un terzo analista
- Ciascun analista deve essere adeguatamente qualificato secondo gli standard nazionali riconosciuti
- Ciascun analista deve valutare in modo indipendente un numero sufficiente di nuclei da ciascun campione, in modo che i punteggi combinati degli analisti soddisfino i criteri minimi specificati dalle linee guida istituzionali, regionali o nazionali. Il primo analista deve iniziare l'analisi dal lato sinistro del vetrino e il secondo analista dal lato destro
- Ciascun analista deve documentare i propri risultati in fogli separati
- Analizzare solo nuclei intatti, non sovrapposti o affollati o nuclei coperti da detriti citoplasmatici o da un elevato grado di autofluorescenza
- Evitare aree dove vi è un eccesso di detriti citoplasmatici o ibridazione non specifica
- L'intensità del segnale può variare, anche con un singolo nucleo. In tali casi, utilizzare filtri singoli e/o correggere il piano focale
- In condizioni sub-ottimali, i segnali possono apparire confusi. Se due segnali dello stesso colore si toccano o la distanza tra di loro non è maggiore di due larghezze di segnale, o quando vi è un filamento debole che connette i due segnali, contare come un segnale
- In caso di dubbio se la cellula sia analizzabile o meno, non effettuare l'analisi

Linee guida di analisi – LPA002	
	Non contare - nuclei troppo vicini l'un l'altro per determinare confini
	Non contare nuclei che si sovrappongono - tutte le aree di entrambi i nuclei non sono visibili
	Contare come un segnale verde, un segnale arancione e due segnali blu - il segnale verde è diffuso
	Contare come un segnale verde, un segnale arancione e due segnali blu - il segnale arancione è diffuso
	Contare come un segnale verde, un segnale arancione e due segnali blu - uno dei due segnali blu è diffuso
	Contare come un segnale verde, un segnale arancione e due segnali blu - lo spazio nel segnale blu è inferiore a due ampiezze della sonda

Linee guida di analisi - LPA003	
	Non contare - nuclei troppo vicini l'un l'altro per determinare confini
	Non contare nuclei che si sovrappongono - tutte le aree di entrambi i nuclei non sono visibili
	Contare come due segnali arancioni e due verdi - uno dei due segnali verdi è diffuso
	Contare come due segnali arancioni e due verdi - lo spazio in un segnale verde è minore di due ampiezze di segnale

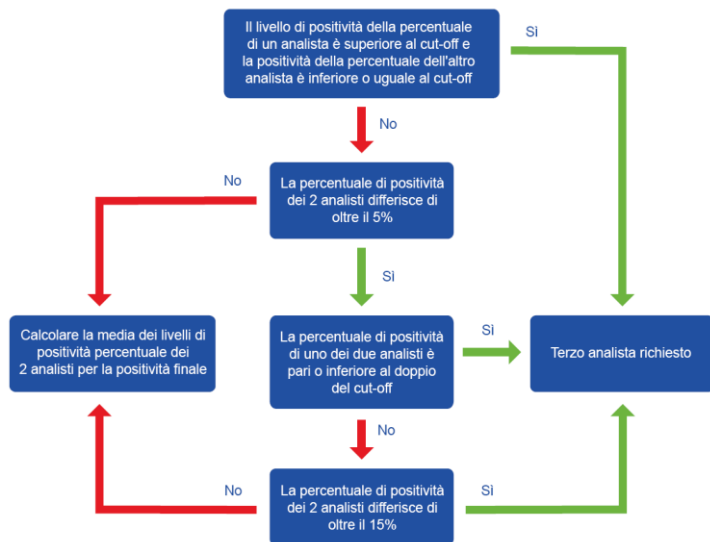
Requisiti per il terzo analista

A seconda del numero di nuclei anomali che ciascun analista ha visualizzato, potrebbe essere necessario un terzo analista. Il terzo analista analizzerà lo stesso numero di nuclei dei primi due analisti, secondo quanto specificato dalle linee guida istituzionali, regionali o nazionali. Le regole per un terzo analista sono descritte in dettaglio nel testo e nel diagramma di flusso riportati sotto.

Un terzo analista è necessario se:

- La percentuale di positività di uno degli analisti è superiore al cut off, mentre la percentuale di positività dell'altro analista è inferiore o uguale al cut off.
- La percentuale di positività dei due analisti differisce di oltre il 5% e la percentuale di positività di almeno uno dei due analisti è pari o inferiore al doppio del cut off.
- La percentuale di positività riportata dai due analisti differisce di oltre il 15%.

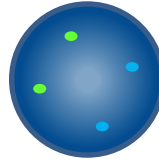
Dei tre punteggi ottenuti, verrà calcolata la media dei due valori percentuali positivi più vicini per ottenere il valore finale di positività. Se i 3 punteggi sono equidistanti, allora deve essere utilizzato il valore di positività mediano.



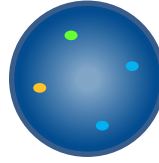
Risultati attesi

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Modelli di segnale normale atteso

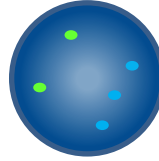


In una cellula femminile normale, sono attesi due segnali verdi e due blu (2V2B).

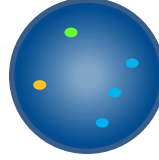


In una cellula maschile normale, sono attesi un segnale verde, uno arancione e due blu (1V1A2B).

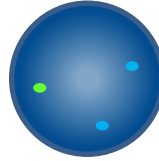
Modelli di segnale anomalo atteso



In una cellula femminile con trisomia 18, il modello di segnale atteso sarà costituito da due segnali verdi e tre segnali blu (2V3B).



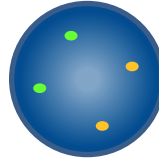
In una cellula maschile con trisomia 18, il modello di segnale atteso sarà un segnale verde, un segnale arancione e tre segnali blu (1V1A3B).



In una cellula affetta da sindrome di Turner, il modello di segnale atteso sarà un segnale verde e due segnali blu (1V2B).

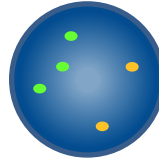
LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Modello di segnale normale atteso

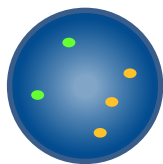


In una cellula normale, sono attesi due segnali verdi e due arancioni (2V2A).

Modelli di segnale anomalo atteso



In una cellula con trisomia 13, sono attesi tre segnali verdi e due segnali arancioni (3V2A).



In una cellula con trisomia 21, sono attesi due segnali verdi e tre segnali arancioni (2V3A).

Altri modelli di segnale sono possibili in esemplari aneuploidi/non bilanciati.

Interferenze rilevanti/sostanze interferenti note

Nessuna interferenza rilevante/sostanza interferente nota.

Reattività incrociata nota

La sonda DXZ1 può mostrare un'ibridazione incrociata ai centromeri dei cromosomi 1, 11, 17 e Y.

La sonda DY23 può mostrare un'ibridazione incrociata ai centromeri dei cromosomi 13, 14, 15, 20, 21, 22 e X.

La sonda D18Z1 può mostrare ibridazione incrociata con i centromeri dei cromosomi 2, 4, 8, 9, 13, 14, 15, 20, 21 e 22.

Segnalazione di incidenti gravi

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e nei paesi con un regime normativo identico (Regolamento (UE) 2017/746 sui dispositivi medico-diagnostici *in vitro*); se, durante l'uso di questo dispositivo o a seguito del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, segnalarlo al fabbricante e all'autorità nazionale competente.

Per incidenti gravi verificatisi in altri Paesi, segnalarli al fabbricante e, se del caso, all'autorità nazionale competente.

Contatto per la vigilanza del fabbricante: vigilance@ogt.com

Per un elenco dei punti di contatto di vigilanza delle autorità nazionali competenti dell'UE consultare la pagina web:

https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

Caratteristiche specifiche di prestazione

Specificità analitica

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

La specificità analitica è definita come percentuale di segnali che si ibridano al locus corretto e nessun'altra localizzazione. Sono stati analizzati 4 loci cromosomici in ciascuna delle 20 cellule in metafase provenienti da 5 campioni, ottenendo 100 punti dati per ciascun cromosoma X e Y e 200 punti dati per il cromosoma 18. È stata mappata la localizzazione di ciascuna sonda ibridata ed è stato registrato il numero di segnali FISH di cromosomi in metafase che si sono ibridati al locus corretto.

La specificità analitica di ciascuna sonda nel kit è stata calcolata come il numero di segnali FISH di cromosomi in metafase che si sono ibridati al locus corretto diviso per il numero totale di segnali FISH ibridati di cromosomi in metafase. Tale risultato è stato espresso come percentuale con un intervallo di confidenza del 95%.

Tavola 1. Specificità analitica per LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Target	Numero di cromosomi in metafase ibridati	Numero di loci correttamente ibridati	Specificità analitica	Intervallo di confidenza del 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

La specificità analitica è definita come percentuale di segnali che si ibridano al locus corretto e nessun'altra localizzazione. Sono stati analizzati 4 loci cromosomici in ciascuna delle 20 cellule in metafase provenienti da 5 campioni, ottenendo 200 punti dati per ciascun cromosoma 13 e 21. È stata mappata la localizzazione di ciascuna sonda ibridata ed è stato registrato il numero di segnali FISH di cromosomi in metafase che si sono ibridati al locus corretto.

La specificità analitica di ciascuna sonda nel kit è stata calcolata come il numero di segnali FISH di cromosomi in metafase che si sono ibridati al locus corretto diviso per il numero totale di segnali FISH ibridati di cromosomi in metafase. Tale risultato è stato espresso come percentuale con un intervallo di confidenza del 95%.

Tavola 2. Specificità analitica per LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Target	Numero di cromosomi in metafase ibridati	Numero di loci correttamente ibridati	Specificità analitica	Intervallo di confidenza del 95%
13q14.2	200	200	100%	98,12%-100%
21q22.1	200	200	100%	98,12%-100%

Sensibilità analitica

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

La sensibilità analitica è la percentuale di cellule interfase a cui è possibile fornire un punteggio con il modello di segnale normale atteso. Sono state analizzate un minimo di 50 cellule in interfase per ciascuna delle 25 sospensioni cellulari fissate, ottenute da campioni di liquido amniotico di maschi con cariotipo normale e di 25 femmine con cariotipo normale e corredo cromosomico 18 normale, per un totale di almeno 2.500 nuclei valutati. I dati relativi alla sensibilità sono stati analizzati in base alla percentuale di cellule che mostra un modello di segnale atteso normale ed espressi come percentuale con un intervallo di confidenza del 95%.

Tavola 3. Sensibilità analitica per LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Tipo di campione	Criteri di sensibilità	Risultati di sensibilità
Liquido amniotico	>95%	95,99% (95,15-96,69%)

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

La sensibilità analitica è la percentuale di cellule interfase a cui è possibile fornire un punteggio con il modello di segnale normale atteso. Sono state analizzate un minimo di 50 cellule in interfase per ciascuna delle 25 sospensioni cellulari fissate, ottenute da campioni di liquido amniotico di maschi o femmine con cariotipo normale e corredo cromosomico 13 e 21 normale, per un totale di almeno 1.250 nuclei valutati per ogni tipo di campione. I dati relativi alla sensibilità sono stati analizzati in base alla percentuale di cellule che mostra un modello di segnale atteso normale ed espressi come percentuale con un intervallo di confidenza del 95%.

Tavola 4. Sensibilità analitica per LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Tipo di campione	Criteri di sensibilità	Risultati di sensibilità
Liquido amniotico	>95%	96,24% (94,84-97,64%)

Caratterizzazione dei valori normali di cut off

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Il cut off normale è definito come la percentuale di cellule che esibiscono un modello di segnale falso positivo a cui un individuo sarebbe considerato normale e non coerente con una diagnosi clinica. Sono state analizzate un minimo di 50 cellule in interfase per ciascuna delle 25 sospensioni cellulari fissate, ottenute da campioni di liquido amniotico di maschi con cariotipo normale e di 25 femmine con cariotipo normale e corredo cromosomico 18 normale, per un totale di almeno 2.500 nuclei valutati.

Il valore di cut off è stato determinato utilizzando la funzione β -inversa (BETAINV) in MS Excel. È stato calcolato come la percentuale di cellule in interfase che mostra un modello di segnale falso positivo utilizzando il limite superiore di un intervallo unilaterale di confidenza del 95% della distribuzione binomiale in un campione normale di pazienti.

Tavola 5. Caratterizzazione dei valori normali di cut off per LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Tipo di campione	Modello di segnale	Risultati di cut off
Liquido amniotico	1V1A3B	11,62%
	2V3B	8,97%
	1V2B	13,98%

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Il cut off normale è definito come la percentuale di cellule che esibiscono un modello di segnale falso positivo a cui un individuo sarebbe considerato normale e non coerente con una diagnosi clinica. Sono state analizzate un minimo di 50 cellule in interfase per ciascuna sospensione di cellule del liquido amniotico proveniente da 25 soggetti maschi o femmine con cariotipo normale, ottenendo così un minimo di 1.250 nuclei valutati per ciascun tipo di campione.

Il valore di cut off è stato determinato utilizzando la funzione β -inversa (BETAINV) in MS Excel. È stato calcolato come la percentuale di cellule in interfase che mostra un modello di segnale falso positivo utilizzando il limite superiore di un intervallo unilaterale di confidenza del 95% della distribuzione binomiale in un campione normale di pazienti.

Tavola 6. Caratterizzazione dei valori normali di cut off per LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Tipo di campione	Modello di segnale	Risultati di cut off
Liquido amniotico	2V3A	8,97%
	3V2A	

I laboratori devono verificare i valori di cut off utilizzando i propri dati.^{13,14}

Precisione

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

La precisione di questo prodotto è stata misurata in termini di precisione intra-giorno (sample-to-sample), precisione inter-giorno (day-to-day) e precisione per sito singolo inter-lotto (lot-to-lot).

Per valutare la precisione di questo prodotto sono stati utilizzati 3 campioni: 1 campione di liquido amniotico di maschio normale, classificato come XY e con un

corredo cromosomico 18 normale, 1 campione di liquido amniotico di femmina normale, classificato come XX e con un corredo cromosomico 18 normale, e 1 campione di liquido amniotico di femmina debolmente positivo per trisomia 18.

La precisione intra-giorno e inter-giorno è stata valutata testando i campioni in triplice copia nell'arco di 10 giorni non consecutivi. La precisione tra i lotti è stata valutata testando 3 lotti di prodotto indipendenti in triplice copia utilizzando gli stessi campioni. I risultati sono stati espressi come accordo complessivo con la classificazione attesa (positiva o negativa).

Tavola 7. Riproducibilità e precisione per LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Variabile	Tipo di campione	Accordo
Intra-giorno	Liquido amniotico di femmina negativo	100,0%
	Liquido amniotico di femmina con trisomia 18	90,0%
Inter-giorno	Liquido amniotico di femmina negativo	100,0%
	Liquido amniotico di femmina con trisomia 18	90,0%
	Liquido amniotico di maschio negativo	100,0%
Inter-lotto	Liquido amniotico di femmina negativo	100,0%
	Liquido amniotico di femmina con trisomia 18	100,0%
	Liquido amniotico di maschio negativo	100,0%

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

La precisione di questo prodotto è stata misurata in termini di precisione intra-giorno (sample-to-sample), precisione inter-giorno (day-to-day) e precisione per sito singolo inter-lotto (lot-to-lot).

Per valutare la precisione di questo prodotto sono stati utilizzati 3 campioni: 1 campione di liquido amniotico normale, con un corredo cromosomico 13 e 21 normale, 1 campione di liquido amniotico debolmente positivo per trisomia 13, e 1 campione di liquido amniotico debolmente positivo per trisomia 21.

La precisione intra-giorno e inter-giorno è stata valutata testando i campioni in triplice copia nell'arco di 10 giorni non consecutivi. La precisione tra i lotti è stata valutata testando 3 lotti di prodotto indipendenti in triplice copia utilizzando gli stessi campioni. I risultati sono stati espressi come accordo complessivo con la classificazione attesa (positiva o negativa).

Tavola 8. Riproducibilità e precisione per LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Variabile	Tipo di campione	Accordo
Precisione intra-giorno e inter-giorno	Liquido amniotico negativo	100,0%
	Liquido amniotico debolmente positivo per trisomia 13	100,0%
	Liquido amniotico debolmente positivo per trisomia 21	96,7%
Inter-lotto	Liquido amniotico negativo	88,9%
	Liquido amniotico debolmente positivo per trisomia 13	100,0%
	Liquido amniotico debolmente positivo per trisomia 21	100,0%

Prestazione clinica

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Per garantire che Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe rilevi i riarrangiamenti desiderati, la prestazione clinica è stata stabilita in uno studio su campioni rappresentativi della popolazione a cui il prodotto è destinato: Materiale residuo fissato con metanolo/acido acetico in rapporto 3:1, proveniente da campioni di liquido amniotico prenatale. La dimensione dei campioni utilizzata per lo studio era composto da 71 campioni, di cui 3 positivi alla trisomia 18, 2 positivi alla monosomia X e 66 negativi. Tutti i campioni sono stati identificati e randomizzati per impedire il bias di analisi. I risultati sono stati confrontati allo stato noto del campione. La sonda ha identificato correttamente lo stato dei campioni in tutti i casi.

I risultati di tali test sono stati analizzati al fine di fornire la sensibilità clinica, la specificità clinica e il valore del tasso di falsi positivi (FPR) per segnali positivi, utilizzando un approccio unidimensionale.

Tavola 9. Prestazione clinica per Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Variabile	Risultato
Sensibilità clinica (tasso di veri positivi, TPR)	100,0%
Specificità clinica (tasso di veri negativi, TNR)	100,0%
Tasso di falsi positivi (FPR) = 1 - Specificità	0,0%

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Per garantire che Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe rilevi i riarrangiamenti desiderati, la prestazione clinica è stata stabilita attraverso tre studi su campioni rappresentativi della popolazione a cui il prodotto è destinato: Materiale residuo fissato con metanolo/acido acetico in rapporto 3:1, proveniente da campioni di liquido amniotico prenatale. Il dimensione dei campioni utilizzata per lo studio era composto da 172 campioni, con una popolazione di 15 positivi alla trisomia 13 e 157 negativi alla trisomia 13, per un totale di 109 positivi alla trisomia 21 e 63 negativi alla trisomia 21. I risultati sono stati confrontati allo stato noto del campione. La sonda ha identificato correttamente lo stato dei campioni in tutti i casi.

I risultati di tali test sono stati analizzati al fine di fornire la sensibilità clinica, la specificità clinica e il valore del tasso di falsi positivi (FPR) per segnali positivi, utilizzando un approccio unidimensionale.

Tavola 10. Prestazione clinica per Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Variabile	Risultato
Sensibilità clinica (tasso di veri positivi, TPR)	100,0%
Specificità clinica (tasso di veri negativi, TNR)	100,0%
Tasso di falsi positivi (FPR) = 1 - Specificità	0,0%

Riepilogo della sicurezza e delle prestazioni (SSP)

Il protocollo SSP deve essere reso disponibile al pubblico tramite la banca dati europea sui dispositivi medici (Eudamed), dove è collegato al codice UDI-DI di base.

URL di Eudamed: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Codice identificativo univoco (UDI-DI) di base: 50558449LPA001GG

Se Eudamed non è pienamente funzionante, l'SSP sarà reso disponibile al pubblico su richiesta tramite e-mail SSP@ogt.com.

Informazioni aggiuntive

Per informazioni aggiuntive sul prodotto contattare il Dipartimento di Assistenza Tecnica CytoCell.

Tel: +44 (0)1223 294048

E-mail: techsupport@cytoCELL.com

Sito web: www.ogt.com

Bibliografia

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. Available from: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/870>.
5. Orphanet: Trisomy 13 [Internet]. www.orpha.net. Available from: <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. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan–. Updated 2025 Feb 15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570597/>.
8. Shankar Kikkeri N, et al., (2023). Turner Syndrome; Available from: <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. Available from: <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.

EN ISO 15223-1:2021 - “Dispositivi medici - Simboli da utilizzare con le informazioni da fornire dal fabbricante - Parte 1: Requisiti generali” (© Organizzazione internazionale per la standardizzazione)		
Simbolo	Titolo	Numero/i di riferimento
	it: Fabbricante	5.1.1
	it: Rappresentante autorizzato nella Comunità europea/Unione europea	5.1.2
	it: Data di scadenza	5.1.4
	it: Codice del lotto	5.1.5
	it: Numero di catalogo	5.1.6
	it: Tenere lontano dalla luce	5.3.2
	it: Limite di temperatura	5.3.7
	it: Consultare le istruzioni per l'uso	5.4.3
 ogt.com/IFU	it: Consultare le istruzioni per l'uso in formato digitale	5.4.3
	it: Attenzione	5.4.4
	it: Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>	5.5.1
	it: Contenuto per <n> test	5.5.5
	it: Identificatore univoco del dispositivo	5.7.10
Simboli EDMA per reagenti e componenti IVD, revisione ottobre 2009		
Simbolo	Titolo	Numero/i di riferimento
	it: Contenuti (o contiene)	ND

Brevetti e marchi registrati
CytoCell è un marchio registrato di Cytocell Limited.



Cytocell Limited
Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
REGNO UNITO

Tel: +44 (0)1223 294048
E-mail: probes@cytocell.com
Sito web: www.ogt.com



Sysmex Europe SE
Deelböge 19 D
22297 Hamburg
GERMANIA

Sito web: www.sysmex-europe.com

Cronologia delle versioni delle istruzioni per l'uso (IFU)
V001 2026-03-09: Nuove istruzioni per l'uso (IFU) relative al Regolamento (UE) 2017/746