



A Sysmex Group Company



Brugsanvisning

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

Prenatal Enumeration Probe Kit



KUN TIL ERHVERVSMÆSSIG BRUG



ogt.com/IFU

Yderligere information og andre sprog findes på ogt.com/IFU

Tilsigtet formål

CytoCell® Prenatal Enumeration Probe Kit er en kvalitativ, ikke-automatiseret *in situ*-hybridiseringstest med fluorescens (FISH), der bruges til at detektere kromosom Xp11.1-q11.1-, Yp11.1-q11.1- og 18p11.1-q11.1 alfa-centromerregionerne samt kromosom 13q14.2- og 21q22.1-regionerne i celler, der er fikseret med Carnoys opløsning (3:1 methanol/eddikesyre) fra fostervandsprøver ved optælling af kromosom X, Y, 13, 18 og 21 i højrisikograviditeter, hvor der er mistanke om Turner, Patau, Edwards eller Downs syndrom.

Anvisninger for brug

Denne enhed er designet som et supplement til andre kliniske tests og laboratorietests i anerkendte diagnostiske og kliniske forløb, såsom ultralydsscreening og biokemisk testning, hvor kendskab til koptantalsstatus for kromosom Xp11.1-q11.1 og 18p11.1-q11.1 alfa-centromerregionerne, kromosom 13q14.2- og 21q22.1-regionerne, ville være vigtig for patientbehandlingen.

Begrænsninger

Denne enhed er designet til at detektere kromosomalt materiale, som inkluderer de centromere regioner, der er dækket af de grønne, orange og aqua-kloner i Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe-komponenten for henholdsvis kromosom X, Y og 18. Genomske gevinster eller tab uden for disse regioner, eller delvise tab eller gevinster i disse regioner, kan muligvis ikke detekteres med denne enhed.

Denne enhed er også designet til at detektere kromosomalt materiale, som inkluderer kromosom 13q14.2- og 21q22.1-regionerne, der er dækket af de grønne og orange kloner i Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe-komponenten. Genomske gevinster eller tab uden for disse regioner, eller delvise tab eller gevinster i disse regioner, kan muligvis ikke detekteres med dette produkt.

Denne anordning er ikke beregnet til: brug som det eneste diagnostik, ledsagende diagnostik, populationsbaseret screening, test i nærheden af patienter eller selvtestning.

Denne enhed er ikke blevet valideret til prøvetyper, sygdomstyper eller formål ud over dem, der er angivet i det tilsigtede formål. Denne enhed er ikke blevet valideret til brug ved detektering af gevinster i kromosom X og/eller Y.

Denne anordning er beregnet til brug som supplement til andre diagnostiske laboratorietests, og en behandling bør ikke indledes udelukkende på grundlag af FISH-resultatet.

Rapportering og fortolkning af FISH-resultater skal udføres af egnet kvalificeret personale, i overensstemmelse med professionel standardpraksis, og bør tage hensyn til andre kliniske og diagnostiske informationer.

Denne enhed er kun beregnet til professionel laboratoriebrug.

Hvis protokollen ikke overholdes, kan det have indflydelse på funktionsevnen og føre til falsk positive/negative resultater.

Testens principper

Fluorescens *in situ*-hybridisering (FISH) er en teknik, der gør det muligt at detektere DNA-sekvenser på metafasekromosomer eller kerner i interfase i fikserede cytogenetiske prøver. Teknikken gør brug af DNA-prøver, som hybridiserer hele kromosomer eller enkelte unikke sekvenser, og er et stærkt supplement til klassisk cytogenetik. Nylige udviklinger har betydet, at denne værdifulde teknik nu kan anvendes som et essentielt diagnostisk værktøj i prænatal, hæmatologisk og patologisk kromosomal analyse. Mål-DNA'et er, efter fiksering og denaturering, klar

til hybridisering til en lignende denatureret, fluorescens-mærket DNA-probe med en komplementærsekvens. Efter hybridisering fjernes den ubundne og ikke-specifikt bundne DNA-probe, og DNA'et kontrastfarves med henblik på visualisering. Et fluorescensmikroskop gør det derefter muligt at visualisere den hybridiserede probe på mål-materialet.

Probe-information

Molekylær cytogenetisk analyse spiller en central rolle i den prænatale evaluering af højrisikograviditeter, da den muliggør nøjagtig identifikation af kromosomale abnormiteter og vurdering af risikoen for gentagelse. De mest almindelige kromosomale abnormiteter er aneuploidier, defineret som et unormalt antal kromosomkopier, hvor berørte individer typisk udviser trisomi (tre kopier af et kromosom) eller monosomi (enkelt kopi af et kromosom).¹ Velkendte klinisk signifikante aneuploidier omfatter trisomi 13, 18 og 21 samt monosomi X. Disse abnormiteter bidrager i væsentlig grad til udviklingsforstyrrelser og negative reproduktive udfald og er blandt de mest almindelige indikationer for invasiv prænatal diagnostik.²

Trisomi 21 (Downs syndrom), som er den mest almindelige levedygtige autosomale trisomi, er karakteriseret ved kognitiv svækkelse, medfødte hjertefejl og multisygdom og er fortsat en nøgleindikation for prænatal genetisk testning.^{3,4} Trisomi 13 (Patau syndrom) er karakteriseret ved hjememisdannelser (holoprosencefali), ansigtsdysmorfier, okulære misdannelser, postaksial polydaktyli, viscerale misdannelser (kardiopati) og alvorlig udviklingshæmning.⁵ Trisomi 18 (Edwards syndrom) er forbundet med alvorlige medfødte misdannelser, høj perinatal dødelighed og fænotyper, der er veldefinerede på ultralydsscanninger, hvilket understreger behovet for nøjagtig prænatal påvisning og genetisk bekræftelse.^{6,7} Monosomi X (Turners syndrom), også kaldet medfødt ovariehypoplasiasyndrom, er den mest almindelige kønskromosomale abnormalitet hos piger og skyldes fuldstændigt eller delvist fravær af ét X-kromosom.⁸ Prænatal diagnostik tilbydes ved højrisikograviditeter med øget risiko for kromosomale abnormiteter såsom trisomi 13, 18, 21 og monosomi X. FISH er en valideret molekylær cytogenetisk metode til hurtig detektion og optælling af kromosomkopier i kerner i interfase. FISH muliggør målrettet påvisning af almindelige aneuploidier og giver hurtige resultater til støtte ved klinisk beslutningstagning. Den anvendes i vid udstrækning i moderne aneuploididiagnostik, især hvor hurtig bekræftelse af kromosomkopiantalsstatus er påkrævet.^{9,10,11}

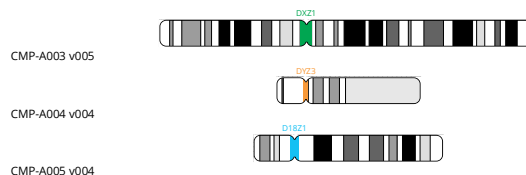
Probe-specifikation

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

X centromer, Xp11.1 – q11.1 (DXZ1) grøn

Y centromer, Yp11.1 – q11.1 (DYZ3) orange

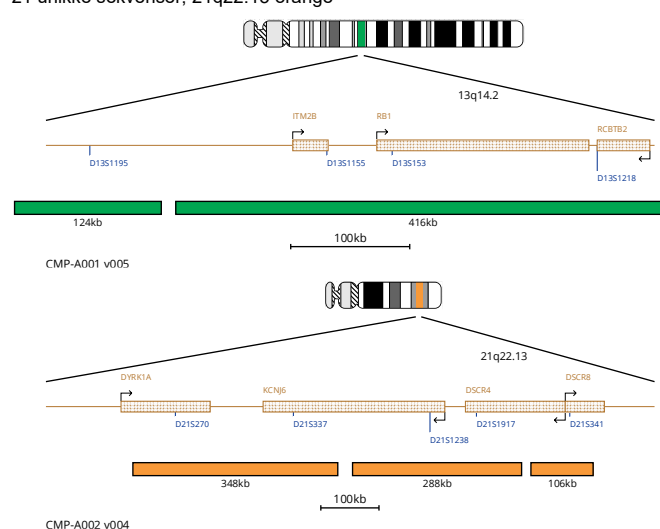
18 centromer, 18p11.1 – q11.1 (D18Z1) aqua



LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

13 unikke sekvenser, 13q14.2 grøn

21 unikke sekvenser, 21q22.13 orange



Kittet indeholder to probekomponenter til to separate hybridiseringer.

LPA002

Probekomponenten LPA002 er en blanding af direkte mærkede fluorescerende DNA-prober med grøn, orange og aqua:

- Den grønne DXZ1-probe mærker direkte alfa-satellit-DNA-sekvenserne i DXZ1-regionen på X-kromosomet.
- Den orange DYZ3-probe mærker direkte alfa-satellit-DNA-sekvenserne i DYZ3-regionen på Y-kromosomet.
- Den aqua-farvede D18Z1-probe mærker direkte alfa-satellit-DNA-sekvenserne i D18Z1-regionen på kromosom 18.

LPA003

Probekomponenten LPA003 er en blanding af grønt og orange direkte mærkede fluorescerende DNA-prober, der indeholder unikke sekvenser:

- Den grønne probeblanding indeholder en 124-kb probe og en 416-kb probe på 13q14.2, der spænder over ITM2B-, RB1- og RCBTB2-generne, inklusive markørerne D13S1195, D13S1155, D13S153 og D13S1218.
- Den orange probeblanding indeholder en 348-kb probe, en 288-kb probe og en 106-kb probe på 21q22.13, der spænder over DYRK1A-, KCNJ6-, DSCR4- og DSCR8-generne, inklusive markørerne D21S270, D21S337, D21S1238, D21S1917 og D21S341.

Medleveret materiale

Probe: 50 µL pr. hætteglas i kit med 5 tests, 100 µL pr. hætteglas i kit med 10 tests, 300 µL pr. hætteglas i kit med 30 tests, 500 µL pr. hætteglas i kit med 50 tests. Probekomponenterne leveres forblødet i hybridiseringsopløsning (<65 % formamid, <20 mg dextranulfat og <10 % 20x saltvand-natriumcitrat (SSC)) og er klar til brug.

Kontrastfarvning: 150 µL pr. hætteglas i kit med 5 tests, 500 µL pr. hætteglas i kit med 10 tests, 1000 µL pr. hætteglas i kit med 30 tests eller 1200 µL pr. hætteglas i kit med 50 tests. Kontrastfarvningen er DAPI Antifade ES (0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol) i glycerolbaseret monteringsmedium).

Advarsler og forsigtighedsregler

- Til brug til *in vitro*-diagnostik. Kun til professionel laboratoriebrug.
- Brugerne skal sikre, at den korrekte og mest aktuelle brugsanvisning læses og følges til enhver tid.
- Probe-blandinger indeholder formamid, som er teratogent: undgå hudkontakt og at indånde dampe. Håndtér med omtanke; bær handsker og laboratoriekittel.
- Håndtér DAPI med omtanke; bær handsker og laboratoriekittel.
- Må ikke anvendes, hvis hætteglasset er beskadiget, eller hætteglassets indhold er kompromitteret på nogen måde.
- Følg de lokale bortskaffelsesregler, hvor du arbejder, sammen med anbefalingerne i sikkerhedsdatabladet for at fastslå sikker bortskaffelse af dette produkt. Dette gælder også for beskadiget testkit-indhold.
- Bortskaf alle brugte reagenser og alle andre kontaminerede engangsmaterialer ved at følge retningslinjerne for håndtering af smittefarligt eller potentielt smittefarligt affald. Det er hvert laboratoriums ansvar at håndtere fast og flydende affald i henhold til dets art og grad af farlighed og at behandle og bortskaffe det (eller få det behandlet og bortskaffet) i overensstemmelse med gældende regler.
- Brugerne skal kunne skelne mellem farverne aqua, orange og grøn.
- Hvis den beskrevne protokol, det beskrevne udstyr og de beskrevne reagenser ikke overholdes, kan det have indflydelse på funktionsevnen og føre til falsk positive/negative resultater.
- Proben må ikke fortyndes eller blandes med andre prober.
- Hvis der ikke anvendes 10 µL af proben under præ-denatureringen, som beskrevet i protokollen, kan det have indflydelse på ydeevnen og føre til falsk positive/negative resultater.
- Alle produkter skal valideres før brug.
- Interne kontroller skal udføres ved at bruge upåvirkede cellepopulationer i testprøver.
- Der skal træffes forholdsregler for at forhindre kontaminering mellem de hætteglas, der indeholder LPA002 og LPA003.

Temperaturdefinitioner

- 20 °C /nedfrosset/ fryser: -25 °C til -15 °C
- 37 °C: +37 °C ± 1 °C
- 72 °C: +72 °C ± 1 °C
- 75 °C: +75 °C ± 1 °C
- Rumtemperatur (RT): +15 °C til +25 °C

Opbevaring og håndtering

 Kittet skal opbevares mellem -25 °C og -15 °C i en fryser indtil den udløbsdag, der er anført på kittets etiket. Proben og hætteglas med kontrastfarve skal opbevares mørkt.

 FISH-proben, DAPI Antifade ES-kontrastfarven og hybridiseringsopløsningen forbliver stabile under alle fryse-opthøningscyklusser i forbindelse med normal brug (hvor en cyklus omfatter probens udtagning fra og genindsætning i fryseren). **FISH-prober:** 5 cyklusser for kittet med 5 tests, 10 cyklusser for kittet med 10 tests, 30 cyklusser for kittet med 30 tests, 50 cyklusser for kittet med 50 tests. **Kontrastfarvning:** 10 cyklusser for kittet med 5 tests, 20 cyklusser for kittet med 10 tests, 60 cyklusser for kittet med 30 tests og 100 cyklusser for kittet med 50 tests. Udsættelse for lys skal begrænses til et minimum og helst helt undgås. Opbevar komponenterne i den medfølgende lystætte beholder. Komponenter, der anvendes og opbevares under andre forhold end dem, der er angivet på mærkningen, fungerer muligvis ikke som forventet og kan påvirke analyseresultaterne i negativ retning. Man skal bestræbe sig på at begrænse lyspåvirkning.

Nødvendigt udstyr og materialer, som ikke medleveres

Der skal anvendes kalibreret udstyr:

- Varmeplade (med en fast plade og nøjagtig temperaturkontrol op til 80 °C)
- Kalibrerede mikropipetter med variabel volumen og spidser fra 1 µL til 200 µL
- Vandbad med nøjagtig temperaturkontrol ved 37 °C og 72 °C
- Mikrocentrifugerør (0,5 ml)
- Fluorescensmikroskop (jf. anbefalingerne i kapitlet om fluorescensmikroskopi)
- Fasekontrast-mikroskop
- Rene plastik, keramiske eller varmeresistente Coplin-glas

- Tænger
- Kalibreret pH-Meter (eller pH-indikatorstrips, der kan måle pH 6,5-8,0)
- Befugtighedsbeholder
- Immersionssolie til fluorescensmikroskoplinser
- Bordcentrifuge
- Mikroskop-objektglas
- Dækglass på 24x24 mm
- Timer
- Inkubator på 37 °C
- Gummiopløsning (til forsegling af objektglas)
- Vortex-blander
- Måleglas
- Magnetomrører
- Kalibreret termometer

Valgfrit udstyr, der ikke medleveres

- Cytogenetisk tørrekammer

Nødvendige reagenser, der ikke medleveres

- 20x saltvand-natriumcitrat-(SSC)-opløsning
- 100 % ethanol
- Tween-20
- 1M natriumhydroxid (NaOH)
- 1M saltsyre (HCl)
- Renset vand

Anbefalinger til fluorescensmikroskopi

Der bør anvendes en 100-Watt kviksløv-lampe eller tilsvarende og olie-immersions-apochromat-objektiver, plan, 60/63 eller 100x for at opnå optimal visualisering. De fluoroforer, der benyttes i dette probekit, vil excitere og udsende lys ved følgende bølgelængder:

Fluoroforer	Excitation _{maks.} [nm]	Emission _{maks.} [nm]
Aqua	418	467
Grøn	495	521
Orange	551	572

Sørg for, at mikroskopet har passende excitations- og emissionsfiltre, som dækker de ovenfor nævnte bølgelængder.

Det tredobbelte båndpasfilter DAPI/FITC/TRITC er optimalt til at se de grønne og orange fluoroforer samt til samtidig kontrastfarvning. Aqua-fluoroforen har specificitet for Aqua- og DEAC-spektrret (enkelt Aqua- eller DEAC-båndpasfilter er påkrævet).

Efterprøv før brug, at fluorescensmikroskopet virker korrekt. Benyt immersionsolie, der er beregnet til fluorescensmikroskopi og formuleret til lav automatisk fluorescens. Undgå at blande DAPI-antifade med mikroskopi-immersionsolie, da det vil sløre signalerne. Følg fremstillerens anbefaling angående lampens levetid og filtrenes alder.

Prøveforberedelse

Kittet er designet til brug på celler, der er fikseret med Carnoy's opløsning (3:1 methanol/eddikesyre) og er udvundet fra fostervandsprøver, til optælling af kromosom X, Y, 13, 18 og 21 i højrisiko-graviditeter, hvor der er mistanke om Turner, Patau, Edwards eller Downs syndrom, og som er forberedt i henhold til laboratoriets eller institutionens retningslinjer. Indsamling af fostervandsprøver skal udføres i henhold til laboratoriets eller institutionens retningslinjer. Prøver, der ser blodige eller brune ud, må ikke anvendes, da de kan indeholde moderens blod og kan føre til falske resultater. Klargør lufttørrede prøver på objektglas i henhold til cytogenetiske standardprocedurer. AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* indeholder anbefalinger til prøveindsamling, -dyrkning, -høst og klargøring af objektglas.¹²

Klargøring af opløsning

Ethanolopløsninger

Fortynd 100 % ethanol med rensset vand ved at anvende følgende blandingsforhold, og bland omhyggeligt:

- 70 % ethanol - 7 dele 100 % ethanol til 3 dele rensset vand
- 85 % ethanol - 8,5 dele 100 % ethanol til 1,5 dele rensset vand

Opløsningerne kan opbevares i op til 6 måneder ved rumtemperatur i en lufttæt beholder.

2xSSC-opløsning

Fortynd 1 del 20xSSC-opløsning med 9 dele rensset vand, og bland omhyggeligt. Efterprøv pH-værdien, og justér til pH 7,0 ved at bruge NaOH eller HCl efter behov. Opløsningen kan opbevares i op til 4 uger ved rumtemperatur i en lufttæt beholder.

0,4xSSC-opløsning

Fortynd 1 del 20xSSC-opløsning med 49 dele rensset vand, og bland omhyggeligt. Efterprøv pH-værdien, og justér til pH 7,0 ved at bruge NaOH eller HCl efter behov. Opløsningen kan opbevares i op til 4 uger ved rumtemperatur i en lufttæt beholder.

2xSSC; 0,05 % Tween-20-opløsning

Fortynd 1 del 20xSSC-opløsning med 9 dele rensset vand. Tilsæt 5 µL Tween-20 pr. 10 ml, og bland omhyggeligt. Efterprøv pH-værdien, og justér til pH 7,0 ved at bruge NaOH eller HCl efter behov. Opløsningen kan opbevares i op til 4 uger ved rumtemperatur i en lufttæt beholder.

FISH-Protokol

(Bemærk: Probens eksponering for laboratorielys skal hele tiden begrænses så meget som muligt)

Forberedelse af objektglas

- 1. Dryp celleprøven på et objektglas. Lad det tørre. (Valgfrit, hvis der anvendes et cytotogenetisk tørrekammer: Tørrekammeret bør anvendes ved cirka 25 °C og 50 % luftfugtighed for at få optimale celleprøver. Hvis der ikke er et cytotogenetisk tørrekabinet til rådighed, kan der alternativt anvendes et stinkskab).
- 2. Nedsæk objektglasset i 2xSSC i 2 minutter ved rumtemperatur (RT) uden omrystning.
- 3. Dehydrér i ethanol i stigende koncentrationer (70 %, 85 % og 100 %), hver i 2 minutter ved RT.
- 4. Lad det tørre.

Præ-denaturering

- 5. Tag proben ud af fryseren, og lad den opnå RT. Centrifuger kort rørene inden brug.
- 6. Sørg for, at probeopløsningen er ensartet blandet med en pipette.
- 7. Udtag 10 µL af proben pr. test, og overfør det til et mikrocentrifugerør. Sæt hurtigt det resterende probemateriale tilbage i fryseren.
- 8. Sæt proben og prøveobjektglasset til opvarmning på en varmeplade ved 37 °C (+/- 1 °C) i 5 minutter.
- 9. Dryp 10 µL af probeblandingen på celleprøven, og dæk forsigtigt med et dækglas. Forsegel med gummiopløsning, og lad det tørre fuldstændigt.

Denaturering

- 10. Denaturér prøve og probe samtidigt ved at varme objektglasset på en varmeplade ved 75 °C (+/-1 °C) i 2 minutter.

Hybridisering

- 11. Anbring objektglasset i en fugtig, lystæt beholder ved 37 °C (+/-1 °C) natten over.

Vask efter hybridisering

- 12. Tag DAPI ud af fryseren, og lad det opnå RT.
- 13. Fjern omhyggeligt dækglasset og alle spor af gummiopløsningen.
- 14. Nedsæk objektglasset i 0,4xSSC (pH 7,0) ved 72 °C (+/- 1 °C) i 2 minutter uden omrystning.
- 15. Lad objektglasset tørre, og nedsæk det i 2xSSC, 0,05 % Tween-20 ved RT (pH 7,0) i 30 sekunder uden omrystning.
- 16. Lad objektglasset tørre, og tilsæt 10 µL DAPI-antifade på hver prøve.
- 17. Dæk med et dækglas, fjern alle eventuelle bobler, og lad farven udvikle sig i mørke i 10 minutter.
- 18. Undersøg med et fluorescensmikroskop (jf. **Anbefalinger til fluorescensmikroskopi**).

Anbefalinger til proceduren

- 1. Det kan nedsætte signalfluorescensen, hvis objektglassene får for meget varme eller er gamle
- 2. Hybridiseringsbetingelserne kan påvirkes negativt, hvis der bruges andre reagenser end dem, der anbefales eller leveres af Cytocell Ltd.
- 3. Der skal anvendes et kalibreret termometer til at måle temperaturerne i opløsninger, vandbade og inkubatorer, da disse temperaturer er vigtige for at opnå bedst mulige resultater.
- 4. Stringens ved vaskekoncentrationerne, pH og temperaturerne er vigtigt, da for lav stringens kan føre til ikke-specifik binding af proben, og for høj stringens kan føre til tab af signaler.
- 5. Ikke-komplet denaturering kan føre til tab af signaler, og for høj denaturering kan også føre til ikke-specifik binding.
- 6. Overhybridisering kan føre til yderligere eller uforventede signaler.
- 7. Brugerne skal optimere protokollen til egne prøver, før testen bruges til diagnostiske formål.
- 8. Suboptimale betingelser kan føre til ikke-specifik binding, som kan mistolkes som et probesignal.

Fortolkning af resultater

Vurdering af objektglaskvaliteten

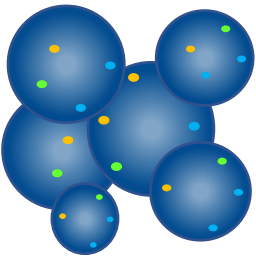
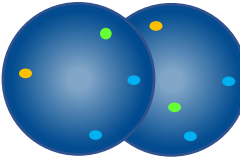
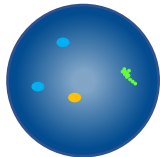
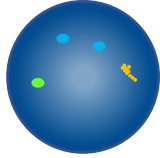
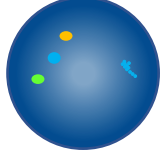
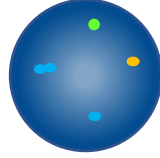
Objektglasset må ikke analyseres, hvis:

- signaler er for svage til, at de enkelte filtre kan analyseres - for at fortsætte med en analyse skal signaler være lyse, klare og nemme at vurdere
- der er et højt antal af klumpende/overlappende celler, som slører analysen
- >50 % af cellerne ikke er hybridiseret
- der er for mange fluorescenspartikler mellem cellerne og/eller en fluorescerende dis, der forstyrrer signalerne - optimale objektglas har en enten mørk eller sort og ren baggrund
- cellekernernes omrids ikke kan skelnes og ikke er intakte

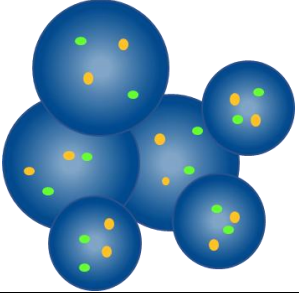
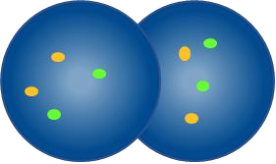
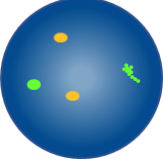
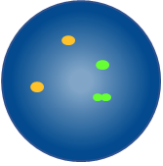
Analysevejledninger

- Der skal altid være to brugere til at analysere og fortolke hver prøve. Enhver diskrepans skal afklares ved en vurdering fra en tredje bruger
- Hver bruger skal have passende faglige kvalifikationer i overensstemmelse med anerkendte nationale standarder
- Hver analytiker skal uafhængigt bedømme tilstrækkeligt med kerner fra hver prøve, således at analytikernes samlede bedømmelser opfylder de minimumskriterier, der er angivet i institutionelle, regionale eller nationale retningslinjer. Den ene bruger starter analysen fra venstre side af objektglasset, og den anden bruger starter fra højre
- Brugerne skal dokumentere deres resultater skriftligt hver for sig

- Der skal kun analyseres intakte kerner, ingen overlappende eller klumpende kerner, der er dækket af cytoplasmisk debris eller har en høj grad af autofluorescens
- Undgå områder med overskud af cytoplasmisk debris eller ikke-specifik hybridisering
- Signalintensiteten kan variere, selv for den enkelte kerne. I sådanne tilfælde anvendes enkeltfiltre og/eller justering af det fokale plan
- Ved suboptimale betingelser kan signaler virke diffuse. Hvis to signaler med samme farve berører hinanden, eller afstanden mellem dem ikke er større end bredden på to signaler, eller hvis der er en svag streng, der forbinder de to signaler, tælles de som ét signal
- Hvis man er i tvivl, om en celle kan analyseres eller ej, så analyseres den ikke

Analysevejledninger – LPA002	
	Tæl ikke – cellekernerne er for tæt på hinanden til, at der kan bestemmes grænser
	Tæl ikke cellekerner, der overlapper hinanden – det er ikke alle områder af de to cellekerner, der er synlige
	Tæl som ét grønt signal, ét orange signal og to aqua-signaler – det grønne signal er diffust
	Tæl som ét grønt signal, ét orange signal og to aqua-signaler – det orange signal er diffust
	Tæl som ét grønt signal, ét orange signal og to aqua-signaler – et af de to aqua-signaler er diffust
	Tæl som ét grønt signal, ét orange signal og to aqua-signaler – mellemrummet i aqua-signalet er mindre end to probebredder

Analysevejledninger - LPA003

	Tæl ikke – cellekernerne er for tæt på hinanden til, at der kan bestemmes grænser
	Tæl ikke cellekerner, der overlapper hinanden – det er ikke alle områder af de to cellekerner, der er synlige
	Tæl som to orange og to grønne signaler – et af de to grønne signaler er diffust
	Tæl som to orange og to grønne signaler – hullet i et rødt signal er mindre end to signalers bredde

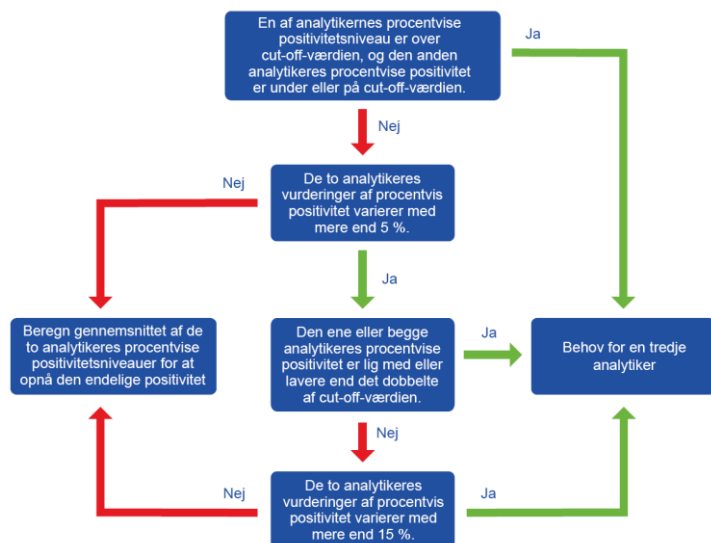
Krav til tredje analytiker

Alt efter hvor mange abnorme kerner hver bruger har set, kan det være nødvendigt med endnu en analytiker til analysen. Den tredje analytiker vil analysere det samme antal kerner som de to første analytikere, som angivet i institutionelle, regionale eller nationale retningslinjer. Reglerne for analyse med en tredje bruger er anført i teksten og flowchartet nedenfor.

Der kræves en tredje bruger, hvis:

- En af analytikernes procentvise positivitet er over cut-off-værdien, og de andre analytikeres procentvise positivitet er under eller på cut-off-værdien.
- De to analytikeres procentvise positivitet varierer med mere end 5 %, og den ene eller begge analytikeres procentvise positivitet er lig med eller lavere end det dobbelte af cut-off-værdien.
- De to analytikeres vurderinger af procentvis positivitet varierer med mere end 15 %.

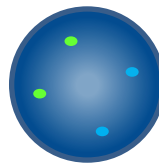
Af de tre opnåede bedømmelser vil de to nærmeste positive procentværdier være gennemsnittet for den endelige positivitet. Hvis de tre bedømmelser er lige langt fra hinanden, skal den positive middelværdi anvendes.



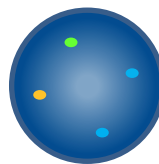
Forventede Resultater

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Forventede normale signalmønstre

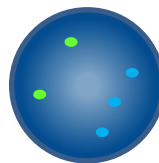


I en normal pigecelle forventes to grønne signaler og to aqua-signaler (2G2A).

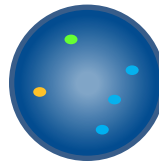


I en normal dregecelle forventes ét grønt, ét orange og to aqua-signaler (1G1O2A).

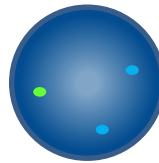
Forventede abnorme signalmønstre



I en pigecelle med trisomi 18 vil det forventede signalmønster være to grønne signaler og tre aqua-signaler (2G3A).



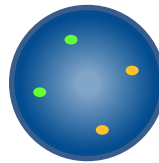
I en dregecelle med trisomi 18 vil det forventede signalmønster være ét grønt signal, ét orange signal og tre aqua-signaler (1G1O3A).



I en celle med Turners syndrom vil det forventede signalmønster være ét grønt signal og to aqua-signaler (1G2A).

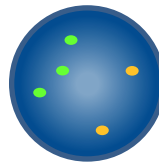
LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Forventet normalt signalmønster

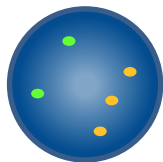


I en normal celle forventes to grønne og to orange signaler (2G2O).

Forventede abnorme signalmønstre



I en celle med trisomi 13 forventes tre grønne signaler og to orange signaler (3G2O).



I en celle med trisomi 21 forventes to grønne signaler og tre orange signaler (2G3O).

Andre signalmønstre er mulige i aneuploide/ubalancerede prøver.

Kendte relevante interferenser/interfererende stoffer

Ingen kendte relevante interferenser/interfererende stoffer.

Kendt krydsreaktion

DXZ1-proben kan vise krydsybridisering til centromererne på kromosom 1, 11, 17 og Y.

DYZ3-proben kan vise krydsybridisering til centromererne på kromosom 13, 14, 15, 20, 21, 22 og X.

D18Z1-proben kan vise krydsybridisering til centromererne på kromosom 2, 4, 8, 9, 13, 14, 15, 20, 21 og 22.

Indberetning af alvorlige hændelser

For en patient/bruger/tredjepart i Den Europæiske Union og i lande med identisk reguleringsregime (forordning (EU) 2017/746 om medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik); hvis der under brugen af denne enhed eller som følge af dens brug er opstået en alvorlig hændelse, bedes du indberette det til producenten og til din nationale kompetente myndighed.

For alvorlige hændelser i andre lande bedes du rapportere det til producenten og, hvis det er relevant, til din nationale kompetente myndighed.

Producentens vigilance-kontakt: vigilance@ogt.com

For EU's nationale kompetente myndigheder kan en liste med vigilance-kontaktsteder findes på

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

Særlige ydelseskarakteristika

Analytisk specificitet

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Analytisk specificitet er defineret som procentdelen af signaler, som kun hybridiserer til det korrekte locus og ingen anden lokalitet. Der blev analyseret 4 kromosomale loci i hver af 20 metafaseceller fra 5 prøver, hvilket gav 100 datapunkter for både kromosom X og Y og 200 datapunkter for kromosom 18. Lokationen for hver hybridiseret probe blev kortlagt, og antallet af FISH metafasekromosomsignaler, som hybridiseredes til det korrekte locus, blev registreret.

Den analytiske specificitet af hver probe i kittet blev beregnet som antallet af FISH-metafasekromosomsignaler, som hybridiseredes til det rette locus, delt med det samlede antal af hybridiserede FISH-metafasekromosomsignaler. Dette resultat blev udtrykt som en procentdel med et 95 % konfidensinterval.

Tabel 1. Analytisk specificitet for LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Mål	Antallet af hybridiserede metafasekromosomer	Antal korrekt hybridiserede loci	Analytisk specificitet	95 % konfidensinterval
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

Analytisk specificitet er defineret som procentdelen af signaler, som kun hybridiserer til det korrekte locus og ingen anden lokalitet. Der blev analyseret 4 kromosomale loci i hver af 20 metafaseceller fra 5 prøver, hvilket gav 200 datapunkter for både kromosom 13 og 21. Lokationen for hver hybridiseret probe blev kortlagt, og antallet af FISH metafasekromosomsignaler, som hybridiseredes til det korrekte locus, blev registreret.

Den analytiske specificitet af hver probe i kittet blev beregnet som antallet af FISH-metafasekromosomsignaler, som hybridiseredes til det rette locus, delt med det samlede antal af hybridiserede FISH-metafasekromosomsignaler. Dette resultat blev udtrykt som en procentdel med et 95 % konfidensinterval.

Tabel 2. Analytisk specificitet for LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Mål	Antallet af hybridiserede metafasekromosomer	Antal korrekt hybridiserede loci	Analytisk specificitet	95 % konfidensinterval
13q14.2	200	200	100 %	98,12 % - 100 %
21q22.1	200	200	100 %	98,12 % - 100 %

Analytisk sensitivitet

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Analytisk sensitivitet er procentdelen af de celler i interfase, der kan tælles med det forventede normale signalmønster. Der blev analyseret mindst 50 celler i interfase for hver af 25 fikserede cellesuspensioner fra fostervandsprøver fra karyotypisk normale drenge og 25 karyotypisk normale piger, der blev vurderet til at have et normalt komplement af kromosom 18, hvilket resulterede i en samlet bedømmelse af mindst 2.500 kerner. Følsomhedsdata blev analyseret på grundlag af procentdelen af celler, der viste et normalt, forventet signalmønster, og blev udtrykt som en procentdel med et konfidensinterval på 95 %.

Tabel 3. Analytisk sensitivitet for LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Prøvetype	Sensitivitetskriterier	Sensitivitetsresultater
Fostervand	>95 %	95,99 % (95,15-96,69 %)

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Analytisk sensitivitet er procentdelen af de celler i interfase, der kan tælles med det forventede normale signalmønster. Der blev analyseret mindst 50 celler i interfase for hver af 25 fikserede cellesuspensioner fra fostervandsprøver fra karyotypisk normale drenge eller piger, der blev vurderet til at have et normalt komplement af kromosom 13 og 21, hvilket resulterede i en samlet bedømmelse af mindst 1.250 kerner for hver prøvetype. Følsomhedsdata blev analyseret på grundlag af procentdelen af celler, der viste et normalt, forventet signalmønster, og blev udtrykt som en procentdel med et konfidensinterval på 95 %.

Tabel 4. Analytisk sensitivitet for LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Prøvetype	Sensitivitetskriterier	Sensitivitetsresultater
Fostervand	>95 %	96,24 % (94,84-97,64 %)

Karakterisering af normale cut-off-værdier

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Normalt cut-off er defineret som procentdelen af celler, der udviser et falskt-positivt signalmønster, der fører til, at det hos en person ville blive betragtet som normalt og ikke svarer til en klinisk diagnose. Der blev analyseret mindst 50 celler i interfase for hver af 25 fikserede cellesuspensioner fra fostervandsprøver fra karyotypisk normale drenge og 25 karyotypisk normale piger, der blev vurderet til at have et normalt komplement af kromosom 18, hvilket resulterede i en samlet bedømmelse af mindst 2.500 kerner.

Cut-off-værdien blev bestemt ved brug af β -invers-funktionen (BETAINV) i MS Excel. Den blev beregnet som procentdelen af celler i interfase, der viste et falskt-positivt signalmønster ved brug af den øvre grænse af et en-sidet konfidensinterval på 95 % af den binominale fordeling i en normal patientprøve.

Tabel 5. Karakterisering af normale cut-off-værdier for LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Prøvetype	Signalmønster	Cut-off-resultater
Fostervand	1G1O3A	11,62 %
	2G3A	8,97 %
	1G2A	13,98 %

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Normalt cut-off er defineret som procentdelen af celler, der udviser et falskt-positivt signalmønster, der fører til, at det hos en person ville blive betragtet som normalt og ikke svarer til en klinisk diagnose. Der blev analyseret mindst 50 celler i interfase for hver af fostervandsellesuspensionerne fra 25 karyotypisk normale drenge eller piger, hvilket resulterede i bedømmelse af mindst 1.250 kerner for hver prøvetype.

Cut-off-værdien blev bestemt ved brug af β -invers-funktionen (BETAINV) i MS Excel. Den blev beregnet som procentdelen af celler i interfase, der viste et falskt-positivt signalmønster ved brug af den øvre grænse af et en-sidet konfidensinterval på 95 % af den binominale fordeling i en normal patientprøve.

Tabel 6. Karakterisering af normale cut-off-værdier for LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Prøvetype	Signalmønster	Cut-off-resultater
Fostervand	2G3O	8,97 %
	3G2O	

Laboratorier skal verificere cut-off-værdier ved at bruge deres egne data.^{13,14}

Præcision

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Præcisionen af dette produkt er blevet målt i forhold til præcision på samme dag (prøve til prøve) præcision mellem forskellige dage (dag til dag) og præcision mellem forskellige lots målt på samme hospital (lot til lot).

Der blev anvendt tre prøver til at vurdere produktets præcision: Én normal fostervandsprøve fra dreng vurderet som XY og med et normalt komplement af kromosom 18, én normal fostervandsprøve fra pige vurderet som XX og med et normalt komplement af kromosom 18, og én lavt trisomi 18-positiv fostervandsprøve fra pige.

Præcisionen mellem forskellige dage og på samme dag blev evalueret ved at teste prøver i tredobbelt bestemmelse på 10 ikke-fortløbende dage. Lot til lot-præcision blev evalueret ved at teste tre uafhængige produktlots i tredobbelt bestemmelse med de samme prøver. Resultaterne blev udtrykt som generel overensstemmelse med den forventede klassificering (positiv eller negativ).

Tabel 7. Reproducibarhed og præcision for LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Variabel	Prøvetype	Overensstemmelse
På samme dag	Negativt fostervand fra pige	100,0 %
	Fostervand fra pige med trisomi 18	90,0 %
Mellem forskellige dage	Negativt fostervand fra pige	100,0 %
	Fostervand fra pige med trisomi 18	90,0 %
	Negativt fostervand fra dreng	100,0 %
Mellem forskellige lots	Negativt fostervand fra pige	100,0 %
	Fostervand fra pige med trisomi 18	100,0 %
	Negativt fostervand fra dreng	100,0 %

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Præcisionen af dette produkt er blevet målt i forhold til præcision på samme dag (prøve til prøve) præcision mellem forskellige dage (dag til dag) og præcision mellem forskellige lots målt på samme hospital (lot til lot).

Der blev anvendt tre prøver til at vurdere produktets præcision: En normal fostervandsprøve vurderet til at have et normalt komplement af kromosom 13 og 21, én lavt trisomi 13-positiv fostervandsprøve og én lavt trisomi 21-positiv fostervandsprøve.

Præcisionen mellem forskellige dage og på samme dag blev evalueret ved at teste prøver i tredobbelt bestemmelse på 10 ikke-fortløbende dage. Lot til lot-præcision blev evalueret ved at teste tre uafhængige produktlots i tredobbelt bestemmelse med de samme prøver. Resultaterne blev udtrykt som generel overensstemmelse med den forventede klassificering (positiv eller negativ).

Tabel 8. Reproducibarhed og præcision for LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Variabel	Prøvetype	Overensstemmelse
På samme dag og mellem forskellige dage	Negativt fostervand	100,0 %
	Fostervand med lav positivitet for trisomi 13	100,0 %
	Fostervand med lav positivitet for trisomi 21	96,7 %
Mellem forskellige lots	Negativt fostervand	88,9 %
	Fostervand med lav positivitet for trisomi 13	100,0 %
	Fostervand med lav positivitet for trisomi 21	100,0 %

Klinisk ydeevne

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

For at sikre, at Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe registrerer tilsigtede omlejringer, blev den kliniske ydeevne fastslået i én undersøgelse af repræsentative prøver af den tilsigtede population for produktet: Resterende 3:1 methanol/eddikesyre-fikseret materiale fra prænatale fostervandsprøver. Stikprøvestørrelsen til undersøgelsen var 71 prøver, med en population på 3 trisomi 18-positiv prøver, 2 monosomi X-positiv prøver og 66 negative prøver. Alle prøver blev afidentificeret og randomiseret for at forebygge analysebias. Resultaterne blev derefter sammenlignet med den kendte status for prøven. Proben identificerede korrekt status for alle prøver i alle instanser.

Resultatet af disse tests blev analyseret for at se klinisk følsomhed, klinisk specificitet og værdier for falsk-positiv-raten (FPR) af positive signaler ved brug af en endimensional fremgangsmåde.

Tabel 9. Klinisk ydeevne for Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Variabel	Resultat
Klinisk sensitivitet (sand positiv rate, TPR [True Positive rate])	100,0 %
Klinisk specificitet (sand negativ rate, TNR [True Negative rate])	100,0 %
Falsk positiv rate (FPR, False Positive rate) = 1 – Specificitet	0,0 %

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

For at sikre, at Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe registrerer tilsigtede omlejringer, blev den kliniske ydeevne fastslået i tre undersøgelser af repræsentative prøver af den tilsigtede population for produktet: Resterende 3:1 methanol/eddikesyre-fikseret materiale fra prænatale fostervandsprøver. Stikprøvestørrelsen til undersøgelsen var 172 prøver, med en population på 15 trisomi 13-positiv og 157 trisomi 13-negativ prøver og i alt 109 trisomi 21-

positive og 63 trisomi 21-negativ prøver. Resultaterne blev derefter sammenlignet med den kendte status for prøven. Proben identificerede korrekt status for alle prøver i alle instanser.

Resultatet af disse tests blev analyseret for at se klinisk følsomhed, klinisk specificitet og værdier for falsk-positiv-raten (FPR) af positive signaler ved brug af en endimensional fremgangsmåde.

Tabel 10. Klinisk ydeevne for Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Variabel	Resultat
Klinisk sensitivitet (sand positiv rate, TPR [True Positive rate])	100,0 %
Klinisk specificitet (sand negativ rate, TNR [True Negative rate])	100,0 %
Falsk positiv rate (FPR, False Positive rate) = 1 – Specificitet	0,0 %

Oversigt over sikkerhed og ydeevne (SSP)

SSP'en skal gøres tilgængelig for offentligheden via den europæiske database for medicinsk udstyr (Eudamed), hvor knyttes til den grundlæggende UDI-DI. Eudamed URL: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> Grundlæggende UDI-DI: 50558449LPA001GG

Hvis Eudamed ikke er fuldt funktionelt, skal SSP'en stilles til rådighed for offentligheden efter anmodning via e-mail til SSP@ogt.com.

Yderligere information

Kontakt Cytocell Technical Support Department, hvis du ønsker yderligere produktinformationer.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytocell.com
W: www.ogt.com

Referencer

- Alliance G.(2010). Chromosomal Abnormalities [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK132134/>.
- Dey M, et al., (2013). Prenatal screening methods for aneuploidies. North American Journal of Medical Sciences.
- Antonarakis SE, Strydom A., (2020). Down Syndrome. Nature Reviews Disease Primers.
- Orphanet: Down syndrome [Internet]. www.orpha.net. Available from: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/870>.
- Orphanet: Trisomy 13 [Internet]. www.orpha.net. Available from: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/3378>.
- Pyle AK, et al. (2025) Guidance for Caring for Infants and Children With Trisomy 13 and Trisomy 18: Clinical Report. PEDIATRICS.
- 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/>.
- Shankar Kikkeri N, et al., (2023). Turner Syndrome; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554621/>.
- Best Practice Guidelines (2024). The Association for Clinical Genomic Science (ACGS). Cytogenetics Constitutional Guidelines.
- NHS England - National genomic test directory for rare and inherited disease. Available from: <https://www.england.nhs.uk/publication/national-genomic-test-directories/>
- Silva M. et al. (2019) European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. European Journal of Human Genetics.
- Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc. References
- 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.

Symboler Ordliste

EN ISO 15223-1:2021 - "Medicinsk udstyr - Symboler, der skal bruges sammen med oplysninger, der skal leveres af producenten - Del 1: Generelle krav" (© International Organisation for Standardization)		
Symbol	Titel	Referencenummer (-numre)
	da: Fremstiller	5.1.1
	da: Autoriseret repræsentant i Det Europæiske Fællesskab/Den Europæiske Union	5.1.2
	da: Sidste anvendelsesdato	5.1.4

LOT	da: Batch-kode	5.1.5
REF	da: Katalognummer	5.1.6
	da: Holdes væk fra sollys	5.3.2
	da: Temperaturgrænse	5.3.7
	da: Se brugsanvisningen	5.4.3
 ogt.com/IFU	da: Se den digitale brugsanvisning	5.4.3
	da: Forsigtig	5.4.4
IVD	da: Medicinsk udstyr til <i>in vitro</i> -diagnostik	5.5.1
	da: Indeholder tilstrækkeligt til <n> tests	5.5.5
UDI	da: Unikt enheds-id	5.7.10
EDMA-symboler for IVD-reagenser og -komponenter, revideret i oktober 2009		
Symbol	Titel	Referencenummer (-numre)
CONT	da: Indhold (eller indeholder)	Ikke tilgængeligt/relevant

Patenter og varemærker

CytoCell er et registreret varemærke tilhørende CytoCell Limited.



Cytocell Limited
Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road,
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
DET FORENEDE KONGERIGE

T: +44 (0)1223 294048
E: probes@cytoCell.com
W: www.ogt.com



Sysmex Europe SE
Deelböge 19 D
22297 Hamborg
TYSKLAND

W: www.sysmex-europe.com

Historik for version af brugsanvisningen

V001 2026-03-09: Ny brugsanvisning tilpasset forordning (EU) 2017/746.