



A Sysmex Group Company



Istruzioni per l'uso (IFU)

RIF: CE-LPA 003-S / CE-LPA 003

## Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit



SOLO PER USO PROFESSIONALE



Ulteriori informazioni e altre lingue disponibili su [ogt.com/IFU](http://ogt.com/IFU)

### Uso previsto

CytoCell® Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit è un test qualitativo, non automatizzato, d'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) utilizzato per rilevare la regione cromosomica 13q14.2 e la regione cromosomica 21q22.1 in cellule fissate in soluzione di Carnoy (metanolo/acido acetico 3:1) provenienti da campioni di liquido amniotico al fine di enumerare i cromosomi 13 e 21 nelle gravidanze ad alto rischio in caso di sospetta sindrome di Down o Patau.

### Indicazioni per l'uso

Questo dispositivo è ideato come aggiunta ad altri test clinici e istopatologici in percorsi diagnostici e di cura clinica riconosciuti, come screening ecografici e analisi biochimiche, laddove la conoscenza dello stato del numero di copie della regione cromosomica 13q14.2 e della regione cromosomica 21q22.1 sarebbe importante per la gestione del paziente.

### Limitazioni

Questo dispositivo è ideato per rilevare materiale cromosomico che include le regioni cromosomiche 13q14.2 e 21q22.1 coperte in questo set di sonde rispettivamente dai cloni verde e arancione. Guadagni o perdite genomiche esterne a tali regioni, o guadagni o perdite parziali di queste regioni potrebbero non venire rilevate con questo dispositivo.

Il presente dispositivo non è destinato a: utilizzo come diagnostica indipendente, test diagnostico di accompagnamento, screening basato sulla popolazione, analisi decentralizzate o autodiagnosi e non è stato convalidato per tipi di campione, tipi di patologie od obbiettivi diversi da quelli specificati nell'uso previsto.

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

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

Il presente dispositivo è solo per uso professionale di laboratorio.

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

### Principi del test

L'ibridazione *in situ* fluorescente (fluorescence in situ hybridization, FISH) è una tecnica che consente di rilevare sequenze di DNA su cromosomi in metafase o in nuclei interfascici 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 con bandeggio G. Tale tecnica può essere applicata oggi come strumento diagnostico essenziale nell'analisi cromosomica prenatale, ematologica e nei tumori solidi. 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 da contrasto. L'utilizzo della microscopia a fluorescenza permette quindi la visualizzazione della sonda ibridata sul materiale target.

### Informazioni sulla sonda

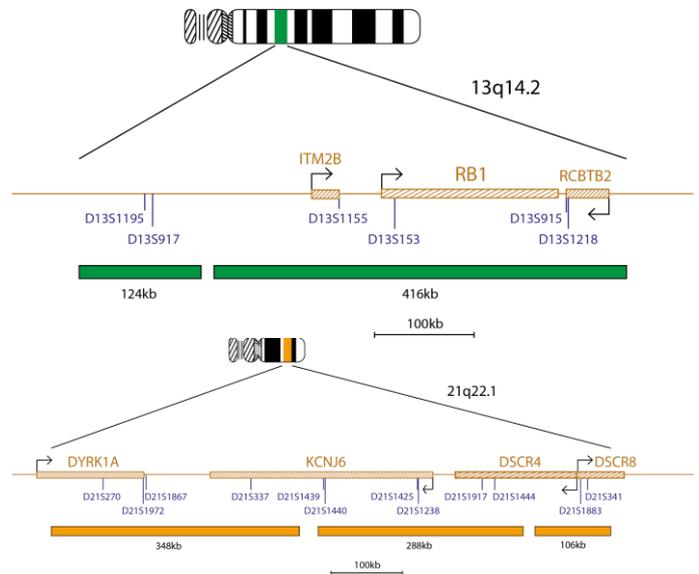
La sindrome di Down (SD) è una trisomia autosomica causata dalla presenza di una terza copia (parziale o totale) del cromosoma 21 ed è caratterizzata da disabilità intellettiva variabile ipotonia muscolare e lassità articolare, spesso associata a un dimorfismo facciale caratteristico e da varie anomalie come difetti a livello cardiaco, gastrointestinale, neurosensoriale o endocrino<sup>1,2</sup>. La SD è una delle principali cause di disabilità intellettiva nel mondo e i pazienti affetti si trovano ad affrontare vari problemi di salute tra cui quelli correlati ad apprendimento e memoria, cardiopatie congenite (CHD), malattia di Alzheimer (AD), leucemia, cancro e malattia di Hirschsprung (HD)<sup>1</sup>. La SD presenta alta complessità genetica e variabilità fenotipica<sup>1</sup>. Alla 16<sup>a</sup> settimana di gestazione le incidenze delle gravidanze con SD sono di 1 su 1050 per madri di 20 anni, 1 su 620 per madri di 30 anni e 1 su 70 per madri di 40 anni<sup>3</sup>.

La sindrome di Patau (SP) è un'anomalia cromosomica causata dalla presenza di un cromosoma 13 soprannumerario ed è caratterizzata da malformazioni cerebrali (oloprosencefalia), dimorfismo facciale, anomalie oculari, polidattilia postassiale, malformazioni viscerali (cardiopatia) e grave ritardo psicomotorio<sup>2</sup>. La SP è associata a oloprosencefalia fenotipica e ad anomalie della fusione della linea mediana dovute a difetti della fusione del mesoderma precordale nello stadio embrionale<sup>4</sup>. Alla 16<sup>a</sup> settimana di gestazione l'incidenza delle gravidanze con SP è di 1 su 11.000 per madri di 20 anni, 1 su 6500 per madri di 30 anni e 1 su 700 per madri di 40 anni<sup>3</sup>.

### Specifiche della sonda

Sequenza univoca per 13, 13q14.2 Verde

Sequenza univoca per 21, 21q22.1 Arancione



Il mix della sonda verde contiene una sonda di 124 kb e una sonda di 416 kb che si estende nei geni *ITM2B*, *RB1* e *RCBTB2*. Il mix della sonda arancione copre una regione su 21q22.1 dal gene *DYRK1A* al gene *DSCR8*.

### Materiali forniti

**Sonda:** 50 µL per provetta (5 test) o 100 µL per provetta (10 test).

Le sonde sono fornite già mescolate nella soluzione d'ibridazione (formammide < 65%; destrano solfato < 20 mg; citrato salino di sodio (SSC) 20x < 10%) e sono pronte all'uso.

**Colorante da contrasto:** 150 µL per provetta (15 test)

Il colorante da contrasto è DAPI Antifade ES (DAPI (4,6-diammidino-2-fenilindolo) 0,125 µg/ml in mounting medium a base di glicerolo).

### Avvertenze e misure precauzionali

1. Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale di laboratorio.
2. I mix di sonde 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.
3. Maneggiare DAPI con cura; indossare guanti e un camice da laboratorio.
4. Non utilizzare se la fiala o le fiale sono danneggiate o se il contenuto è in qualche modo compromesso.
5. Attenersi ai regolamenti sullo smaltimento locali e alle raccomandazioni presenti nella Scheda tecnica di sicurezza per garantire uno smaltimento sicuro del prodotto. Ciò si applica anche al contenuto del kit di test danneggiato.
6. Smaltire tutti i reagenti usati e i materiali monouso contaminati attenendosi alle procedure per i rifiuti infetti o potenzialmente infetti. È responsabilità di ciascun laboratorio maneggiare i rifiuti solidi e liquidi secondo la rispettiva natura e il livello di pericolosità, gestendoli e smaltendoli (o disponendone la gestione e lo smaltimento) nel rispetto dei regolamenti applicabili.
7. Gli operatori devono essere in grado di distinguere i colori rosso, blu e verde.

8. La mancata aderenza al protocollo descritto e ai reagenti può incidere sulle prestazioni e portare a risultati falsi positivi/negativi.
9. La sonda non deve essere diluita o mescolata con altre sonde.
10. 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.
11. Tutti i prodotti devono essere convalidati prima dell'uso.
12. I controlli interni devono essere eseguiti utilizzando popolazioni di cellule inalterate nei campioni di prova.

#### Definizioni delle temperature

- -20 °C / Congelato / In 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 (room temperature, RT): da +15 °C a +25 °C

#### Conservazione e utilizzo

 Conservare il kit in congelatore ad 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 d'ibridazione rimangono stabili durante i cicli di congelamento-scongelo sperimentati durante l'uso normale (dove un ciclo rappresenta la rimozione della fiala dal congelatore e la sua ricollocazione all'interno di quest'ultimo): 5 cicli per la fiala da 50 µL (5 test) di FISH probe, 10 cicli per la fiala da 100 µL (10 test) di sonda FISH e 15 cicli per la fiala da 150 µL (15 test) di colorante da contrasto. L'esposizione alla luce deve essere ridotta al minimo ed evitata ove possibile. Conservare i componenti nel contenitore a tenuta di luce fornito. I componenti utilizzati e conservati in condizioni diverse da quelle indicate sull'etichetta potrebbero avere prestazioni diverse da quelle attese e influenzare negativamente i risultati del test. È necessario intraprendere tutti gli sforzi per limitare l'esposizione a variazioni di luce e temperatura.

#### Apparecchiature e materiali necessari ma non forniti

È necessario utilizzare apparecchiature calibrate:

1. Piastra riscaldante (con una piastra solida e controllo accurato della temperatura fino a 80 °C)
2. Micropipette a volume calibrato variabile compreso tra 1 µL–200 µL
3. Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 37 °C e 72 °C
4. Provette da microcentrifuga (0,5 ml)
5. Microscopio a fluorescenza (riferirsi alla sezione Configurazione ottimale del microscopio a fluorescenza)
6. Microscopio a contrasto di fase
7. Contenitori di Coplin in plastica, ceramica o vetro resistente al calore
8. Pinzette
9. Misuratore calibrato del pH (o strisce indicatrici del pH capace di misurare pH da 6,5 a 8,0)
10. Contenitore umidificato
11. Olio per lenti a immersione del microscopio a fluorescenza
12. Centrifuga da banco
13. Vetrini da microscopia
14. Coprioggetto 24x24 mm
15. Timer
16. Incubatore a 37 °C
17. Colla per vetrini
18. Miscelatore a vortice
19. Cilindri graduati
20. Agitatore magnetico
21. Termometro calibrato

#### Apparecchiature opzionali non fornite

1. Stufa per asciugatura citogenetica

#### Reagenti necessari ma non forniti

1. Soluzione 20x di citrato salino di sodio (SSC)
2. 100% etanolo
3. Tween-20
4. 1M sodio idrossido (NaOH)
5. 1M acido idroclorico (HCl)
6. 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 e obiettivi Plan Apochromat 60/63x e 100x. I fluorofori utilizzati in questa sonda ecciteranno ed emetteranno alle seguenti lunghezze d'onda:

Fluoroforo	Eccitazione <sub>max</sub> [nm]	Emissione <sub>max</sub> [nm]
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 triplo filtro passabanda DAPI/FITC/TRITC è ottimale per visualizzare i fluorofori verde e arancione simultaneamente al colorante da contrasto. È possibile utilizzare anche il triplo filtro passabanda DAPI/FITC/Texas Red per visualizzare simultaneamente entrambi i fluorofori e il DAPI.

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'utilizzo su cellule fissate nella soluzione di Carnoy (metanolo/acido acetico 3:1) derivate da campioni di liquido amniotico al fine di enumerare i cromosomi 13 e 21 nelle gravidanze ad alto rischio in caso di sospetta sindrome di Down o Patau, le quali sono preparate secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituto. Il prelievo del campione di liquido amniotico deve essere eseguito in conformità con le linee guida del laboratorio o dell'istituto. Non utilizzare campioni con aspetto ematico o di colore marrone perché potrebbero contenere sangue materno e potrebbero quindi condurre a risultati falsati. 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<sup>5</sup>.

#### 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 per un massimo di 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 per un massimo di 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 per un massimo di 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 per un massimo di 4 settimane a temperatura ambiente in un contenitore a chiusura ermetica.

#### Pretrattamento raccomandato dei vetrini<sup>5</sup>

1. Immergere il vetrino preparato da cellule fissate in metanolo/acido acetico 3:1 provenienti da campioni di liquido amniotico in 2xSSC per 1 ora a 37 °C.
2. Porre il vetrino in una soluzione di lavoro a base di pepsina fresca (5 mg di pepsina aggiunti a 100 ml di HCl 0,01 M) per 13 minuti a 37 °C.
3. Immergere il vetrino in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) a TA per 5 minuti.
4. Immergere il vetrino nella soluzione di post-fissazione (formaldeide 0,95%: 1,0 ml di formaldeide 37%, 0,18 g di MgCl<sub>2</sub> e 39,0 ml di PBS) per 5 minuti a TA.
5. Immergere il vetrino PBS a TA per 5 minuti.
6. Immergere il vetrino in etanolo al 70% a TA. Lasciare riposare il vetrino nel lavaggio in etanolo per 2 minuti.
7. Prelevare il vetrino dall'etanolo al 70%. Ripetere il passaggio 6 con etanolo all'80%, seguito da etanolo al 100%.
8. Lasciare asciugare il vetrino.

#### Protocollo FISH

(Nota: durante l'intera procedura limitare l'esposizione della sonda e del colorante da contrasto alle luci di laboratorio).

#### Preparazione del vetrino (saltare questo passaggio se il vetrino fosse stato pretrattato secondo il protocollo precedente)

1. Caricare il campione cellulare su un vetrino da microscopia. Lasciare asciugare il vetrino. (**Facoltativo, 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 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. Prelevare 10 µL di sonda per ogni test e inserirli 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 del mix di sonde 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 temperatura ambiente.
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 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. L'utilizzo di un termometro calibrato è fortemente raccomandato 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

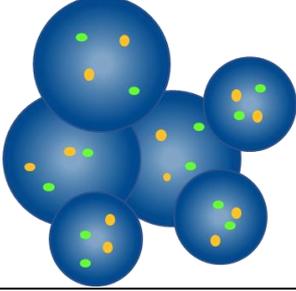
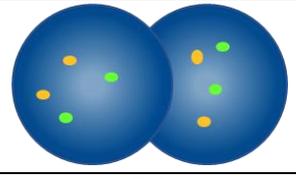
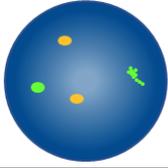
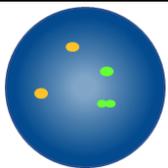
Il vetrino non deve essere analizzato se:

- 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
- > 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

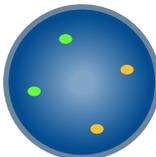
##### Linee guida di analisi

- 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
- Ogni analista deve valutare in modo indipendente una quantità sufficiente di nuclei da ciascun campione in modo che le valutazioni combinate degli analisti soddisfino i criteri minimi specificati dalle linee guida dell'istituto, 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
- Quando si analizzano sonde breakapart a due colori, se vi è uno spazio tra i segnali rosso e verde non più grande di 2 lunghezze di segnale, contare come segnale non riarrangiato/fuso

- Quando si analizzano sonde breakapart a tre colori, se vi è uno spazio tra qualsiasi dei 3 segnali (rosso, verde, blu) a distanza non maggiore di 2 lunghezze di segnale, contare come segnale non riarrangiato/fuso
- In caso di dubbio se la cellula sia analizzabile o meno, non effettuare l'analisi

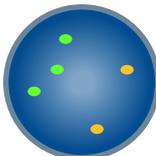
Linee guida di analisi	
	Non contare - nuclei troppo vicini l'un l'altro per determinare confini
	Non contare nuclei che si sovrappongono - tutte le aree di entrambi i nuclei non sono visibili
	Contare come due segnali arancioni e due segnali verdi - uno dei due verdi è diffuso
	Contare come due segnali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

##### Modello di segnale normale atteso

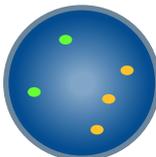


In una cellula normale, sono attesi due segnali verdi e due arancioni (2V2A).

##### Modello/i di segnale anormale atteso/i



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



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

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

##### Interferenze rilevanti note / sostanze interferenti

Non sono note interferenze rilevanti note / sostanze interferenti.

##### Reattività crociata nota

Nessuna reattività incrociata nota

## Segnalazione di incidenti gravi

Per un paziente/utilizzatore/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'utilizzo del presente dispositivo o in seguito al suo utilizzo si verificasse un incidente grave, si prega di segnalarlo al fabbricante o alla propria Autorità nazionale competente.

Per gli incidenti gravi verificatisi in altri Paesi, si prega di segnalarli al fabbricante e, se possibile, alla propria Autorità nazionale competente.

Contatto di vigilanza del fabbricante: [vigilance@ogt.com](mailto:vigilance@ogt.com)

Per le Autorità nazionali competenti europee, è possibile trovare un elenco di punti di vigilanza all'indirizzo:

[https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts\\_en](https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en)

## Caratteristiche specifiche di prestazione

### Specificità analitica

La specificità analitica è definita come percentuale di segnali che si ibridano al locus corretto e nessun'altra localizzazione. Sono stati analizzati quattro loci cromosomici in ciascuna delle 20 cellule metafasiche provenienti da cinque campioni, ottenendo 400 punti di dati. 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 moltiplicato per 100, espresso come percentuale e dato con un intervallo di confidenza del 95%.

Tavola 1. Specificità analitica per Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit

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

### Sensibilità analitica

La sensibilità analitica è la percentuale di cellule interfase cui è possibile fornire un punteggio con il modello di segnale normale atteso. È stato analizzato un minimo di 50 cellule in interfase per ciascuna delle 25 sospensioni cellulari fissate da campioni di liquido amniotico da maschi o femmine cariotipicamente normali con un complemento normale confermato dei cromosomi 13 e 21 mediante FISH o cariotipo, ottenendo come minimo la valutazione di 1250 nuclei di ciascun 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 2. Sensibilità analitica per Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit

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

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. È stato analizzato un minimo di 50 cellule in interfase per ciascuna delle 25 sospensioni cellulari fissate da campioni di liquido amniotico da maschi o femmine cariotipicamente normali con un complemento normale confermato dei cromosomi 13 e 21 mediante FISH o cariotipo, ottenendo come minimo la valutazione di 1250 nuclei di ciascun tipo di campione.

Il valore di cut off è stato determinato utilizzando la funzione  $\beta$ -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 3. Caratterizzazione dei valori normali di cut-off per Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit

Tipo di campione	Risultati di cut-off
Liquido amniotico	8,97%

I laboratori *devono* verificare i valori di cut-off utilizzando i propri dati e in conformità con le eventuali linee guida delle migliori pratiche di istituto, regionali o professionali che potrebbero essere applicate nel relativo contesto diagnostico <sup>6,7</sup>.

### Precisione

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 esaminare la precisione di questo prodotto sono stati utilizzati tre (3) campioni: uno di liquido amniotico normale, uno di liquido amniotico con trisomia del 13 positivo basso (3V2A) e uno di liquido amniotico con trisomia del 21 positivo basso (2V3A). I campioni di liquido amniotico positivi bassi sono stati prodotti artificialmente usando una frazione dei campioni di liquido amniotico normali e correggendola con un campione di liquido amniotico positivo noto, allo scopo di creare un campione positivo basso nell'intervallo di 2–4x il cut-off.

Per stabilire la precisione inter-giorno e intra-giorno, i campioni sono stati valutati in 10 giorni non consecutivi e per stabilire la precisione da lotto a lotto, sono stati valutati tre (3) lotti del prodotto su tre (3) repliche degli stessi campioni. I risultati sono stati presentati come l'accordo globale con la classe negativa prevista (per i campioni negativi).

Tavola 4. Riproducibilità e precisione per Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit

Variabile	Tipo di campione	Accordo
Precisione intra-giorno e inter-giorno	Liquido amniotico negativo	100%
	Liquido amniotico con trisomia del 13 positivo basso (3V2A)	100%
	Liquido amniotico con trisomia del 21 positivo basso (2V3A)	96,7%
Lot-to-lot intra-giorno e inter-giorno	Liquido amniotico negativo	88,9%
	Liquido amniotico con trisomia del 13 positivo basso (3V2A)	100%
	Liquido amniotico con trisomia del 21 positivo basso (2V3A)	100%

### Prestazione clinica

Per assicurarsi che il prodotto rilevi i riarrangiamenti desiderati, è stata stabilita la prestazione clinica nel corso di tre studi su campioni rappresentativi della popolazione prevista per il prodotto: Materiale residuo fissato in metanolo/acido acetico 3:1 da campioni di liquido amniotico prenatale. La dimensione dei campioni per questo studio era di 172 esemplari, con una popolazione di 15 esemplari positivi alla trisomia 13 e 157 negativi alla trisomia 13, e un totale di 109 esemplari 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 5. Prestazione clinica per Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit

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	0,00%

### Riepilogo sulla sicurezza e le prestazioni (SSP)

L'SSP deve essere reso disponibile al pubblico tramite il database europeo sui dispositivi medici (Eudamed), dove esso è collegato al Basic UDI-DI.

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

Basic UDI-DI: 50558449LPA003GL

Qualora Eudamed non fosse del tutto operativo, l'SSP deve essere reso disponibile al pubblico su richiesta tramite email all'indirizzo [SSP@ogt.com](mailto:SSP@ogt.com).

### Informazioni aggiuntive

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

T: +44 (0)1223 294048

E-mail: [techsupport@cytozell.com](mailto:techsupport@cytozell.com)

Sito web: [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

### Bibliografia

- Asim A, Kumar A et al. Down syndrome an insight of the Disease. Journal of Biomedical Science, 2015;22(41):1-9  
<https://www.orpha.net/>
- Gardner, R. and Amor, D. Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 5th ed: OUP USA, 2018
- Noriega MA, Siddik AB. s.l. Trisomy 13 : StatPearls[Internet], Treasure Island[FL], updated 2021.
- Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. Genet Med. 2011;13(7):667-675.
- Wiktor AE, 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.

## Glossario dei simboli

EN ISO 15223-1:2021 - "Dispositivi medici - Simboli da usare con le informazioni fornite 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 elettronico	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: Identificativo unico del dispositivo	5.7.10
Simboli EDMA per reagenti e componenti dell'IVD, revisione ottobre 2009		
Simbolo	Titolo	Numero/i di riferimento
	it: Contenuti (o contiene)	N/D

## 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

T: +44 (0)1223 294048  
F: +44 (0)1223 294986  
E-mail: [probes@cytoCell.com](mailto:probes@cytoCell.com)  
Sito web: [www.ogt.com](http://www.ogt.com)



**Sysmex Europe SE**  
Bornbarch 1  
22848 Norderstedt  
GERMANIA

T: +49 40 527260  
Sito web: [www.sysmex-europe.com](http://www.sysmex-europe.com)

## Cronologia delle versioni delle Istruzioni per l'uso (IFU)

V001.00 2023-01-11: Nuove Istruzioni per l'uso (IFU) per il Regolamento (UE) 2017/746.