



A Sysmex Group Company



Mode d'emploi

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

Prenatal Enumeration Probe Kit



RÉSERVÉ À UNE UTILISATION PROFESSIONNELLE



ogt.com/IFU

Informations supplémentaires et autres langues disponibles sur
ogt.com/IFU

Utilisation prévue

Le CytoCell® Prenatal Enumeration Probe Kit est un test qualitatif non automatisé, d'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) utilisé pour détecter les régions centromériques chromosomiques alpha Xp11.1-q11.1, Yp11.1-q11.1 et 18p11.1-q11.1, ainsi que les régions chromosomiques 13q14.2 et 21q22.1 dans des cellules fixées par une solution de Carnoy (3:1 méthanol/acide acétique) provenant d'échantillons de liquide amniotique, pour l'énumération des chromosomes X, Y, 13, 18 et 21 dans le cadre de grossesses présentant un risque élevé où un syndrome de Turner, de Patau, d'Edwards ou de Down est suspecté.

Indications d'emploi

Ce dispositif est conçu comme complément à d'autres tests cliniques et en laboratoire dans le cadre d'un parcours diagnostique et clinique reconnu, tel que le dépistage échographique et les tests biochimiques, pour lesquels il est important de connaître le nombre de copies des régions centromériques chromosomiques alpha Xp11.1-q11.1 et 18p11.1-q11.1, des régions chromosomiques 13q14.2 et 21q22.1 pour la prise en charge clinique.

Limitations

Ce dispositif est conçu pour détecter le matériel chromosomique, qui inclut les régions centromériques couvertes par les clones vert, orange et cyan dans le composant Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe, pour les chromosomes X, Y et 18 respectivement. Les pertes et gains génomiques situés hors de ces régions ou les pertes ou gains partiels de ces régions peuvent ne pas être détectés par ce dispositif.

Ce dispositif est également conçu pour détecter le matériel chromosomique, qui inclut les régions chromosomiques 13q14.2 et 21q22.1 couvertes par les clones vert et orange dans le composant Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe. Les pertes et gains génomiques situés hors de ces régions ou les pertes ou gains partiels de ces régions peuvent ne pas être détectés par ce produit.

Ce dispositif ne convient pas aux applications suivantes : diagnostic autonome, diagnostic compagnon, dépistage basé sur la population, test auprès du patient ou autotest.

Ce dispositif n'a pas été validé pour des types d'échantillons, des types de maladies ou des objectifs non spécifiés dans l'utilisation prévue. Ce dispositif n'a pas été validé pour une utilisation dans la détection des gains de chromosome X et/ou Y.

Ce dispositif est destiné à compléter d'autres tests diagnostiques de laboratoire, et aucune mesure thérapeutique ne doit être débattue sur la seule base du résultat de la FISH.

La création de rapports et l'interprétation des résultats de la FISH doivent être réalisées par du personnel qualifié, conformes aux pratiques professionnelles de référence et tenir compte d'autres informations cliniques, diagnostiques et résultats de tests pertinents.

Ce dispositif est exclusivement réservé à un usage professionnel en laboratoire. Le non-respect du protocole peut affecter les performances du produit et entraîner des faux positifs/négatifs.

Principe du test

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) permet de détecter des séquences d'ADN sur des chromosomes en métaphase ou dans les noyaux interphasiques

d'échantillons cytogénétiques fixés. Cette technique utilise des sondes ADN qui s'hybrident à des chromosomes entiers ou à des séquences uniques spécifiques, et complètes l'analyse cytogénétique. Grâce à des avancées récentes, cette technique précieuse peut désormais être utilisée comme un outil de diagnostic essentiel dans l'analyse chromosomique prénatale, hématologique et pathologique. Après fixation et dénaturation, l'ADN cible est disponible pour l'anneau à une sonde ADN comportant une séquence complémentaire, dénaturée de façon similaire et marquée par fluorescence. Après l'hybridation, la sonde ADN non liée et non liée spécifiquement est retirée et l'ADN est contre-coloré pour la visualisation. Un microscope à fluorescence permet alors la visualisation de la sonde hybridée sur le matériel cible.

Informations sur les sondes

L'analyse cytogénétique moléculaire joue un rôle essentiel dans l'évaluation prénatale des grossesses à haut risque, en permettant l'identification précise des anomalies chromosomiques et l'évaluation du risque de récurrence. Les anomalies chromosomiques les plus courantes sont les aneuploïdies, définies comme un nombre anormal de copies de chromosomes. Les individus affectés présentent généralement une trisomie (trois copies d'un chromosome) ou une monosomie (une seule copie d'un chromosome).¹ Les aneuploïdies bien connues et cliniquement significatives comprennent les trisomies 13, 18 et 21, ainsi que la monosomie X. Ces anomalies contribuent de manière importante aux troubles du développement et aux résultats défavorables en matière de reproduction et figurent parmi les indications les plus courantes du diagnostic prénatal invasif.²

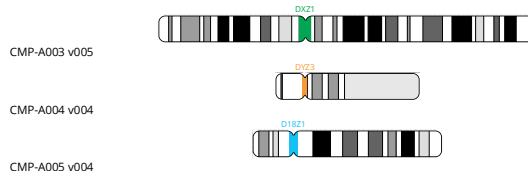
La trisomie 21 (syndrome de Down), la trisomie autosomique viable la plus courante, se caractérise par des troubles cognitifs, des anomalies cardiaques congénitales et une morbidité multisystémique, et constitue la principale indication pour les tests génétiques prénataux.^{3,4} La trisomie 13 (syndrome de Patau) se caractérise par des malformations cérébrales (holoprosencéphalie), une dysmorphie faciale, des anomalies oculaires, une polydactylie postaxiale, des malformations viscérales (cardiopathie) et un retard psychomoteur sévère.⁵ La trisomie 18 (syndrome d'Edwards) est associée à des malformations congénitales graves, à une mortalité périnatale élevée et à des phénotypes échographiques bien définis, soulignant la nécessité d'une détection prénatale précise et d'une confirmation génétique.^{6,7} La monosomie X (syndrome de Turner), également appelée syndrome d'hypoplasie ovarienne congénitale, est l'anomalie chromosomique sexuelle la plus fréquente chez les femmes et résulte de l'absence complète ou partielle d'un chromosome X.⁸

Le diagnostic prénatal est proposé pour les grossesses à haut risque d'anomalies chromosomiques, telles que la trisomie 13, 18, 21 et la monosomie X. Le protocole FISH est une méthode de cytogénétique moléculaire validée pour la détection et l'énumération rapides du nombre de copies de chromosomes dans les noyaux en interphase. Le protocole FISH permet la détection ciblée d'aneuploïdies courantes et fournit des résultats rapides pour aider à la prise de décision clinique. Elle est largement utilisée dans les diagnostics modernes d'aneuploïdies, en particulier lorsqu'une confirmation rapide du statut du nombre de copies chromosomiques est nécessaire.^{9,10,11}

Caractéristiques des sondes

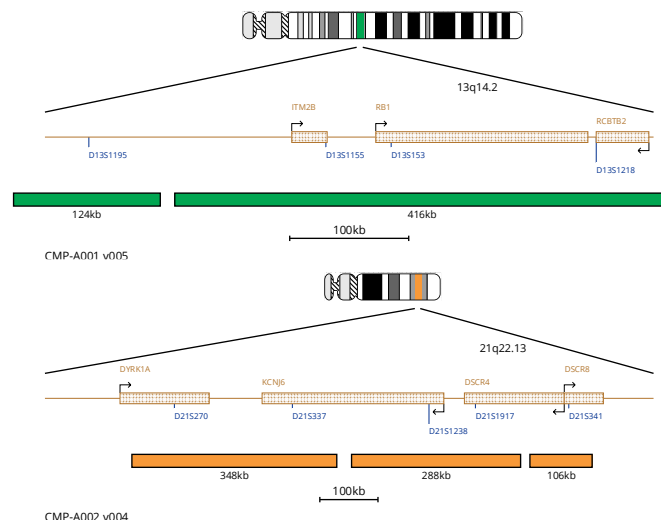
LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Centromère X, Xp11.1 – q11.1 (DXZ1) Vert
Centromère Y, Yp11.1 – q11.1 (DYZ3) Orange
Centromère 18, 18p11.1 – q11.1 (D18Z1) Cyan



LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Séquence unique 13, 13q14.2 Vert
Séquence unique 21, 21q22.13 Orange



Le kit contient deux composants de sonde pour deux hybridations distinctes.

LPA002

Le composant de sonde LPA002 est un mélange de sondes ADN fluorescentes marquées directement en vert, orange et cyan :

- La sonde verte DXZ1 marque directement les séquences d'ADN satellite alpha dans la région DXZ1 du chromosome X.
- La sonde orange DYZ3 marque directement les séquences d'ADN satellite alpha dans la région DYZ3 du chromosome Y.
- La sonde cyan D18Z1 marque directement les séquences d'ADN satellite alpha dans la région D18Z1 du chromosome 18.

LPA003

Le composant de sonde LPA003 est un mélange de sondes ADN fluorescentes marquées directement en vert et orange contenant des séquences uniques :

- Le mélange de sondes vertes contient une sonde de 124 kb et une sonde de 416 kb en 13q14.2 qui couvre les gènes ITM2B, RB1 et RCBTB2, y compris les marqueurs D13S1195, D13S1155, D13S153 et D13S1218.
- Le mélange de sondes orange contient une sonde de 348 kb, une sonde de 288 kb et une sonde de 106 kb en 21q22.13 qui couvre les gènes DYRK1A, KCNJ6, DSCR4 et DSCR8, y compris les marqueurs D21S270, D21S337, D21S1238, D21S1917 et D21S341.

Matériel fourni

Sonde : 50 µl par flacon dans le kit de 5 tests, 100 µl par flacon dans le kit de 10 tests, 300 µl par flacon dans le kit de 30 tests, 500 µl par flacon dans le kit de 50 tests.

Les composants de la sonde sont fournis préalablement mélangés dans une solution d'hybridation (<65 % formamide ; <20 mg de sulfate de dextrane ; <10 % de 20x saline-citrate de sodium [SSC]) et sont prêts à l'emploi.

Contre-coloration : 150 µl par flacon dans le kit de 5 tests, 500 µl par flacon dans le kit de 10 tests, 1 000 µl par flacon dans le kit de 30 tests, ou 1 200 µl par flacon dans le kit de 50 tests.

La contre-coloration utilisée est le DAPI Antifade ES (0,125 µg/ml de DAPI [4,6-diamidino-2-phénylindole] en milieu de montage à base de glycérol).

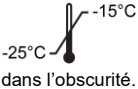
Avertissements et précautions

1. Utilisation réservée au diagnostic *in vitro*. Exclusivement réservé à un usage professionnel en laboratoire.
2. Les opérateurs doivent s'assurer que les instructions d'utilisation correctes et les plus récentes sont consultées et suivies à tout moment.
3. Les mélanges de sonde contiennent du formamide, un agent tératogène. Ne pas respirer les vapeurs et éviter tout contact cutané. Ce produit doit être manipulé avec précaution : le port de gants et d'une blouse de laboratoire est obligatoire.
4. Le DAPI doit être manipulé avec précaution : le port de gants et d'une blouse de laboratoire est obligatoire.
5. Ne pas utiliser si le(s) flacon(s) est (sont) endommagé(s) ou si le contenu du flacon est compromis de quelque manière que ce soit.
6. Suivre la réglementation locale sur la mise au rebut, ainsi que les recommandations de la fiche de données de sécurité pour déterminer comment mettre ce produit au rebut sans risque. Ceci s'applique également au contenu des kits de test endommagés.
7. Éliminer tous les réactifs utilisés et tout autre matériel jetable contaminé en suivant les procédures applicables aux déchets infectieux ou potentiellement infectieux. Il incombe à chaque laboratoire de traiter les déchets solides et liquides en fonction de leur nature et de leur degré de dangerosité et de les traiter et de les éliminer (ou de les faire traiter et éliminer) conformément aux réglementations applicables.
8. Les opérateurs doivent pouvoir distinguer les couleurs orange, cyan et verte.
9. Le non-respect du protocole spécifié, de l'équipement et des instructions sur les réactifs peut affecter les performances du produit et entraîner des faux positifs/négatifs.
10. La sonde ne doit pas être diluée ou mélangée avec d'autres sondes.
11. La non-utilisation de 10 µl de sonde durant l'étape de pré-dénaturation du protocole peut affecter les performances et entraîner des faux positifs/négatifs.
12. Tous les produits doivent être validés avant utilisation.
13. Des contrôles internes doivent être effectués en utilisant des populations de cellules non affectées dans les échantillons de test.
14. Des précautions doivent être prises pour éviter toute contamination entre les flacons contenant le LPA002 et le LPA003.

Limites de température

- -20 °C / Congelé / Au congélateur : -25 °C à -15 °C
- 37 °C : +37 °C ± 1 °C
- 72 °C : +72 °C ± 1 °C
- 75 °C : +75 °C ± 1 °C
- Température ambiante (TA) : +15 °C à +25 °C

Conservation et manipulation



Le kit doit être conservé entre -25 °C et -15 °C au congélateur jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit. La sonde et les flacons de contre-coloration doivent être conservés dans l'obscurité.



La sonde FISH, la contre-coloration DAPI Antifade ES et la solution d'hybridation restent stables tout au long des cycles de congélation et de décongélation qui interviennent dans le cadre d'une utilisation normale (un cycle correspond au retrait puis au remplacement du flacon dans le congélateur). **Sondes FISH :** 5 cycles pour le kit de 5 tests, 10 cycles pour le kit de 10 tests, 30 cycles pour le kit de 30 tests, 50 cycles pour le kit de 50 tests. **Contre-coloration :** 10 cycles pour le kit de 5 tests, 20 cycles pour le kit de 10 tests, 60 cycles pour le kit de 30 tests, 100 cycles pour le kit de 50 tests. L'exposition à

la lumière doit être minimisée et évitée dans la mesure du possible. Stocker les composants dans l'emballage étanche à la lumière fourni. Les composants utilisés et stockés dans des conditions autres que celles indiquées sur l'étiquetage peuvent ne pas fonctionner comme prévu et affecter négativement les résultats de l'essai. Il est essentiel de limiter l'exposition aux variations de lumière.

Équipement et matériel nécessaires non fournis

L'équipement utilisé doit être calibré :

1. Plaque chauffante (avec plaque solide et contrôle précis de la température jusqu'à 80 °C)
2. Micropipettes calibrées de volume variable et embouts de 1 µl à 200 µl
3. Bain-marie avec contrôle précis de la température à 37 °C et 72 °C
4. Tube pour microcentrifugeuse (0,5 ml)
5. Microscope à fluorescence (consulter la section Recommandations relatives à la microscopie à fluorescence)
6. Microscope à contraste de phase
7. Bocal Coplin propres en plastique, céramique ou verre réfractaire
8. Forceps
9. pH-mètre calibré (ou bandelettes de pH pouvant mesurer un pH de 6,5 à 8,0)
10. Récipient humidifié
11. Huile d'immersion de l'objectif du microscope à fluorescence
12. Centrifugeuse de paillasse
13. Lames pour microscope
14. Lamelles couvre-objet de 24 x 24 mm
15. Minuteur
16. Incubateur à 37 °C
17. Colle à base de caoutchouc
18. Agitateur vortex
19. Éprouvettes graduées
20. Agitateur magnétique
21. Thermomètre calibré

Équipement en option non fourni

1. Chambre de séchage cytogénétique

Réactifs nécessaires, mais non fournis

1. Solution saline de citrate de sodium (SSC) x20
2. Éthanol à 100 %
3. Tween-20
4. Hydroxyde de sodium (NaOH) 1 M
5. Acide chlorhydrique (HCl) 1 M
6. Eau purifiée

Recommandations relatives à la microscopie à fluorescence

Utiliser une lampe à mercure de 100 watts ou un équivalent, et des objectifs plans apochromatiques à immersion dans l'huile x60/63 ou x100 pour une visualisation optimale. Les fluorophores utilisés pour ce kit de sondes excitent et émettent les longueurs d'onde suivantes :

Fluorophore	Excitation _{max} [nm]	Émission _{max} [nm]
Cyan	418	467
Vert	495	521
Orange	551	572

Vérifier que les filtres d'excitation et d'émission appropriés couvrant les longueurs d'onde indiquées ci-dessus sont installés dans le microscope.

Le filtre triple bande passante DAPI/FITC/TRITC est optimal pour visualiser simultanément les fluorophores vert et orange ainsi que la contre-coloration. Le fluorophore cyan est spécifique au spectre Cyan et DEAC (un filtre Cyan ou DEAC à bande passante unique est nécessaire).

Vérifier le microscope en fluorescence avant utilisation pour vous assurer qu'il fonctionne correctement. Utiliser de l'huile d'immersion adaptée à la microscopie en fluorescence et formulée pour une auto-fluorescence faible. Éviter de mélanger la solution DAPI/antifade avec l'huile d'immersion pour microscope, car cela aura pour effet d'obscurcir les signaux. Suivre les recommandations du fabricant concernant la durée de vie de la lampe et l'ancienneté des filtres.

Préparation de l'échantillon

Le kit est conçu pour être utilisé sur des cellules fixées par une solution de Carnoy (3:1 méthanol/acide acétique) provenant d'échantillons de liquide amniotique, pour l'énumération des chromosomes X, Y, 13, 18 et 21 dans le cadre de grossesses à haut risque où un syndrome de Turner, de Patau, d'Edwards ou de Down est suspecté et qui sont préparées conformément aux directives du laboratoire ou de l'institution. Le prélèvement d'un échantillon de liquide amniotique doit être effectué conformément aux directives du laboratoire ou de l'institution. Les échantillons qui semblent sanglants ou bruns ne doivent pas être utilisés, car ils peuvent contenir du sang maternel et fausser les résultats. Préparer des échantillons séchés à l'air sur des lames pour microscope, conformément aux procédures cytogénétiques de référence. Le manuel *Cytogenetics Laboratory Manual* de l'AGT contient des recommandations sur le prélèvement des spécimens, la mise en culture, le recueil et la préparation des lames.¹²

Préparation des solutions

Solutions d'éthanol

Diluer de l'éthanol à 100 % avec de l'eau purifiée en respectant les proportions suivantes, puis mélanger soigneusement :

- Éthanol à 70 % : 7 volumes d'éthanol à 100 % pour 3 volumes d'eau purifiée
 - Éthanol à 85 % : 8,5 volumes d'éthanol à 100 % pour 1,5 volume d'eau purifiée
- Les solutions peuvent être conservées jusqu'à 6 mois à température ambiante dans un contenant hermétique.

Solution SSC x2

Diluer un volume de solution SSC x20 avec 9 volumes d'eau purifiée et mélanger soigneusement. Vérifier le pH et l'ajuster à 7,0 à l'aide de NaOH ou de HCl si nécessaire. La solution peut être conservée jusqu'à 4 semaines à température ambiante dans un contenant hermétique.

Solution SSC x0,4

Diluer un volume de solution SSC x20 avec 49 volumes d'eau purifiée et mélanger soigneusement. Vérifier le pH et l'ajuster à 7,0 à l'aide de NaOH ou de HCl si nécessaire. La solution peut être conservée jusqu'à 4 semaines à température ambiante dans un contenant hermétique.

SSC x2, solution Tween-20 à 0,05 %

Diluer un volume de solution SSC x20 avec 9 volumes d'eau purifiée. Ajouter 5 µl de Tween-20 pour 10 ml et mélanger soigneusement. Vérifier le pH et l'ajuster à 7,0 à l'aide de NaOH ou de HCl si nécessaire. La solution peut être conservée jusqu'à 4 semaines à température ambiante dans un contenant hermétique.

Protocole FISH

(Remarque : limiter en tout temps l'exposition de la sonde à la lumière du laboratoire.)

Préparation des lames

- 1. Déposer une goutte d'échantillon cellulaire sur une lame pour microscope en verre. Laisser sécher. (Facultatif, en cas d'utilisation d'une chambre de séchage cytogénétique : la chambre doit fonctionner à environ 25 °C avec un taux d'humidité de 50 % pour garantir l'application optimale de l'échantillon cellulaire. En l'absence de chambre de séchage cytogénétique, une hotte aspirante peut être utilisée.)
- 2. Immerger la lame dans SSC x2 pendant 2 minutes à température ambiante (TA) sans agitation.
- 3. Déshydrater par une série de bains d'éthanol (70 %, 85 % et 100 %), pendant 2 minutes à TA à chaque fois.
- 4. Laisser sécher.

Pré-dénaturation

- 5. Retirer la sonde du congélateur et la laisser se réchauffer à TA. Centrifuger rapidement les tubes avant utilisation.
- 6. Vérifier que la solution de la sonde est mélangée de façon homogène à l'aide d'une pipette.
- 7. Prélever 10 µl de sonde par test et transférer ce volume dans un tube de microcentrifugeuse. Replacer rapidement le reste de la sonde dans le congélateur.
- 8. Mettre la sonde et la lame de l'échantillon à préchauffer à 37 °C (+/- 1 °C) sur la plaque chauffante pendant 5 minutes.
- 9. Appliquer 10 µl de mélange de sonde sur l'échantillon cellulaire et appliquer soigneusement une lamelle couvre-objet. Sceller avec de la colle à base de caoutchouc et laisser la colle sécher complètement.

Dénaturation

- 10. Dénaturer l'échantillon et la sonde simultanément en chauffant la lame sur une plaque chauffante à 75 °C (+/- 1 °C) pendant 2 minutes.

Hybridation

- 11. Placer la lame dans un contenant humide et opaque à 37 °C (+/- 1 °C) toute la nuit.

Lavages post-hybridation

- 12. Retirer le DAPI du congélateur et le laisser se réchauffer à TA.
- 13. Retirer soigneusement la lamelle couvre-objet et toutes les traces de colle.
- 14. Immerger la lame dans SSC x0,4 (pH 7,0) à 72 °C (+/- 1 °C) pendant 2 minutes sans agitation.
- 15. Vider la lame et l'immerger dans SSC x2 et Tween-20 à 0,05 % à TA (pH 7,0) pendant 30 secondes sans agitation.
- 16. Vider la lame et appliquer 10 µl de DAPI/antifade sur chaque échantillon.
- 17. Appliquer une lamelle couvre-objet, éliminer les bulles d'air et laisser la couleur se développer dans le noir pendant 10 minutes.
- 18. Observer avec un microscope à fluorescence (voir **Recommandations relatives à la microscopie à fluorescence**).

Recommandations de procédure

- 1. La cuisson et le vieillissement des lames peuvent réduire la fluorescence du signal.
- 2. L'utilisation d'autres réactifs que ceux fournis ou recommandés par Cytocell Ltd. peut avoir une influence négative sur les conditions d'hybridation.
- 3. Utiliser un thermomètre calibré pour mesurer la température des solutions, des bains-marie et des incubateurs, car ces températures sont essentielles pour garantir des performances optimales du produit.
- 4. Les concentrations, le pH et les températures du lavage sont importants, car une stringence faible peut entraîner une liaison non spécifique de la sonde, et une stringence élevée une perte de signal.
- 5. Une dénaturation incomplète peut entraîner une perte de signal et une dénaturation excessive peut également entraîner une liaison non spécifique.
- 6. L'hybridation excessive peut entraîner des signaux supplémentaires ou inattendus.
- 7. Les utilisateurs doivent optimiser le protocole pour leurs propres échantillons avant d'utiliser le test à des fins diagnostiques.
- 8. Des conditions suboptimales peuvent entraîner une liaison non spécifique qui peut être interprétée de façon erronée comme un signal de la sonde.

Interprétation des résultats

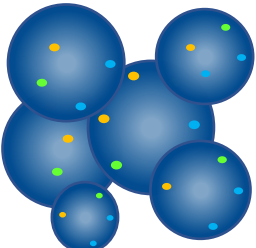
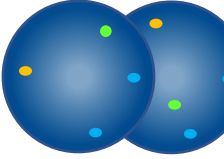
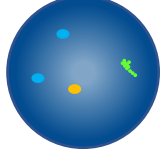
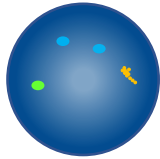
Évaluation de la qualité des lames

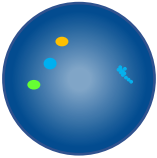
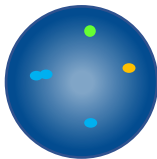
La lame ne doit pas être analysée dans les cas suivants :

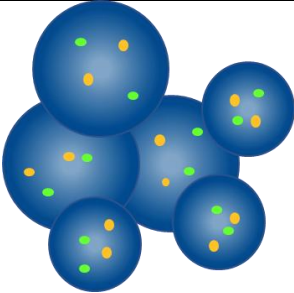
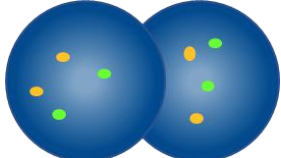
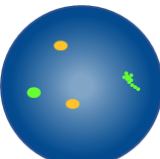
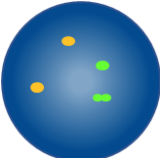
- Les signaux sont trop faibles pour permettre une analyse avec des filtres uniques. Pour l'analyse, les signaux doivent être clairs, distincts et faciles à évaluer.
- L'analyse est obstruée par un grand nombre de cellules agglutinées ou se chevauchant.
- Plus de 50 % des cellules ne sont pas hybridées.
- Les particules fluorescentes sont trop nombreuses entre les cellules et/ou un halo fluorescent interfère avec le signal. Une lame optimale comporte un arrière-plan sombre ou noir et propre.
- Les bords des noyaux cellulaires ne peuvent pas être distingués et ne sont pas intacts.

Directives d'analyse

- Chaque échantillon doit être analysé et interprété par deux analystes. Toute différence doit être évaluée par un troisième analyste.
- Chaque analyste doit être qualifié conformément aux normes nationales reconnues.
- Chaque analyste doit évaluer indépendamment un nombre suffisant de noyaux de chaque échantillon pour que les évaluations combinées des analystes répondent aux critères minimaux spécifiés par les directives institutionnelles, régionales ou nationales. Le premier analyste doit commencer l'analyse par le côté gauche de la lame et le deuxième par le côté droit.
- Chaque analyste doit consigner ses résultats dans des fiches distinctes.
- Seuls les noyaux intacts doivent être analysés. Les noyaux se chevauchant, agglutinés ou couverts par des débris cytoplasmiques ou associés à un degré élevé d'auto-fluorescence ne doivent pas être analysés.
- Éviter les zones présentant des débris cytoplasmiques trop nombreux ou une hybridation non spécifique.
- L'intensité du signal peut varier, même avec un seul noyau. Dans ce cas, utiliser des filtres uniques et/ou ajuster le plan focal.
- Le signal peut apparaître diffus si les conditions sont suboptimales. Si deux signaux de la même couleur se touchent, ou si la distance qui les sépare est inférieure ou égale à la largeur de deux signaux, ou lorsqu'un brin ténu connecte les deux signaux, ils doivent être comptés comme un seul et même signal.
- Si le caractère analysable d'une cellule est incertain, ne pas l'analyser.

Directives d'analyse – LPA002	
	Ne pas compter les noyaux trop proches pour en déterminer les limites.
	Ne pas compter les noyaux qui se chevauchent, lorsque les surfaces des deux noyaux ne sont pas visibles.
	Compter comme un signal vert, un signal orange et deux signaux cyan – le signal vert est diffus
	Compter comme un signal vert, un signal orange et deux signaux cyan – le signal orange est diffus

	Compter comme un signal vert, un signal orange et deux signaux cyan – l'un des deux signaux cyan est diffus
	Compter un signal vert, un signal orange et deux signaux cyan – l'écart dans le signal cyan est inférieur à deux largeurs de sonde

Directives d'analyse – LPA003	
	Ne pas compter les noyaux trop proches pour en déterminer les limites.
	Ne pas compter les noyaux qui se chevauchent, lorsque les surfaces des deux noyaux ne sont pas visibles.
	Compter comme deux signaux orange et deux signaux verts, si l'un des deux signaux verts est diffus.
	Compter comme deux signaux orange et deux signaux verts, si l'espace d'un signal vert est inférieur à la largeur de deux signaux.

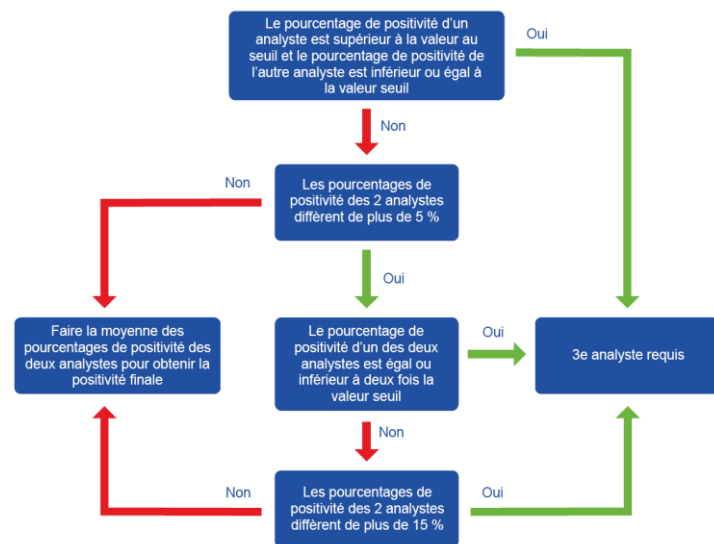
Exigences relatives au troisième analyste

Selon le nombre de noyaux anormaux relevé par chaque analyste, un troisième analyste peut être requis. Le troisième analyste analysera le même nombre de noyaux que les deux premiers analystes, conformément aux directives institutionnelles, régionales ou nationales. Les règles concernant le troisième analyste sont détaillées dans le paragraphe et le graphique ci-dessous.

Un troisième analyste est requis si :

- Le pourcentage de positivité d'un des analystes est supérieur à la valeur au seuil et le pourcentage de positivité des autres analystes est inférieur ou égal à la valeur seuil.
- Le pourcentage de positivité des deux analystes diffère de plus de 5 % et le pourcentage de positivité de l'un ou l'autre des analystes est égal ou inférieur à deux fois la valeur seuil.
- Les pourcentages de positivité des deux analystes diffèrent de plus de 15 %.

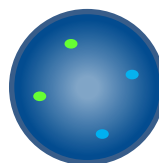
Sur les trois scores obtenus, la moyenne des deux valeurs positives les plus proches sera calculée pour la positivité finale. Si les 3 scores sont équidistants, la valeur positive médiane doit être utilisée.



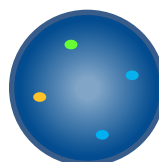
Résultats attendus

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Séquences de signaux normaux attendues

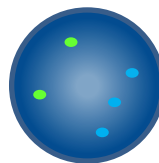


Dans une cellule femelle normale, deux signaux verts et deux signaux cyan sont attendus (2V2C).

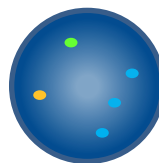


Dans une cellule mâle normale, un signal vert, un signal orange et deux signaux cyan sont attendus (1V1O2C).

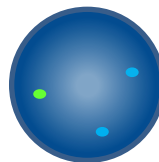
Séquences de signaux anormaux attendues



Dans une cellule femelle atteinte de trisomie 18, les signaux attendus sont deux signaux verts et trois signaux cyan (2V3C).



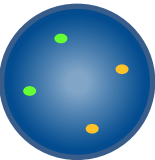
Dans une cellule mâle atteinte de trisomie 18, les signaux attendus sont un signal vert, un signal orange et trois signaux cyan (1V1O3C).



Dans une cellule atteinte du syndrome de Turners, le signal attendu est un signal vert et deux signaux cyan (1V2C).

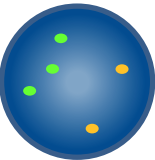
LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Séquence de signaux normaux attendue

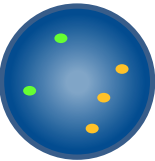


Dans une cellule normale, deux signaux verts et deux signaux orange sont attendus (2V2O).

Séquences de signaux anormaux attendues



Dans une cellule atteinte de trisomie 13, trois signaux verts et deux signaux orange sont attendus (3V2O).



Dans une cellule atteinte de trisomie 21, deux signaux verts et trois signaux orange sont attendus (2V3O).

D'autres séquences de signaux sont possibles pour les spécimens aneuploïdes/déséquilibrés.

Interférences pertinentes connues/substances interférentes

Pas d'interférences ou de substances interférentes connues.

Réactivité croisée connue

La sonde DXZ1 peut montrer une hybridation croisée avec les centromères des chromosomes 1, 11, 17 et Y.

La sonde DY23 peut montrer une hybridation croisée avec les centromères des chromosomes 13, 14, 15, 20, 21, 22 et X.

La sonde D18Z1 peut montrer une hybridation croisée avec les centromères des chromosomes 2, 4, 8, 9, 13, 14, 15, 20, 21 et 22.

Signalement d'incidents graves

Pour un patient/utilisateur/tiers dans l'Union européenne et dans les pays ayant un régime réglementaire identique (Règlement [UE] 2017/746 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*) ; si, pendant l'utilisation de ce dispositif ou à la suite de son utilisation, un incident grave s'est produit, veuillez le signaler au fabricant et à votre autorité nationale compétente.

En cas d'incident grave dans d'autres pays, veuillez le signaler au fabricant et, le cas échéant, à votre autorité nationale compétente.

Contact du fabricant pour les questions de vigilance : vigilance@ogt.com

Pour les autorités nationales compétentes de l'UE, vous trouverez une liste des interlocuteurs pour les questions de vigilance à l'adresse suivante : https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

Caractéristiques de performances spécifiques

Spécificité analytique

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

La spécificité analytique est définie comme le pourcentage de signaux qui s'hybrident au locus correct et nulle part ailleurs. 4 loci chromosomiques dans chacune des 20 cellules en métaphase de 5 échantillons ont été analysés, pour obtenir 100 points de données pour les chromosomes X et Y et 200 points de données pour le chromosome 18. L'emplacement de chaque sonde hybridée a été cartographié et le nombre de signaux FISH des chromosomes en métaphase qui se sont hybridés au bon locus a été enregistré.

La spécificité analytique de chaque sonde du kit a été calculée en divisant le nombre de signaux FISH des chromosomes en métaphase hybridés au locus correct par le nombre total de signaux FISH des chromosomes en métaphase hybridés. Ce résultat a été exprimé en pourcentage avec un intervalle de confiance de 95 %.

Tableau 1. Spécificité analytique de LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Cible	Nombre de chromosomes en métaphases hybridés	Nombre de locus correctement hybridés	Spécificité analytique	Intervalle de confiance 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

La spécificité analytique est définie comme le pourcentage de signaux qui s'hybrident au locus correct et nulle part ailleurs. 4 loci chromosomiques dans chacune des 20 cellules en métaphase de 5 échantillons ont été analysés, pour obtenir 200 points de données chacun pour les chromosomes 13 et 21. L'emplacement de chaque sonde hybridée a été cartographié et le nombre de signaux FISH des chromosomes en métaphase qui se sont hybridés au bon locus a été enregistré.

La spécificité analytique de chaque sonde du kit a été calculée en divisant le nombre de signaux FISH des chromosomes en métaphase hybridés au locus correct par le nombre total de signaux FISH des chromosomes en métaphase hybridés. Ce résultat a été exprimé en pourcentage avec un intervalle de confiance de 95 %.

Tableau 2. Spécificité analytique de LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Cible	Nombre de chromosomes en métaphases hybridés	Nombre de locus correctement hybridés	Spécificité analytique	Intervalle de confiance de 95 %
13q14.2	200	200	100 %	98,12-100 %
21q22.1	200	200	100 %	98,12-100 %

Sensibilité analytique

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

La sensibilité analytique correspond au pourcentage de cellules en interphase évaluable dans la séquence de signaux normaux attendue. Un minimum de 50 cellules en interphase a été analysé pour chacune des 25 suspensions de cellules fixées provenant d'échantillons de liquide amniotique masculins au caryotype normal et de 25 échantillons féminins au caryotype normal considérées comme ayant un complément normal de chromosome 18, pour un résultat d'un minimum de 2 500 noyaux évalués dans l'ensemble. Les données de sensibilité ont été analysées en fonction du pourcentage de cellules présentant une séquence de signaux normaux attendue et exprimées en pourcentage avec un intervalle de confiance de 95 %.

Tableau 3. Sensibilité analytique de LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Type d'échantillon	Critères de sensibilité	Résultat de sensibilité
Liquide amniotique	> 95 %	95,99 % (95,15-96,69 %)

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

La sensibilité analytique correspond au pourcentage de cellules en interphase évaluable dans la séquence de signaux normaux attendue. Un minimum de 50 cellules en interphase a été analysé pour chacune des 25 suspensions de cellules fixées provenant d'échantillons de liquide amniotique masculins ou féminins au caryotype normal considérées comme ayant un complément normal de chromosome 13 et 21, pour un résultat d'un minimum de 1 250 noyaux évalués pour chaque type d'échantillon. Les données de sensibilité ont été analysées en fonction du pourcentage de cellules présentant une séquence de signaux normaux attendue et exprimées en pourcentage avec un intervalle de confiance de 95 %.

Tableau 4. Sensibilité analytique de LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Type d'échantillon	Critères de sensibilité	Résultat de sensibilité
Liquide amniotique	> 95 %	96,24 % (94,84-97,64 %)

Caractérisation des valeurs seuils normales

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

La valeur seuil normale est définie comme le pourcentage de cellules présentant une séquence de signaux faux positifs à partir de laquelle un individu serait considéré comme normal et non compatible avec un diagnostic clinique. Un minimum de 50 cellules en interphase a été analysé pour chacune des 25 suspensions de cellules fixées provenant d'échantillons de liquide amniotique masculins au caryotype normal et de 25 échantillons féminins au caryotype normal considérées comme ayant un complément normal de chromosome 18, pour un résultat d'un minimum de 2 500 noyaux évalués dans l'ensemble.

La valeur seuil a été déterminée à l'aide de la fonction β -inverse (BETAINV) dans MS Excel. Elle a été calculée comme le pourcentage de cellules en interphase présentant une séquence de signaux faux positifs en utilisant la limite supérieure d'un intervalle de confiance unilatéral de 95 % de la distribution binomiale dans un échantillon de patient normal.

Tableau 5. Caractérisation des valeurs seuils normales pour LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Type d'échantillon	Séquence de signaux	Résultat seuil
Liquide amniotique	1V1O3C	11,62 %
	2V3C	8,97 %
	1V2C	13,98 %

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

La valeur seuil normale est définie comme le pourcentage de cellules présentant une séquence de signaux faux positifs à partir de laquelle un individu serait considéré comme normal et non compatible avec un diagnostic clinique. Un minimum de 50 cellules en interphase a été analysé pour chacune des suspensions de cellules de liquide amniotique provenant de 25 hommes ou femmes au caryotype normal, ce qui donne un minimum de 1 250 noyaux évalués pour chaque type d'échantillon.

La valeur seuil a été déterminée à l'aide de la fonction β -inverse (BETAINV) dans MS Excel. Elle a été calculée comme le pourcentage de cellules en interphase présentant une séquence de signaux faux positifs en utilisant la limite supérieure d'un intervalle de confiance unilatéral de 95 % de la distribution binomiale dans un échantillon de patient normal.

Tableau 6. Caractérisation des valeurs seuils normales pour LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Type d'échantillon	Séquence de signaux	Résultat seuil
Liquide amniotique	2V3O	8,97 %
	3V2O	

Les laboratoires doivent vérifier les valeurs seuils à partir de leurs propres données.^{13,14}

Précision

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

La précision de ce produit a été mesurée en termes de précision intra-journalière (d'un échantillon sur l'autre), de précision inter-journalière (d'un jour sur l'autre) et de précision inter-lot à site unique (d'un lot sur l'autre).

3 échantillons ont été utilisés pour évaluer la précision de ce produit : 1 échantillon de liquide amniotique masculin normal considéré comme XY et ayant un complément normal du chromosome 18, 1 échantillon de liquide amniotique féminin normal considéré comme XX et ayant un complément normal du chromosome 18, et 1 échantillon de liquide amniotique féminin faiblement positif pour la trisomie 18.

La précision inter-journalière et intra-journalière a été évaluée en testant les échantillons en triple sur 10 jours non consécutifs. La précision d'un lot à l'autre a été évaluée en testant 3 lots de produits indépendants en trois exemplaires en utilisant les mêmes échantillons. Les résultats ont été exprimés en termes de concordance globale avec la classification attendue (positive ou négative).

Tableau 7. Reproductibilité et précision de LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Variable	Type d'échantillon	Concordance
Intra-journalière	Liquide amniotique féminin négatif	100,0 %
	Liquide amniotique féminin positif pour la trisomie 18	90,0 %
Inter-journalière	Liquide amniotique féminin négatif	100,0 %
	Liquide amniotique féminin positif pour la trisomie 18	90,0 %
	Liquide amniotique masculin négatif	100,0 %
Inter-lot	Liquide amniotique féminin négatif	100,0 %
	Liquide amniotique féminin positif pour la trisomie 18	100,0 %
	Liquide amniotique masculin négatif	100,0 %

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

La précision de ce produit a été mesurée en termes de précision intra-journalière (d'un échantillon sur l'autre), de précision inter-journalière (d'un jour sur l'autre) et de précision inter-lot à site unique (d'un lot sur l'autre).

3 échantillons ont été utilisés pour évaluer la précision de ce produit : 1 échantillon de liquide amniotique normal considéré comme ayant un complément normal de chromosomes 13 et 21, 1 échantillon de liquide amniotique faiblement positif pour la trisomie 13 et 1 échantillon de liquide amniotique faiblement positif pour la trisomie 21.

La précision inter-journalière et intra-journalière a été évaluée en testant les échantillons en triple sur 10 jours non consécutifs. La précision d'un lot à l'autre a été évaluée en testant 3 lots de produits indépendants en trois exemplaires en utilisant les mêmes échantillons. Les résultats ont été exprimés en termes de concordance globale avec la classification attendue (positive ou négative).

Tableau 8. Reproductibilité et précision de LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Variable	Type d'échantillon	Concordance
Précision inter-journalière et intra-journalière	Liquide amniotique négatif	100,0 %
	Liquide amniotique faiblement positif pour la trisomie 13	100,0 %
	Liquide amniotique faiblement positif pour la trisomie 21	96,7 %
Inter-lot	Liquide amniotique négatif	88,9 %
	Liquide amniotique faiblement positif pour la trisomie 13	100,0 %
	Liquide amniotique faiblement positif pour la trisomie 21	100,0 %

Performance clinique

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Pour garantir que la sonde d'énumération prénatale des chromosomes X, Y et 18 détecte les réorganisations prévues, les performances cliniques ont été établies au cours d'une étude sur des échantillons représentatifs de la population à laquelle le produit est destiné : Matière résiduelle fixée au méthanol/acide acétique (3:1) provenant d'échantillons de liquide amniotique prénatal. La taille de l'échantillon pour l'étude était de 71 spécimens, avec une population de 3 spécimens positifs pour la trisomie 18, 2 spécimens positifs pour la monosomie X, et 66 spécimens négatifs. Tous les échantillons ont été anonymisés et randomisés pour éviter tout biais d'analyse. Les résultats ont été comparés au statut connu de l'échantillon. La sonde a correctement identifié l'état des échantillons dans tous les cas.

Les résultats de ces tests ont été analysés afin de fournir des valeurs de sensibilité et de spécificité cliniques et de taux de faux positifs (TFP) pour les signaux positifs, en utilisant une approche unidimensionnelle.

Tableau 9. Performance clinique de Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Variable	Résultat
Sensibilité clinique (taux de vrais positifs, TVP)	100,0 %
Spécificité clinique (taux de vrais négatifs, TVN)	100,0 %
Taux de faux positifs (TFP) = 1 – Spécificité	0,0 %

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Pour garantir que la sonde d'énumération prénatale des chromosomes 13 et 21 détecte les réorganisations prévues, les performances cliniques ont été établies au cours de trois études sur des échantillons représentatifs de la population à laquelle le produit est destiné : Matière résiduelle fixée au méthanol/acide acétique (3:1) provenant d'échantillons de liquide amniotique prénatal. La taille de l'échantillon pour l'étude était de 172 spécimens, avec une population de 15 spécimens positifs pour la trisomie 13 et 157 spécimens négatifs pour la trisomie 13, et un total de 109 spécimens positifs pour la trisomie 21 et 63 spécimens négatifs pour la trisomie 21. Les résultats ont été comparés au statut connu de l'échantillon. La sonde a correctement identifié l'état des échantillons dans tous les cas.

Les résultats de ces tests ont été analysés afin de fournir des valeurs de sensibilité et de spécificité cliniques et de taux de faux positifs (TFP) pour les signaux positifs, en utilisant une approche unidimensionnelle.

Tableau 10. Performance clinique de Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Variable	Résultat
Sensibilité clinique (taux de vrais positifs, TVP)	100,0 %
Spécificité clinique (taux de vrais négatifs, TVN)	100,0 %
Taux de faux positifs (TFP) = 1 – Spécificité	0,0 %

Résumé de la sécurité et des performances (SSP)

Le SSP est mis à la disposition du public via la base de données européenne sur les dispositifs médicaux (Eudamed), où il est lié au Basic UDI-DI.
URL Eudamed : <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>
Basic UDI-DI : 50558449LPA001GG

Si Eudamed n'est pas pleinement opérationnel, la PSS est mise à la disposition du public sur demande en envoyant un courrier électronique à l'adresse suivante SSP@oqt.com.

Informations complémentaires
Pour plus d'informations sur le produit, contacter le service d'assistance technique de Cytocell.
Tél. : +44 (0)1223 294048
Courriel : techsupport@cytocell.com
Site web : www.oqt.com

Références

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.

Glossaire des symboles

EN ISO 15223-1 : 2021 – « Dispositifs médicaux — Symboles à utiliser avec les informations à fournir par le fabricant — Partie 1 : Exigences générales » (© International Organization for Standardization)		
Symbole	Titre	Numéro(s) de référence
	fr : Fabricant	5.1.1
	fr : Représentant autorisé dans la Communauté européenne/l'Union européenne	5.1.2
	fr : Date de péremption	5.1.4
	fr : Numéro de lot	5.1.5
	fr : Numéro de référence	5.1.6
	fr : Tenir à l'abri de la lumière du soleil	5.3.2
	fr : Limite de température	5.3.7
	fr : Consulter le mode d'emploi	5.4.3
	fr : Consulter le mode d'emploi numérique oqt.com/IFU	5.4.3
	fr : Mise en garde	5.4.4
	fr : Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>	5.5.1
	fr : Quantité suffisante pour <n> tests	5.5.5

	fr : Identifiant unique du dispositif	5.7.10
Symboles EDMA pour les réactifs et les composants de DIV, révision d'octobre 2009		
Symbole	Titre	Numéro(s) de référence
	fr : Contenu	S.O.

Brevets et marques déposées
Cytocell est une marque déposée de Cytocell Limited.



Cytocell Limited
Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
ROYAUME-UNI

Tél. : +44 (0)1223 294048
Courriel : probes@cytocell.com
Site web : www.oqt.com



Sysmex Europe SE
Deelböge 19 D
22297 Hamburg
ALLEMAGNE

Site web : www.sysmex-europe.com

Historique des versions du mode d'emploi
V001 2026-03-09 : Nouveau mode d'emploi pour le règlement (UE) 2017/746