



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika (IFU)

REF: CE-LPA 003-S / CE-LPA 003

Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO



Dalsze informacje oraz dokumenty w innych językach są dostępne pod adresem ogt.com/IFU

Przeznaczenie

Produkt CytoCell® Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit to jakościowy, nieautomatyzowany test wykonywany metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) przeznaczony do detekcji regionu chromosomowego 13q14.2 i regionu chromosomowego 21q22.1 w utrwalonych w roztworze Carnoya (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1) komórkach uzyskanych z próbek płynu owodniowego w celu zliczania chromosomów 13. i 21. w ciążyach wysokiego ryzyka z podejrzeniem zespołu Downa lub zespołu Patau.

Wskazania do stosowania

Ten wyrób zaprojektowano jako produkt uzupełniający inne testy kliniczne i laboratoryjne wykonywane w ramach przyjętych ścieżek diagnostycznych i opieki klinicznej, takich jak przesiewowe badania ultrasonograficzne i testy biochemiczne, w przypadku których znajomość statusu liczby kopii regionu chromosomowego 13q14.2 i regionu chromosomowego 21q22.1 w istotny sposób wpływałaby na postępowanie kliniczne.

Ograniczenia

Ten wyrób jest przeznaczony do wykrywania materiału chromosomowego, regionu chromosomowego 13q14.2 i regionu chromosomowego 21q22.1, do których wiążą się odpowiednio zielone i pomarańczowe klony zawarte w tym zestawie sond. Wyrób ten może nie umożliwić wykrycia naddatków lub ubytków, do których doszło poza tymi regionami, lub częściowych naddatków lub ubytków, do których doszło w tych regionach.

Ten wyrób nie jest przeznaczony do użytku jako samodzielny test diagnostyczny, jako towarzyszący test diagnostyczny, do populacyjnych badań przesiewowych, badań przyłóżkowych ani do samotestowania i nie został zatwierdzony do stosowania dla typów próbek, chorób ani celów innych niż określone w części dotyczącej przeznaczenia.

Wyrób ten należy traktować jako uzupełnienie innych diagnostycznych testów laboratoryjnych. Z tego względu nie należy inicjować żadnych działań terapeutycznych wyłącznie na podstawie wyniku uzyskanego metodą FISH.

Raportowanie i interpretacja wyników metody FISH powinny być przeprowadzane przez personel posiadający odpowiednie kwalifikacje, zgodne z profesjonalnymi standardami praktyki i dokonywane z uwzględnieniem innych istotnych wyników testów, informacji klinicznych i diagnostycznych.

Ten wyrób jest przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego w laboratorium. Nieprzestrzeganie protokołu może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.

Zasady działania testu

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują do całych chromosomów lub pojedynczych unikalnych sekwencji, i

stanowi istotne uzupełnienie cytogenetycznej analizy prążków G. Technika ta może być obecnie wykorzystywana jako kluczowe narzędzie diagnostyczne w chromosomalnych analizach prenatalnych, hematologicznych i guzów litych. Docelowa sekwencja DNA, po utrwaleniu i denaturacji, staje się dostępna do przyłączenia do zdenaturowanej w podobny sposób, fluorescencyjnie wyznakowanej sondy DNA o sekwencji komplementarnej. Po hybrydyzacji niezwiązane i nieswoicie związane sondy DNA są usuwane, a DNA jest barwiony kontrastowo w celu jego uwidocznienia. Sondy zhybrydyzowane do materiału docelowego można następnie obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Informacje o sondzie

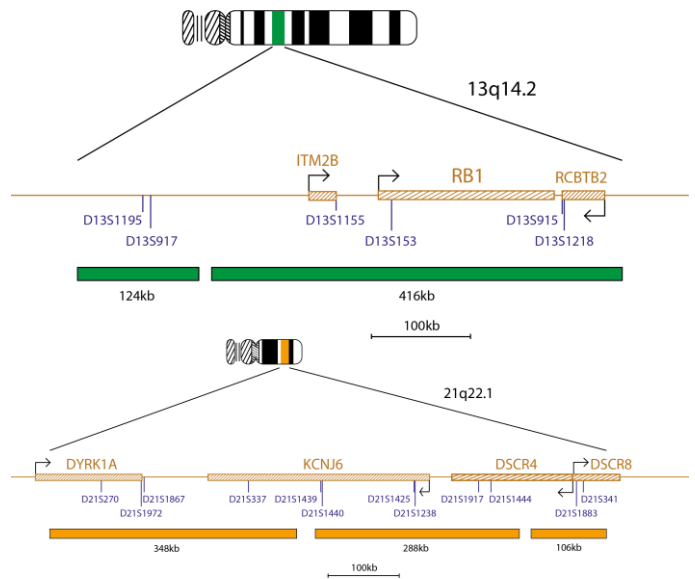
Zespół Downa (Down Syndrome, DS) to trisomia chromosomu autosomalnego powodowana obecnością trzeciej kopii (części lub całego) chromosomu 21. Zespół ten charakteryzuje się różnym stopniem niepełnosprawności intelektualnej, hipotonią mięśniową i wiotkością stawów i często powiązany jest z charakterystycznymi cechami dysmorficznymi twarzy, a także różnymi nieprawidłowościami, takimi jak wady serca, przewodu pokarmowego, nerwowo-cuciowe lub układu hormonalnego^{1,2}. Zespół Downa jest wiodącą przyczyną niepełnosprawności intelektualnej na całym świecie. Pacjenci z tym zespołem cierpią również na różne problemy zdrowotne, w tym trudności z uczeniem się i zapamiętywaniem, wrodzone wady serca (Congenital Heart Diseases, CHD), chorobę Alzheimera (Alzheimer's Diseases, AD), białaczki, różne typy raków oraz chorobę Hirschsprunga (Hirschsprung Disease, HD)¹. Zespół Downa charakteryzuje się wysoką złożonością genetyczną i zmiennością fenotypową¹. Częstość występowania zespołu Downa w 16. tygodniu ciąży wynosi 1 na 1050 w przypadku matek w wieku 20 lat, 1 na 620 w przypadku matek w wieku 30 lat i 1 na 70 w przypadku matek w wieku 40 lat³.

Zespół Patau (Patau Syndrome, PS) to anomalia chromosomowa spowodowana obecnością dodatkowego chromosomu 13. i charakteryzująca się wadami mózgu (holoprocencefalia), cechami dysmorficznymi twarzy, anomaliami oczu, polidaktylią postaksjalną, wadami trzewi (kardiopatia) i ciężkim opóźnieniem rozwoju psychomotorycznego². Zespół Patau jest związany z fenotypową holoprocencefalią i nieprawidłowościami fuzji linii środkowej z powodu wadliwej fuzji mezodermy przedstrunowej w stadium embrionalnym⁴. Częstość występowania zespołu Patau w 16. tygodniu ciąży wynosi 1 na 11 000 w przypadku matek w wieku 20 lat, 1 na 6500 w przypadku matek w wieku 30 lat i 1 na 700 w przypadku matek w wieku 40 lat³.

Specyfikacja sondy

Unikalna sekwencja chromosomu 13., 13q14.2, kolor zielony

Unikalna sekwencja chromosomu 21., 21q22.1, kolor pomarańczowy



Mieszanina sond wyznakowanych zielonym fluoroforem zawiera sondę o długości 124 kb i sondę o długości 416 kb i obejmuje geny *ITM2B*, *RB1* i *RCBTB2*. Mieszanina sond wyznakowanych pomarańczowym fluoroforem obejmuje region 21q22.1 od genu *DYRK1A* do genu *DSCR8*.

Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów).

Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydyzacyjnym (formamid <65%; siarczan dekstranu <20 mg; 20x stężony roztwór soli fizjologicznej i cytrynianu sodu (SSC) <10%) i są gotowe do użycia.

Barwnik kontrastowy: 150 µl na fiolkę (15 testów)

Barwnikiem kontrastowym jest odczynnik DAPI Antifade ES (0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol) w środku do zamykania na bazie glicerolu).

Ostrzeżenia i środki ostrożności


- Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego w laboratorium.
- Mieszaniny sond zawierają formamid, który wykazuje działanie teratogenne; nie wdychać oparów i nie dopuszczać do kontaktu ze skórą. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny.

- Zachować ostrożność podczas pracy z barwnikiem DAPI; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny.
- Nie używać produktu, jeśli fiolka jest uszkodzona lub jej zawartość została w jakikolwiek sposób naruszona.
- W celu bezpiecznego usuwania tego produktu należy postępować zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi usuwania odpadów oraz zaleceniami zawartymi w karcie charakterystyki (SDS). Dotyczy to również zawartości uszkodzonego zestawu do testów.
- Wszystkie zużyte odczynniki oraz wszelkie inne zanieczyszczone materiały jednorazowe należy usuwać zgodnie z procedurami obowiązującymi dla odpadów zakaźnych lub potencjalnie zakaźnych. Każde laboratorium jest odpowiedzialne za postępowanie z odpadami stałymi i płynnymi stosownie do ich właściwości i stopnia zagrożenia oraz przetwarzanie i usuwanie ich (lub zlecenie ich przetwarzania i usuwania) zgodnie z wszelkimi obowiązującymi przepisami.
- Operatorzy muszą być w stanie rozróżnić czerwony, niebieski i zielony kolor.
- Nieprzestrzeganie wskazanego protokołu oraz nieużywanie właściwych odczynników może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.
- Nie należy rozcieńczać sondy ani mieszać jej z innymi sondami.
- Niezastosowanie 10 µl sondy podczas fazy denaturacji wstępnej wykonywanej w ramach protokołu może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.
- Przed użyciem produktów należy poddać je walidacji.
- Kontrole wewnętrzne należy przeprowadzać z wykorzystaniem populacji prawidłowych komórek dostępnych w badanych próbkach.

Definicje temperatur

- 20°C / stan zamrożony / w zamrażarce: od -25°C do -15°C
- 37°C: +37°C ±1°C
- 72°C: +72°C ±1°C
- 75°C: +75°C ±1°C
- Temperatura pokojowa: od +15°C do +25°C

Przechowywanie i postępowanie z produktem

 Zestaw należy przechowywać w zamrażarce w temperaturze od -25°C do -15°C do daty ważności wskazanej na etykiecie zestawu. Fiolki z sondami i barwnikiem kontrastowym należy przechowywać w ciemności.



Sonda do badań techniką FISH, barwnik kontrastowy DAPI Antifade ES oraz roztwór hybrydacyjny zachowują stabilność przez wszystkie cykle zamrażania i rozmrażania wykonywane podczas standardowego użytkowania produktów (jeden cykl jest definiowany jako wyjęcie fiolki z zamrażarki i ponowne umieszczenie jej w zamrażarce) — 5 cykli w przypadku fiolki zawierającej 50 µl (5 testów) sondy FISH, 10 cykli w przypadku fiolki zawierającej 100 µl (10 testów) sondy FISH i 15 cykli w przypadku fiolki zawierającej 150 µl (15 testów) barwnika kontrastowego. Należy zminimalizować i możliwie ograniczyć ekspozycję produktów na światło. Przechowywać elementy zestawu w dostarczonym pojemniku nieprzepuszczającym światła. Użyte elementy zestawu, które przechowywano w warunkach innych niż wskazane na etykietach, mogą nie działać zgodnie z oczekiwaniami i negatywnie wpłynąć na wyniki oznaczenia. Należy dołożyć wszelkich starań, aby ograniczyć ekspozycję produktów na światło i zmiany temperatury.

Sprzęt i materiały wymagane, ale niedostarczane

Należy używać następującego skalibrowanego sprzętu:

- Płyta grzewcza (ze stabilną płytą i możliwością dokładnej kontroli temperatury do 80°C)
- Skalibrowane mikropipety i końcówki umożliwiające przenoszenie różnych objętości cieczy w zakresie 1–200 µl
- Łażnia wodna z możliwością dokładnej kontroli temperatury na poziomie 37°C i 72°C
- Probówki mikrowirówkowe (0,5 ml)
- Mikroskop fluorescencyjny (patrz część „Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego”)
- Mikroskop z kontrastem fazowym
- Czyste barwiacze Coplina z tworzywa sztucznego, ceramiki lub szkła żaroodpornego
- Szczypczyki
- Skalibrowany pH-metr (lub papierki wskaźnikowe pH umożliwiające pomiar pH w zakresie 6,5–8,0)
- Pojemnik zapewniający dużą wilgotność powietrza
- Olejek imersyjny odpowiedni do obiektów mikroskopowych klasy fluorescencyjnej
- Wirówka laboratoryjna
- Szkiełka mikroskopowe
- Szkiełka nakrywkowe o wymiarach 24x24 mm
- Stoper
- Inkubator nastawiony na temperaturę 37°C
- Klej kauczukowy
- Wytrząsarka
- Cylindry miarowe
- Mieszadło magnetyczne
- Skalibrowany termometr

Opcjonalny sprzęt niedostarczany

- Komora do suszenia próbek do badań cytoogenetycznych

Odczynniki wymagane, ale niedostarczane

- Roztwór soli fizjologicznej i cytrynianu sodu (SSC), 20x

- Etanol, 100%
- Tween-20
- Wodorotlenek sodu (NaOH), 1 M
- Kwas solny (HCl), 1 M
- Woda oczyszczona

Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego

W celu optymalnej wizualizacji sondy zalecane jest używanie 100-watowej lampy rtęciowej lub równoważnej lampy i obiektów planapochromatycznych umożliwiających stosowanie oleju imersyjnego przy powiększeniu 60/63x lub 100x. Fluorofory użyte w tym zestawie sond charakteryzują się następującymi długościami fal wzbudzenia i emisji:

Fluorofor	Wzbudzenie _{maks.} [nm]	Emisja _{maks.} [nm]
Zielony	495	521
Pomarańczowy	551	572

Należy upewnić się, że w mikroskopie zamontowane są odpowiednie filtry wzbudzenia i emisji, które obejmują wymienione powyżej długości fal. Do jednoczesnej obserwacji zielonego i pomarańczowego fluoroforu i barwnika kontrastowego optymalnie nadaje się potrójny filtr pasmowo-przepustowy DAPI/FITC/TRITC. Do jednoczesnej obserwacji fluoroforów i barwnika DAPI można również użyć potrójnego filtra pasmowo-przepustowego DAPI/FITC/Texas Red.

Przed użyciem mikroskopu fluorescencyjnego należy sprawdzić, czy działa on prawidłowo. Należy stosować olejek imersyjny odpowiedni do mikroskopii fluorescencyjnej o składzie odpowiednim do niskiej autofluorescencji. Należy unikać mieszania barwnika DAPI antifade z mikroskopowym olejem imersyjnym, ponieważ spowoduje to zaciemnienie sygnałów. Należy przestrzegać zaleceń wytwórcy dotyczących okresu żywotności lampy i wieku filtrów.

Przygotowanie próbek

Zestaw jest przeznaczony do stosowania na utrwalonych w roztworze Carnoya (metanol/kwas octowy w stosunku 3:1) komórkach uzyskanych z próbek płynu owodniowego w celu zliczania chromosomów 13. i 21. w ciążach wysokiego ryzyka z podejrzeniem zespołu Downa lub zespołu Patau. Komórki należy przygotować zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w laboratorium lub placówce. Próbkę płynu owodniowego należy pobrać zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w laboratorium lub placówce. Nie należy używać próbek, które wydają się krwawe lub brązowe, ponieważ mogą one zawierać krew matki, co może doprowadzić do uzyskania fałszywych wyników. Należy przygotować próbki suszone na powietrzu na szkiełkach mikroskopowych zgodnie ze standardowymi procedurami cytogenetycznymi. Podręcznik AGT *Cytogenetics Laboratory Manual* zawiera zalecenia dotyczące pobierania próbek, prowadzenia hodowli komórek, zbierania komórek z hodowli oraz przygotowywania preparatów⁵.

Przygotowanie roztworów

Roztwory etanolu

Rozcieńczyć 100-procentowy etanol wodą oczyszczoną w określonych poniżej proporcjach i dokładnie wymieszać:

- 70-procentowy etanol — dodać 7 części 100-procentowego etanolu do 3 części wody oczyszczonej
- 85-procentowy etanol — dodać 8,5 części 100-procentowego etanolu do 1,5 części wody oczyszczonej

Przechowywać roztwory przez maksymalnie 6 miesięcy w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

2x stężony roztwór SSC

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 9 częściami wody oczyszczonej; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

0,4x stężony roztwór SSC

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 49 częściami wody oczyszczonej; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

2x stężony roztwór SSC ze środkiem Tween-20 w stężeniu 0,05%

Rozcieńczyć 1 część 20x stężonego roztworu SSC z 9 częściami wody oczyszczonej. Dodać 5 µl środka Tween-20 na 10 ml roztworu; dobrze wymieszać. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 przy użyciu NaOH lub HCl, odpowiednio do potrzeb. Przechowywać roztwór przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze pokojowej w szczelnym pojemniku.

Zalecana procedura wstępnej obróbki preparatu⁵.

- Zanurzyć szkiełko z preparatem przygotowanym w utrwalonym w roztworze metanol/kwas octowy w stosunku 3:1 komórkach uzyskanych z próbek płynu owodniowego w 2x stężonym roztworze SSC na 1 godzinę w temperaturze 37°C.
- Zanurzyć szkiełko w świeżo przygotowanym roztworze roboczym pepsyny (5 mg pepsyny w 100 ml roztworu HCl o stężeniu 0,01 M) na 13 minut w temperaturze 37°C.
- Zanurzyć szkiełko w buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS) na 5 minut w temperaturze pokojowej.
- Zanurzyć szkiełko w roztworze po utrwalaniu (roztwór formaldehydu o stężeniu 0,95%: 1,0 ml roztworu formaldehydu o stężeniu 37%, 0,18 g MgCl₂ i 39,0 ml buforu PBS) na 5 minut w temperaturze pokojowej.
- Zanurzyć szkiełko w buforze PBS na 5 minut w temperaturze pokojowej.

- Zanurzyć szkiełko w roztworze etanolu o stężeniu 70% w temperaturze pokojowej. Pozostawić szkiełko w kąpeli etanolowej na 2 minuty.
- Wyjąć szkiełko z roztworu etanolu o stężeniu 70%. Powtórzyć krok 6 z użyciem roztworu etanolu o stężeniu 80%, a następnie etanolu o stężeniu 100%.
- Pozostawić do wyschnięcia na powietrzu.

Protokół FISH

(Uwaga: Należy możliwie ograniczać ekspozycję sondy i barwnika kontrastowego na światło w laboratorium).

Przygotowanie szkiełek (pomiń ten krok, jeśli szkiełko poddano obróbce wstępnej zgodnie z przedstawionym powyżej protokołem)

- Wkropić próbkę komórek na szkiełko mikroskopowe. Pozostawić do wyschnięcia. (Opcjonalnie, w przypadku korzystania z komory do suszenia próbek do badań cytogenetycznych: Komora powinna mieć temperaturę około 25°C i zapewniać wilgotność 50%, aby umożliwić optymalne naniesienie próbki komórek. Jeśli komora do suszenia próbek do badań cytogenetycznych nie jest dostępna, należy pozostawić próbki pod wyciągiem).
- Zanurzyć szkiełko w 2x stężonym roztworze SSC w temperaturze pokojowej na 2 minuty; nie wstrząsać.
- Odwodnić próbkę, korzystając z szeregu alkoholowego (etanol w stężeniu 70%, 85% i 100%); zanurzać szkiełko w każdym roztworze alkoholu na 2 minuty w temperaturze pokojowej.
- Pozostawić do wyschnięcia.

Denaturacja wstępna

- Wyjąć roztwór sond z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej. Przed użyciem roztworu należy krótko odwirować probówkę.
- Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
- Pobrać 10 µl roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość do probówki mikrowirówkowej. Bezwzględnie włożyć pozostały roztwór sond z powrotem do zamrażarki.
- Umieścić roztwór sond i szkiełko z próbką na płycie grzewczej o temperaturze 37°C (+/-1°C) na 5 minut w celu ich wstępnego ogrzania.
- Wkropić 10 µl mieszaniny sond na próbkę komórek i ostrożnie nanieść szkiełko nakrywkowe. Zakleić szkiełko klejem kauczukowym i poczekać na jego całkowite wyschnięcie.

Denaturacja

- Denaturować jednocześnie próbkę i mieszaninę sond, ogrzewając szkiełko na płycie grzewczej o temperaturze 75°C (+/-1°C) przez 2 minuty.

Hybrydyzacja

- Umieścić szkiełko w wilgotnym, światłoszczelnym pojemniku w temperaturze 37°C (+/-1°C) na noc.

Płukania po hybrydyzacji

- Wyjąć barwnik DAPI z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej.
- Ostrożnie zdjąć szkiełko nakrywkowe i usunąć wszelkie pozostałości kleju.
- Zanurzyć szkiełko w 0,4x stężonym roztworze SSC (pH 7,0) w temperaturze 72°C (+/-1°C) na 2 minuty; nie wstrząsać.
- Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie zanurzyć je w 2x stężonym roztworze SSC ze środkiem Tween-20 w stężeniu 0,05% (pH 7,0) w temperaturze pokojowej na 30 sekund; nie wstrząsać.
- Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie nanieść 10 µl barwnika DAPI antifade na każdą próbkę.
- Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić rozwój barw.
- Obejrzyć pod mikroskopem fluorescencyjnym (patrz **Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego**).

Zalecenia dotyczące procedury

- Wypiekanie lub postarzanie preparatów może zmniejszyć fluorescencję sygnału.
- Stosowanie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę Cytocell Ltd może mieć negatywny wpływ na warunki hybrydyzacji.
- Do pomiaru temperatury roztworów, łaźni wodnych i inkubatorów należy używać skalibrowanego termometru, ponieważ temperatury te są kluczowe dla optymalnego działania produktu.
- Stężenia, wartości pH i temperatury roztworów wykorzystywanych do płukania są istotne, gdyż mało surowe warunki mogą doprowadzić do nieswoistego wiązania sondy, a zbyt surowe warunki mogą spowodować brak sygnału.
- Niecałkowita denaturacja może spowodować brak sygnału, a nadmierna denaturacja może również doprowadzić do nieswoistego wiązania.
- Nadmierna hybrydyzacja może spowodować otrzymanie dodatkowych lub nieoczekiwanych sygnałów.
- Przed użyciem testu do celów diagnostycznych użytkownicy powinni zoptymalizować protokół dla własnych próbek.
- Suboptymalne warunki mogą prowadzić do nieswoistego wiązania sond, które może zostać błędnie zinterpretowane jako sygnał sondy.

Interpretacja wyników

Ocena jakości preparatów

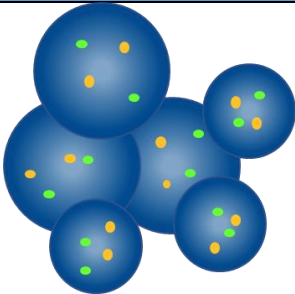
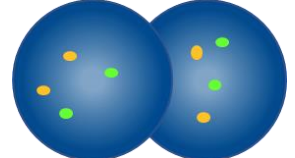
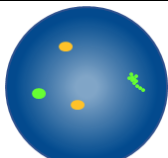
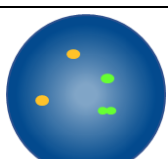
Preparatu nie należy oceniać w następujących przypadkach:

- Sygnały są zbyt słabe, aby można było analizować je w pojedynczych filtrach — do analizy można przystąpić jedynie, jeśli sygnały są jasne, wyraźne i łatwe do oceny.
- Widoczna jest duża liczba zlepionych/nakładających się na siebie komórek, co utrudnia analizę.
- W >50% komórek nie doszło do hybrydyzacji.

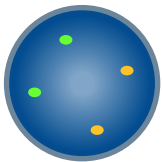
- Pomiędzy komórkami znajdują się liczne cząstki fluorescencyjne i/lub widoczne jest „zamglenie” fluorescencyjne, które zakłóca sygnały — w przypadku preparatów optymalnych do oceny tło powinno być ciemne lub czarne i klarowne.
- Nie można rozróżnić granic jądra komórkowego lub są one nieciągłe.

Wytuczne dotyczące analizy

- Każda próbka powinna być analizowana i interpretowana przez dwóch analityków. Wszelkie rozbieżności powinny zostać rozwiązane w wyniku oceny dokonanej przez trzeciego analityka.
- Każdy analityk powinien posiadać odpowiednie kwalifikacje zgodne z normami krajowymi.
- Każdy analityk powinien dokonać niezależnej oceny wystarczającej liczby jąder komórkowych dla każdej próbki, tak aby łączne oceny analityków spełniały minimalne kryteria określone w wytycznych placówki, wytycznych regionalnych lub krajowych. Pierwszy analityk powinien rozpocząć analizę od lewej strony preparatu, a drugi od prawej strony preparatu.
- Każdy analityk powinien zapisać własne wyniki w odrębnym arkuszu.
- Należy analizować wyłącznie nienaruszone jądra, nie wolno analizować jąder nakładających się na siebie, zlepionych, pokrytych resztkami cytoplazmy ani jąder wykazujących wysoki stopień autofluorescencji.
- Należy unikać obszarów, w których występuje nadmierna ilość resztek cytoplazmy lub nieswoista hybrydyzacja.
- Intensywność sygnału może się różnić nawet w obrębie jednego jądra. W takich przypadkach należy użyć filtrów pojedynczych i/lub wyregulować płaszczyznę ogniskowania.
- W warunkach suboptymalnych sygnały mogą wyglądać na rozlane. Jeśli dwa sygnały o tym samym kolorze stykają się ze sobą, odległość między nimi jest nie większa niż dwie szerokości sygnału lub istnieje cienkie pasmo łączące oba sygnały, należy zliczać je jako jeden sygnał.
- Dotyczy analizy wyników uzyskanych za pomocą dwukolorowych sond wykrywających miejsca złamań: jeśli pomiędzy sygnałem czerwonym a zielonym występuje przerwa nieprzekraczająca 2 szerokości sygnału, sygnał należy zliczyć jako brak rearanżacji/sygnał fuzyjny.
- Dotyczy analizy wyników uzyskanych za pomocą trzycolorowych sond wykrywających miejsca złamań: jeśli pomiędzy którymkolwiek z 3 sygnałów (czerwonym, zielonym, niebieskim) występuje przerwa nieprzekraczająca 2 szerokości sygnału, sygnał należy zliczyć jako brak rearanżacji/sygnał fuzyjny.
- W przypadku wątpliwości, czy komórka nadaje się do analizy, nie należy jej analizować.

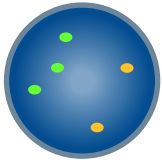
Wytuczne dotyczące analizy	
	Nie zliczać — jądra są za blisko siebie, aby można było określić ich granice
	Nie zliczać jąder nakładających się na siebie — nie są widoczne całe obszary obu jąder
	Zliczyć jako dwa sygnały pomarańczowe i dwa sygnały zielone — jeden z dwóch sygnałów zielonych jest rozlany
	Zliczyć jako dwa sygnały pomarańczowe i dwa sygnały zielone — przerwa widoczna w jednym zielonym sygnale jest mniejsza niż dwie szerokości sygnału

Oczekiwany wzorzec sygnału wskazujący na stan prawidłowy

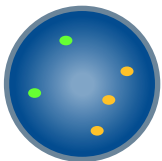


W komórce prawidłowej oczekiwane są dwa sygnały zielone i dwa sygnały pomarańczowe (2Z2P).

Oczekiwane wzorce sygnału wskazujące na stan nieprawidłowy



W komórce z trisomią chromosomu 13. oczekiwane są trzy sygnały zielone i dwa sygnały pomarańczowe (3Z2P).



W komórce z trisomią chromosomu 21. oczekiwane są dwa sygnały zielone i trzy sygnały pomarańczowe (2Z3P).

W przypadku próbek aneuploidalnych/z rearanżacją nie zrównoważoną mogą wystąpić inne wzorce sygnału.

Znane istotne zakłócenia/substancje zakłócające

Brak znanych istotnych zakłóceń/substancji zakłócających.

Znana reaktywność krzyżowa

Brak znanej reaktywności krzyżowej.

Zgłaszanie poważnych incydentów

Dotyczy pacjentów/użytkowników/podmiotów trzecich w Unii Europejskiej i w krajach o identycznym reżimie regulacyjnym (Rozporządzenie (UE) 2017/746 w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro*): jeśli podczas używania tego wyrobu lub w wyniku jego używania doszło do poważnego incydentu, fakt ten należy zgłosić wytwórcy oraz właściwemu organowi krajowemu.

W przypadku wystąpienia poważnych incydentów w innych krajach fakt ten należy zgłosić wytwórcy oraz, jeśli ma to zastosowanie, właściwemu organowi krajowemu. Adres wytwórcy do kontaktu w sprawach dotyczących nadzoru nad produktami (ang. vigilance): vigilance@oqt.com

Wykaz punktów kontaktowych ds. nadzoru nad produktami (ang. vigilance) dla krajowych właściwych organów w UE jest dostępny na stronie: https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

Specyficzne parametry skuteczności

Swoistość analityczna

Swoistość analityczna jest definiowana jako odsetek sygnałów, które hybrydują do właściwego locus i nie hybrydują do żadnej innej lokalizacji. Analizie poddano cztery loci chromosomowe w każdej z 20 komórek metafazowych w pięciu próbkach, uzyskując łącznie 400 punktów danych. Zmapowano lokalizację każdej zhybrydyzowanej sondy i zarejestrowano liczbę sygnałów FISH chromosomu metafazowego, które hybryduowały do właściwego locus.

Swoistość analityczną każdej sondy zawartej w zestawie obliczono jako liczbę sygnałów FISH chromosomu metafazowego zhybrydyzowanych do prawidłowego locus podzieloną przez całkowitą liczbę zhybrydyzowanych sygnałów FISH chromosomu metafazowego, uzyskany wynik pomnożono przez 100, wyrażono jako odsetek i podano z 95-procentowym przedziałem ufności.

Tabela 1. Swoistość analityczna dla produktu Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit

Locus docelowe	Liczba chromosomów metafazowych, w których doszło do hybrydyzacji	Liczba loci, w których doszło do prawidłowej hybrydyzacji	Swoistość analityczna	95-procentowy przedział ufności
21q22.1	200	200	100%	98,12–100%
13q14.2	200	200	100%	98,12–100%

Czułość analityczna

Czułość analityczna to odsetek komórek interfazowych nadających się do oceny z oczekiwanym wzorcem sygnału wskazującym na stan prawidłowy. Dla każdej z 25 utrwalonych zawieszin komórek uzyskanych z próbek płynu owodniowego kariotypowo prawidłowych osób płci męskiej lub żeńskiej, u których potwierdzono

prawidłową liczbę chromosomów 13. i 21. techniką FISH lub badaniem kariotypu, analizowano co najmniej 50 komórek interfazowych, uzyskując łącznie co najmniej 1250 jąder komórkowych poddanych ocenie dla każdego typu próbki. Dane dotyczące czułości przeanalizowano w oparciu o odsetek komórek wykazujących wzorzec sygnału wskazujący na stan prawidłowy i wyrażono jako odsetek z 95-procentowym przedziałem ufności.

Tabela 2. Czułość analityczna dla produktu Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit

Typ próbki	Kryterium czułości	Wynik czułości
Płyn owodniowy	>95%	96,24% (94,84–97,64%)

Charakterystyka wartości odcięcia dla stanu prawidłowego

Wartość odcięcia dla stanu prawidłowego jest definiowana jako odsetek komórek wykazujących fałszywie dodatni wzorzec sygnału, przy którym stan osoby należy uznać za prawidłowy i niezgodny z rozpoznaniem klinicznym. Dla każdej z 25 utrwalonych zawieszin komórek uzyskanych z próbek płynu owodniowego kariotypowo prawidłowych osób płci męskiej lub żeńskiej, u których potwierdzono prawidłową liczbę chromosomów 13. i 21. techniką FISH lub badaniem kariotypu, analizowano co najmniej 50 komórek interfazowych, uzyskując łącznie co najmniej 1250 jąder komórkowych poddanych ocenie dla każdego typu próbki.

Wartość odcięcia ustalono przy użyciu funkcji β -odwrotności (BETAINV) w programie MS Excel. Obliczono ją jako odsetek komórek interfazowych wykazujących fałszywie dodatni wzorzec sygnału przy zastosowaniu górnej granicy jednostronnego 95-procentowego przedziału ufności rozkładu dwumianowego w prawidłowej próbce pacjenta.

Tabela 3. Charakterystyka wartości odcięcia dla stanu prawidłowego dla produktu Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit

Typ próbki	Wartość odcięcia
Płyn owodniowy	8,97%

Laboratoria *muszą* zweryfikować wartości odcięcia w oparciu o własne dane i zgodnie z wszelkimi obowiązującymi w placówce, regionalnymi lub profesjonalnymi wytycznymi dotyczącymi najlepszych praktyk, które mogą mieć zastosowanie w danym środowisku diagnostycznym^{6,7}.

Precyzja

Precyzję tego produktu zmierzono w kategoriach precyzji w ramach dnia (między próbkami), precyzji między dniami oraz precyzji między seriami w jednym osrodku.

Do oceny precyzji tego produktu wykorzystano trzy (3) próbki: jedną próbkę prawidłowego płynu owodniowego, jedną próbkę płynu owodniowego nisko dodatniego względem trisomii chromosomu 13. (3Z2P) i jedną próbkę płynu owodniowego nisko dodatniego względem trisomii chromosomu 21. (2Z3P). Próbkę nisko dodatniego płynu owodniowego utworzono sztucznie poprzez dodanie próbki płynu owodniowego o znanym wyniku dodatnim do części próbki prawidłowego płynu owodniowego w celu uzyskania próbki nisko dodatniej w zakresie 2–4-krotności wartości odcięcia.

W celu ustalenia precyzji między dniami i w ramach dnia próbki poddawano ocenie w 10 nienastępujących po sobie dniach, a w celu ustalenia precyzji między seriami trzy (3) serie produktu poddawano ocenie poprzez wykonanie trzech (3) powtórzeń dla tej samej próbki. Wyniki przedstawiono jako zgodność ogółem z przewidywaną klasą ujemną (dla próbek ujemnych).

Tabela 4. Odtwarzalność i precyzja dla produktu Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit

Zmienna	Typ próbki	Zgodność
Precyzja w ramach dnia i między dniami	Płyn owodniowy ujemny	100%
	Płyn owodniowy nisko dodatni względem trisomii chromosomu 13. (3Z2P)	100%
	Płyn owodniowy nisko dodatni względem trisomii chromosomu 21. (2Z3P)	96,7%
Precyzja między seriami	Płyn owodniowy ujemny	88,9%
	Płyn owodniowy nisko dodatni względem trisomii chromosomu 13. (3Z2P)	100%
	Płyn owodniowy nisko dodatni względem trisomii chromosomu 21. (2Z3P)	100%

Skuteczność kliniczna

W celu zapewnienia, że produkt wykrywa rearanżacje, do których oceny jest przeznaczony, ustalono skuteczność kliniczną produktu w oparciu o trzy badania wykonane na reprezentatywnych próbkach docelowej populacji pacjentów, czyli pozostałościach materiału uzyskanego z próbek płynu owodniowego pobranego w trakcie ciąży, utrwalonych za pomocą roztworu metanol/kwas octowy w stosunku 3:1. Wielkość próby tego badania wynosiła 172 próbki, przy czym populacja liczyła 15 próbek dodatnich względem trisomii chromosomu 13. i 157 próbek ujemnych względem trisomii chromosomu 13. oraz 109 próbek dodatnich względem trisomii chromosomu 21. i 63 próbki ujemne względem trisomii chromosomu 21. Wyniki porównano ze znanym statusem próbki. Produkt zawierający sondy umożliwił prawidłową identyfikację statusu próbek we wszystkich przypadkach.

Uzyskane wyniki testów przeanalizowano w celu obliczenia czułości klinicznej, swoistości klinicznej i odsetka wyników fałszywie dodatnich (False Positive Rate, FPR) dla sygnałów dodatnich, stosując podejście jednowymiarowe.

Tabela 5. Skuteczność kliniczna dla produktu Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit

Zmienna	Wynik
Czułość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie dodatnich (True Positive Rate, TPR))	100,0%
Swoistość kliniczna (odsetek wyników prawdziwie ujemnych (True Negative Rate, TNR))	100,0%
Odsetek wyników fałszywie dodatnich (False Positive Rate, FPR) = 1 – swoistość	0,00%

Podsumowanie dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności (SSP)

Dokument SSP jest udostępniany publicznie za pośrednictwem europejskiej bazy danych o wyrobach medycznych (Eudamed), w której powiązany jest z kodem Basic UDI-DI.

Adres URL bazy danych: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Kod Basic UDI-DI: 50558449LPA003GL

Jeśli baza danych Eudamed nie jest w pełni funkcjonalna, dokument SSP jest udostępniany publicznie na żądanie przesłane na adres e-mail SSP@ogt.com.

Dodatkowe informacje

W celu uzyskania dodatkowych informacji na temat produktu należy skontaktować się z działem wsparcia technicznego firmy CytoCell.

Tel.: +44 (0)1223 294048


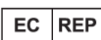












E-mail: techsupport@cytozell.com

Strona WWW: www.ogt.com

Piśmiennictwo

- 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.

Glosariusz symboli

EN ISO 15223-1:2021 — „Wyroby medyczne — Symbole do stosowania wraz z informacjami dostarczonymi przez producenta — Część 1: Wymagania ogólne” (© International Organization for Standardization)		
Symbol	Tytuł	Numery referencyjne
	pl: Wytwórca	5.1.1
	pl: Autoryzowany przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej/Unii Europejskiej	5.1.2
	pl: Użyć do daty	5.1.4
	pl: Kod partii	5.1.5
	pl: Numer katalogowy	5.1.6
	pl: Trzymać z dala od światła słonecznego	5.3.2
	pl: Dopuszczalna temperatura	5.3.7
	pl: Zajrzyj do instrukcji używania	5.4.3
 ogt.com/IFU	pl: Zajrzyj do elektronicznej instrukcji używania	5.4.3
	pl: Ostrzeżenie	5.4.4
	pl: Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>	5.5.1
	pl: Zawartość wystarczająca do <n> testów	5.5.5
	pl: Niepowtarzalny kod identyfikacyjny wyrobu	5.7.10
Symbole EDMA dla odczynników i składników IVD, wersja: październik 2009 r.		
Symbol	Tytuł	Numery referencyjne
	pl: Zawartość (lub „zawiera”)	ND.

Patenty i znaki towarowe

CytoCell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy CytoCell Limited.



CytoCell Limited

Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
WIELKA BRYTANIA

Tel.: +44 (0)1223 294048

Faks: +44 (0)1223 294986

E-mail: probes@cytozell.com

Strona WWW: www.ogt.com



Sysmex Europe SE

Bornbarch 1
22848 Norderstedt
NIEMCY

Tel.: +49 40 527260

Strona WWW: www.sysmex-europe.com

Historia wersji dokumentu IFU

V001.00 2023-01-11: Nowy dokument IFU zgodny z Rozporządzeniem (UE) 2017/746.