



A Sysmex Group Company



Lietošanas instrukcija

ATS.: CE-LPA 003-S / CE-LPA 003

Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit



TIKAI PROFESIONĀLAM LIETOJUMAM



Papildinformācija un informācija citās valodās ir pieejama vietnē

ogt.com/IFU

Paredzētais lietošanas mērķis

Zondes komplekts CytoCell® Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit ir kvalitatīvs, neautomatizēts luminiscētās *in situ* hibridizācijas (fluorescence in situ hybridisation — FISH) tests, kas paredzēts hromosomas 13q14.2 reģiona un hromosomas 21q22.1 reģiona noteikšanai Karnuā šķīdumā (3:1 metanols/etiķskābe) fiksētās šūnās, kas iegūtas no amnija šķidrums paraugiem 13. un 21. hromosomām augsta riska grūtniecībās ar aizdomām par Dauna un Patau sindromu.

Lietošanas indikācijas

Šī ierīce ir veidota kā papildinājums citiem klīniskiem un laboratorijas testiem atzītās diagnostikas un klīniskās aprūpes metodēs, piemēram, ultraskaņas skrīningam un bioķīmiskai testēšanai, kur zināšanas par hromosomas 13q14.2 reģiona un hromosomas 21q22.1 reģiona kopiju skaita statusu ir svarīgas pacientu pārvaldībai.

Ierobežojumi

Šī ierīce ir paredzēta, lai noteiktu hromosomu materiālu, kas ietver hromosomas 13q14.2 un hromosomas 21q22.1 reģionus, kurus aptver attiecīgi zaļie un oranžie kloni šajā zondes komplektā. Izmantojot šo ierīci, nevar noteikt genoma ieguvumus vai zudumus ārpus šiem reģioniem vai šo reģionu daļējus zudumus vai ieguvumus. Šo ierīci nav paredzēts izmantot kā atsevišķu diagnostikas līdzekli, lietot uz populāciju balstītam skrīningam, pacienta testēšanai ārpus laboratorijas vai paštestēšanai, un tā nav apstiprināta citiem paraugu tipiem, slimību tipiem vai mērķiem, kas nav norādīti kā paredzētais lietošanas mērķis.

Šī ierīce ir izmantojama kā citu diagnostisko laboratorijas testu palīg līdzeklis, un lēmumus par terapiju nedrīkst pieņemt, balstoties tikai uz luminiscētās *in situ* hibridizācijas (FISH) rezultātiem.

Ziņošana par FISH testa rezultātiem un to interpretēšana ir jāveic atbilstoši kvalificētam personālam saskaņā ar profesionālajiem prakses standartiem, un ir jāņem vērā citu testu rezultāti, klīniskā un diagnostikas informācija.

Šī ierīce ir paredzēta tikai profesionālam lietojumam laboratorijā.

Neievērojot attiecīgo protokolu, var tikt ietekmēta veikspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi vai kļūdaini negatīvi rezultāti.

Testa principi

Luminiscētā *in situ* hibridizācija (fluorescence in situ hybridisation — FISH) ir metode, kas ļauj noteikt DNS sekvenču metafāzu hromosomās vai interfāzes kodolos fiksētiem citogenētiskiem paraugiem. Šajā metodē tiek izmantotas DNS zondes, kas hibridizējas ar veselām hromosomām vai atsevišķām unikālām sekvencēm un kalpo kā efektīvs G joslu citogenētiskās analīzes palīg līdzeklis. Šo metodi tagad var lietot kā būtisku izmeklēšanas instrumentu prenatalajā, hematoloģiskajā un solidu audzēju hromosomālajā analīzē. Mērķa DNS pēc fiksācijas un denaturēšanas ir pieejama hibridizācijai ar līdzīgi denaturētu, luminiscējošu marķētu DNS zondi, kurai ir papildu sekvenču. Pēc hibridizācijas nesaisītā un nespecifiski saistītā DNS zonde tiek aizvākta un DNS tiek kontrastēta vizualizācijai. Pēc tam, izmantojot luminiscences mikroskopiju, hibridizēto zondi var vizualizēt mērķa materiālā.

Informācija par zondi

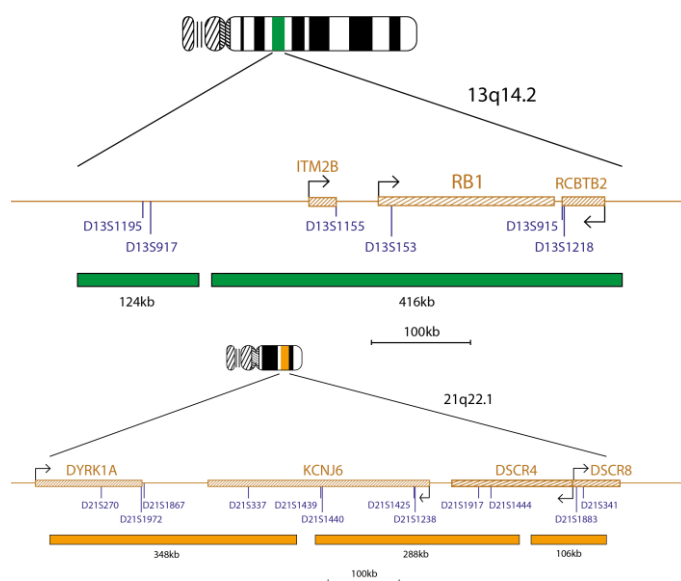
Dauna sindroms (DS) ir autosomāla trisomija, ko izraisa trešā (daļēja vai pilnīga) 21. hromosomas kopija un kam raksturīga mainīga intelektuāla invaliditāte, muskuļu hipotonija un locītavu atslābums, kas bieži saistīts ar raksturīgu sejas dismorfiju un dažādām anomālijām, piemēram, sirds, kuņģa-zarnu trakta, neirosensoriskiem vai endokrīniem defektiem^{1,2}. DS ir viens no galvenajiem intelektuālās invaliditātes cēloņiem visā pasaulē, un šie pacienti saskaras arī ar dažādām veselības problēmām, tostarp saistītām ar mācīšanos un atmiņu, iedzimtām sirds slimībām (CHD), Alcheimera slimību (AD), leikēmiju, vēzi un Hiršsprunga slimību (HD)¹. DS ir augsta ģenētiskā sarežģītība un fenotipa mainība¹. 16. grūtniecības nedēļā DS grūtniecības sastopamība ir 1 gadījumā no 1050 mātēm 20 gadu vecumā, 1 gadījumā no 620 mātēm 30 gadu vecumā un 1 gadījumā no 70 mātēm 40 gadu vecumā³.

Patau sindroms (PS) ir hromosomu anomālija, ko izraisa papildu 13. hromosomas klātbūtne, un tai raksturīgas smadzeņu anomālijas (holoprosencefālija), sejas dismorfisms, acu anomālijas, postaksiālā polidaktīlija, iekšējo orgānu anomālijas (kardiopātija) un smaga psihomotorā atpalicība². PS ir saistīta ar fenotipisku holoprosencefāliju un viduslīnijas saplūšanas anomālijām, ko izraisa nepareiza prechordālās mezodermas saplūšana embriona stadijā⁴. 16. grūtniecības nedēļā PS grūtniecības sastopamība ir 1 gadījumā no 11 000 mātēm 20 gadu vecumā, 1 gadījumā no 6500 mātēm 30 gadu vecumā un 1 gadījumā no 700 mātēm 40 gadu vecumā³.

Zondes specifikācija

13. unikālā sekvenču, 13q14.2 zaļa

21. unikālā sekvenču, 21q22.1 oranža



Zaļajā zondes maisījumā ir 124 kb zonde un 416 kb zonde, kas aptver *ITM2B*, *RB1* un *RCBTB2* gēnu. Oranžais zondes maisījums nosedz reģionu 21q22.1 no *DYRK1A* gēna līdz *DSCR8* gēnam.

Nodrošinātie materiāli

Zonde: 50 µl flakonā (5 testi) vai 100 µl flakonā (10 testi).

Zondes tiek nodrošinātas iepriekš sajauktā veidā hibridizācijas šķīdumā (< 65% formamīds; < 20 mg dekstrāna sulfāts; < 10% 20x citrāta fizioloģiskais šķīdums (salīne-sodium citrate, SSC)) un ir gatavas lietošanai.

Kontrasta krāsviela: 150 µl flakonā (15 testi)

Kontrasta krāsviela ir DAPI luminiscences uzturēšanas šķīdums ES (0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindols) šķīdumā uz glicerīna bāzes).

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

1. Lietošanai *in vitro* diagnostikā. Tikai profesionālam lietojumam laboratorijā.
2. Zondes maisījums ietilpst formamīdā, kas ir teratogēns, tādēļ nedrīkst pieļaut to izgarojumu ieelpošanu un nonākšanu saskarē ar ādu. Rīkojieties ar to piesardzīgi; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku.
3. Rīkojieties ar DAPI piesardzīgi; valkājiet cimdus un laboratorijas virsvalku.
4. Nelietot, ja flakons(-i) ir bojāts(-i) vai flakona saturs jebkāda veida ir bojāts.
5. Izpildiet vietējos utilizācijas noteikumus, kā arī drošības datu lapā sniegtos ieteikumus par drošu šī produkta utilizāciju. Tas attiecas arī uz bojātu testa komplekta saturu.
6. Utilizējiet visus izmantotos reaģentus un jebkādu citu piesārņotus vienreizlietojamus materiālus, ievērojot procedūras attiecībā uz infekcioziem vai potenciāli infekcioziem atkritumiem. Katra laboratorija ir atbildīga par rīcību ar cietajiem un šķidrājiem atkritumiem atbilstoši to veidam un bīstamības pakāpei, kā arī par to apstrādi un utilizāciju (līdz šim un turpmāk) saskaņā ar spēkā esošajiem noteikumiem.
7. Operatoriem jāspēj atšķirt sarkano, zilo un zaļo krāsu.
8. Neievērojot norādīto protokolu un norādījumus par reaģentiem, var tikt ietekmēta veikspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi/negatīvi rezultāti.
9. Zondi nedrīkst atšķaidīt vai veidot maisījumus ar citām zondēm.
10. Ja protokola priekšdenaturēšanas fāzes laikā netiek izmantoti 10 µl no zondes, var tikt ietekmēta veikspēja un iegūti kļūdaini pozitīvi/negatīvi rezultāti.

11. Pirms lietošanas visi produkti ir jāapstiprina.
12. Iekšējās kontroles jāveic, testēšanas paraugus izmantojot neietekmētas šūnu populācijas.

Temperatūras definīcijas

- 20 °C/sasaldēts/saldētavā: No -25 °C līdz -15 °C
- 37 °C: +37 °C ± 1 °C
- 72 °C: +72 °C ± 1 °C
- 75 °C: +75 °C ± 1 °C
- Istabas temperatūra (Room Temperature — RT): No +15 °C līdz +25 °C

Uzglabāšana un apiešanās

Komplekts ir jāglabā saldētavā temperatūrā no -25 °C līdz -15 °C līdz pat derīguma termiņa beigu datumam, kas norādīts uz komplekta etiķetes. Zondes un kontrasta krāsvielas flakoni ir jāuzglabā tumšā.



FISH zonde, DAPI Antifade ES kontrastviela un hibridizācijas šķīdums paliek stabili visos sasaldēšanas-atkausēšanas ciklos parastas lietošanas laikā (kur viens cikls ir flakona izņemšana no saldētavas un ievietošana tajā atpakaļ) — 5 cikli 50 µl (5 testi) FISH zondes flakonam, 10 cikli 100 µl (10 testi) FISH zondes flakonam un 15 cikli 150 µl (15 testi) kontrastvielas flakonam. Pēc iespējas jāsamazina gaismas iedarbība un jāizvairās no tās, kad vien iespējams. Uzglabājiet komponentus nodrošinātajā gaismas necaurlaidīgajā konteinerā. Komponenti, kas izmantoti uzglabāti apstākļos, kas nav norādīti marķējumā, var nedarboties, kā paredzēts, un tie var negatīvi ietekmēt analīzes rezultātus. Ir jāveic viss iespējamais, lai ierobežotu gaismas un temperatūras svārstību ietekmi.

Aprīkojums un materiāli, kas ir nepieciešami, bet nav iekļauti komplektācijā

- Ir jāizmanto kalibrēts aprīkojums.
- Sildierīce (ar cietu sildvirsmu un precīzu temperatūras regulēšanu līdz pat 80 °C)
 - Kalibrētas dažāda tilpuma mikropipetes un uzgaļi 1–200 µl diapazonā.
 - Ūdens vanna ar precīzu temperatūras regulēšanu 37 °C un 72 °C
 - Mikrocentrifūgas mēģenes (0,5 ml)
 - Luminiscences mikroskops (sk. sadaļu Uz luminiscences mikroskopu attiecināmie ieteikumi)
 - Fāžu kontrasta mikroskops
 - Tīri plastmasas, keramikas vai karstumizturīga stikla Koplina trauki
 - Pincete
 - Kalibrēta pH mērierīce (vai pH indikatora strēmeles, ar kurām var veikt mērījumus pH 6,5–8,0 diapazonā)
 - Konteiners ar mitru vidi
 - Luminiscencei atbilstoša mikroskopa objektīva iegremdēšanas eļļa
 - Galda centrifūga
 - Mikroskopa priekšmetstikliņi
 - 24x24 mm segstikliņi
 - Taimeris
 - 37 °C inkubators
 - Gumijas līme
 - Virpuļmaistājs
 - Mērcilindri
 - Magnētiskais maistājs
 - Kalibrēts termometrs

Papildaprīkojums, kas nav ietverts komplektācijā

- Citoģenētiskā žāvēšanas kamera

Nepieciešamie reaģenti, kas nav ietverti komplektācijā

- 20x citrāta fizioloģiskais šķīdums (saline-sodium citrate — SSC)
- 100% etanols
- Tween-20
- 1M nātrija hidroksīds (NaOH)
- 1M sālsskābe (HCl)
- Attīrīts ūdens

Uz luminiscences mikroskopu attiecināmie ieteikumi

Lai nodrošinātu optimālu vizualizāciju, izmantojiet 100 W dzīvsudraba spuldzi vai ekvivalentu gaismas avotu un eļļā iegremdējamus 60/63x vai 100x objektīvus. Šajā zonzu komplektā izmantotie fluorofori tiks ierosināti un izstaros tālāk norādītā garuma viļņos.

Fluorofors	Ierosme _{max} [nm]	Izstarošana _{max} [nm]
Zaļš	495	521
Oranža	551	572

Nodrošiniet, lai mikroskops būtu aprīkots ar iepriekš norādītajiem viļņa garumiem atbilstošiem ierosmes un izstarošanas filtriem. Trīskāršais joslas caurlaidības filtrs DAPI/FITC/TRITC ir optimāls zaļo un oranžo luminoforu, kā arī kontrastvielas vienlaicīgai apskatei. Trīskāršo joslas caurlaidības filtru DAPI/FITC/Texas sarkano var arī izmantot, lai vienlaicīgi skatītu gan luminoforus, gan DAPI.

Pirms lietošanas pārbaudiet luminiscences mikroskopu, lai pārliecinātos, vai tas darbojas pareizi. Izmantojiet iegremdēšanas eļļu, kas piemērota luminiscences mikroskopijai un nodrošina zemu autoluminiscences līmeni. Izvairieties no DAPI luminiscences uzturēšanas šķīduma sajaukšanās ar mikroskopa iegremdēšanas eļļu, jo pretējā gadījumā radīsies signāla traucējumi. Rīkojieties atbilstoši ražotāja ieteikumiem attiecībā uz lampas un filtru kalpošanas ilgumu.

Paraugu sagatavošana

Šis komplekts ir paredzēts izmantošanai Karnuā šķīdumā (3:1 metanols/etiķskābe) fiksētām šūnām, kas iegūtas no amnija šķidruma paraugiem 13. un 21. hromosomām augsta riska grūtniecībās ar aizdomām par Dauna un Patau sindromu un ir sagatavotas atbilstoši laboratorijā vai iestādē spēkā esošajām vadlīnijām. Amnija šķidrumu paraugu ņemšana jāveic saskaņā ar laboratorijas vai iestādes vadlīnijām. Nedrīkst lietot paraugus, kas izskatās asiņaini vai brūni, jo tie var saturēt mātes asinis un radīt nepareizus rezultātus. Sagatavojiet gaisā nožāvētus paraugus uz mikroskopa priekšmetstikliņiem atbilstoši standarta citoģenētiskajām procedūrām. AGT *citoģenētiskās laboratorijas rokasgrāmatā* ir ietverti ieteikumi par paraugu ņemšanu, kultūrēšanu, ievākšanu un priekšmetstikliņu sagatavošanu⁵.

Šķīdumu sagatavošana

Etanola šķīdumi

Atšķaidiet 100% etanolu ar attīrītu ūdeni atbilstoši tālāk norādītajām proporcijām un rūpīgi samaisiet.

- 70% etanols — 7 daļas 100% etanola un 3 daļas attīrīta ūdens
 - 85% etanols — 8,5 daļas 100% etanola un 1,5 daļas attīrīta ūdens
- Glabājiet šķīdumus līdz pat 6 mēnešiem istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

2xSSC šķīdums

Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 9 daļām attīrīta ūdens un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 nedēļu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

0,4xSSC šķīdums

Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 49 daļām attīrīta ūdens un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 nedēļu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

2xSSC, 0,05% Tween-20 šķīdums

Atšķaidiet 1 daļu 20xSSC šķīduma ar 9 daļām attīrīta ūdens. Pievienojiet 5 µl Tween-20 uz 10 ml un rūpīgi samaisiet. Pārbaudiet pH līmeni un nodrošiniet, lai tā pH būtu 7,0, pēc nepieciešamības izmantojot NaOH vai HCl. Uzglabājiet šķīdumu līdz pat 4 nedēļu ilgumā istabas temperatūrā hermētiski noslēdzamā konteinerā.

Ieteicamā priekšmetstikliņu iepriekšēja sagatavošana⁵.

- Priekšmetstikliņu, kas sagatavots ar 3:1 metanolā/etiķskābē fiksētām šūnām, kas iegūtas no amnija šķidruma paraugiem, iegremdējiet 2xSSC 1 stundu 37 °C temperatūrā.
- Ievietojiet priekšmetstikliņu svaigi pagatavotā pepsīna apstrādes šķīdumā (5 mg pepsīna, kas pievienots 100 ml no 0,01 M HCl) uz 13 minūtēm 37 °C temperatūrā.
- Iegremdējiet priekšmetstikliņu fosfāta buferšķīdumā (PBS) istabas temperatūrā (RT) uz 5 minūtēm.
- Iegremdējiet priekšmetstikliņu pēcfiksācijas šķīdumā (0,95% formaldehīda: 1,0 ml 37% formaldehīda, 0,18 g MgCl₂ un 39,0 ml PBS) uz 5 minūtēm istabas temperatūrā (RT).
- Iegremdējiet priekšmetstikliņu PBS istabas temperatūrā (RT) uz 5 minūtēm.
- Iegremdējiet priekšmetstikliņu 70% etanolā istabas temperatūrā (RT). Atstājiet priekšmetstikliņu 2 minūtes etanola peldē.
- Izņemiet priekšmetstikliņu no 70% etanola. Atkārtojiet 6. darbību ar 80% etanolu, un pēc tam ar 100% etanolu.
- Ļaujiet nožūt.

Luminiscentās in situ hibridizācijas protokols (FISH)

(Piezīme. Nodrošiniet, lai zonde un kontrasta krāsviela pēc iespējas mazāk tiktu pakļauta laboratorijas apgaismojuma iedarbībai.)

Priekšmetstikliņa sagatavošana (izlaidiet šo darbību, ja priekšmetstikliņš tika iepriekš apstrādāts saskaņā ar iepriekš norādīto protokolu)

- Novietojiet šūnu paraugu uz mikroskopa priekšmetstikliņa, kas izgatavots no stikla. Ļaujiet nožūt. (Pēc izvēles, ja izmanto citoģenētisko žāvēšanas kameru: Lai nodrošinātu optimālu šūnu parauga sagatavošanu, kamera jādarbina, iestatot aptuveni 25 °C temperatūru un 50% mitruma. Ja citoģenētiskā žāvēšanas kamera nav pieejama, kā alternatīvu var izmantot gāzu nosūcēju).
- Iegremdējiet priekšmetstikliņu 2xSSC šķīdumā istabas temperatūrā uz 2 minūtēm, neveicot maisīšanu.
- Veiciet dehidrēšanas etanolā sērijas (70%, 85% un 100%), katru 2 minūtes istabas temperatūrā.
- Ļaujiet nožūt.

Priekšdenaturēšana

- Izņemiet zondi no saldētavas un ļaujiet tai sasilt līdz istabas temperatūrai. Pirms mēģeņu lietošanas brīdī tās centrifugējiet.
- Izmantojot pipeti, pārliecinieties, vai zondes šķīdums ir viendabīgi samaisīts.
- Paņemiet 10 µl zondes šķīduma katram testam un pārnesiet to uz mikrocentrifūgas mēģeni. Atlikušo zondes šķīdumu nekavējoties ievietojiet atpakaļ saldētavā.
- Novietojiet zondi un parauga priekšmetstikliņu uz sildierīces un veiciet priekšsildīšanu 37 °C (+/- 1 °C) temperatūrā 5 minūtes.
- Uzlieciet 10 µl zondes maisījuma uz šūnu parauga un rūpīgi uzlieciet segstikliņu. Hermetizējiet ar gumijas līmi un ļaujiet līmei pilnībā nožūt.

Denaturēšana

- Izņemiet paraugu un zondes vienlaicīgu denaturēšanu, sildot priekšmetstikliņu uz sildierīces 75 °C (+/- 1 °C) temperatūrā 2 minūtes.

Hibridizācija

11. Ievietojiet priekšmetstiklīņu gaismu necaurlaidīgā konteinerā ar mitru vidi un atstājiet to 37 °C (+/- 1 °C) temperatūrā līdz nākamajai dienai.

Skalošana pēc hibridizācijas

- 12. Izņemiet DAPI no saldētavas un ļaujiet tam sasilt līdz istabas temperatūrai.
- 13. Noņemiet segstiklīņu un rūpīgi notīriet visas līmes atliekas.
- 14. Iegremdējiet priekšmetstiklīņu 0,4xSSC (pH 7,0) 72 °C (+/- 1 °C) temperatūrā uz 2 minūtēm nemaisot.
- 15. Noteciniet šķidrumu no priekšmetstiklīņa un iegremdējiet to 2xSSC, 0,05% Tween-20 šķīdumā istabas temperatūrā (pH 7,0) uz 30 sekundēm nemaisot.
- 16. Noteciniet šķidrumu no priekšmetstiklīņa un katram paraugam pievienojiet 10 µl DAPI luminiscences uzturēšanas līdzekli.
- 17. Uzlieciet segstiklīņu, likvidējiet burbuļus un ļaujiet krāsai tumsā attīstīties 10 minūtes.
- 18. Skatiet luminiscences mikroskopā (sk. **Uz luminiscences mikroskopu attiecināmie ieteikumi**).

Ieteikumi attiecībā uz procedūru

- 1. Priekšmetstiklīņu karsēšana vai novecošana var samazināt signāla luminiscenci.
- 2. Tādu reaģentu izmantošana, kas nav uzņēmuma Cytocell Ltd. nodrošinātie vai ieteiktie reaģenti, var nelabvēlīgi ietekmēt hibridizācijas apstākļus.
- 3. Šķīdumu, ūdens vannu un inkubatoru temperatūras mērīšanai jāizmanto kalibrēts termometrs, jo norādītās temperatūras ievērošana ir kritiski svarīga produkta optimālās veiktspējas nodrošināšanai.
- 4. Skalošanas šķīdumu koncentrācijas, pH vērtības un temperatūras vērtības ir svarīgas, jo pārāk lielas pielādes gadījumā iespējama nespecifiska sasaiste, savukārt pārāk mazas pielādes gadījumā iespējama signāla nepietiekamība.
- 5. Nepilnīga denaturēšana var izraisīt signāla nepietiekamību, savukārt pārmērīga denaturēšana arī var izraisīt nespecifisku sasaisti.
- 6. Pārmērīga hibridizācijas dēļ iespējami papildu vai neparedzēti signāli.
- 7. Pirms testa izmantošanas diagnostikas nolūkiem lietotājiem ir jāveic protokola optimizācija atbilstoši saviem paraugiem.
- 8. Ja apstākļi nav pietiekami optimāli, iespējama nespecifiska sasaiste, kas var tikt nepareizi interpretēta kā zondes signāls.

Rezultātu interpretēšana

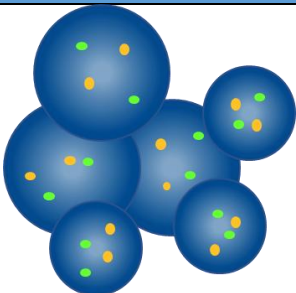
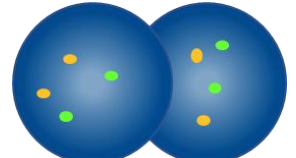
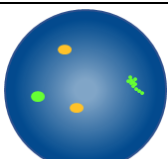
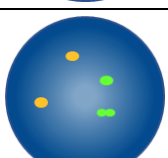
Sagatavotā priekšmetstiklīņa ar paraugu kvalitātes novērtēšana

Paraugu nedrīkst analizēt tālāk norādītajos gadījumos.

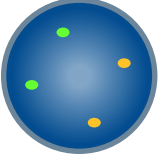
- Signāli ir pārāk vāji analizēšanai atsevišķos filtros — lai veiktu analīzi, signāliem jābūt spilgtiem, labi izšķiramiem un viegli novērtējamiem.
- Ir daudz salīpušu/pārklājošos šūnu, kas traucē veikt analīzi.
- >50% šūnu nav hibridizētas.
- Starp šūnām atrodas pārāk daudz luminiscējošo daļiņu un/vai luminiscējošs aizmiglojums, kas rada signāla traucējumus, — optimālā priekšmetstiklīņā ar paraugu fonam jābūt tumšam vai melnam un tīram.
- Šūnu kodolu robežas nav izšķiramas un nav veselas.

Uz analīzi attiecināmās vadlīnijas

- Katra parauga analīzi un interpretēšanu ir jāveic diviem laboratorijas speciālistiem. Visas neatbilstības ir jānovērš, novērtēšanu veicot trešajam laboratorijas speciālistam.
- Katram laboratorijas speciālistam jābūt attiecīgi kvalificētam atbilstoši spēkā esošajiem valsts līmeņa standartiem.
- Katram laboratorijas speciālistam neatkarīgi būtu jāiegūst pietiekami daudz kodolu no katra parauga, lai apvienotie laboratorijas speciālistu rezultāti atbilstu minimāliem kritērijiem, kā noteikts iestāžu, reģionālajos vai valsts noteikumos. Pirmajam laboratorijas speciālistam jāsāk analīze no priekšmetstiklīņa kreisās puses, savukārt otram laboratorijas speciālistam — no priekšmetstiklīņa labās puses.
- Katram laboratorijas speciālistam jādokumentē savi rezultāti atsevišķās lapās.
- Ir jāanalizē tikai veseli kodoli, nevis pārklājošies kodoli, sablīvējušies kodoli vai kodoli, kurus sedz citoplazmatiskās atliekas vai augsta līmeņa autoluminiscence.
- Jāizvairās no zonām ar pārmērīgu citoplazmatisko atlieku apjomu vai nespecifisku hibridizāciju.
- Signāla intensitāte var būt mainīga, pat vienā kodolā. Šādos gadījumos izmantojiet atsevišķus filtrus un/vai pielāgojiet fokālo plakni.
- Ja apstākļi nav pietiekami optimāli, signāli var šķīst izkliedēti. Ja divi vienādas krāsas signāli savstarpēji saskaras vai attālums starp tiem nepārsniedz divus signāla platumus, vai arī abus signālus savieno tikko redzams pavediens, šie signāli ir uzskatāmi par vienu signālu.
- Analizējot divkrāsu sadalīšanās zondes, ja attālums starp sarkano un zaļo signālu nepārsniedz 2 signāla platumus, signāls ir uzskatāms par nepārkārtotu/saplūdušu signālu.
- Analizējot trīskrāsu sadalīšanās zondes, ja attālums starp 3 signāliem (sarkano, zaļo, zilo) nepārsniedz 2 signālu platumu, signāls ir uzskatāms par nepārkārtotu/saplūdušu signālu.
- Ja pastāv šaubas, vai šūna ir analizējama, neveiciet tās analīzi.

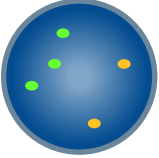
Uz analīzi attiecināmās vadlīnijas	
	Neskaitīt — kodoli atrodas pārāk tuvu viens otram, lai varētu noteikt to robežas
	Neskaitīt pārklājošos kodolus — nav redzamas visas abu kodolu zonas
	Skaitīt kā divus oranžus un divus zaļus signālus — viens no abiem zaļajiem signāliem ir difūzs
	Skaitīt kā divus oranžus un divus zaļus signālus — atstarpe vienā zaļajā signālā ir mazāka par diviem signāla platumiem

Paredzamais normālu signālu modelis

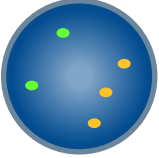


Normālā šūnā ir paredzami divi zaļi un divi oranži (2Z2O).

Paredzami anormālo signālu modeļi



Šūnā ar trisomiju 13 ir paredzami trīs zaļi un divi oranži signāli (3Z2O).



Šūnā ar trisomiju 21 ir paredzami divi zaļi un trīs oranži signāli (2Z3O).

Citi signālu modeļi ir iespējami aneiploīdos/nelīdzsvarotos paraugos.

Zināmie būtiskie traucējumi/traucējošās vielas

Nav zināmu būtisku traucējumu/traucējošu vielu.

Zināmā krusteniskā reakcija

Nav zināmas krusteniskās reakcijas.

Zīņošana par nopietniem negadījumiem

Pacientam/lietotājam/trešajai personai Eiropas Savienībā un valstīs ar identisku tiesisko regulējumu (Regula (ES) 2017/746 par *In vitro* diagnostikas medicīniskām ierīcēm); ja šīs ierīces lietošanas laikā vai tās lietošanas rezultātā ir noticis nopietns negadījums, lūdz, ziņojiet par to ražotājam un valsts atbildīgajai iestādei. Attiecībā uz nopietniem negadījumiem citās valstīs, lūdz, ziņojiet par to ražotājam un, ja paredzēts, savas valsts atbildīgajai iestādei. Ražotāja uzraudzības kontaktinformācija: vigilance@ogt.com

ES valstu kompetentajām iestādēm kontaktpersonu medicīnas ierīču kontroles jautājumus saraksts ir atrodams šajā vietnē:
https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en

Specifiskās veikspējas raksturlielumi
Anālītiskais specifiskums

Anālītiskais specifiskums tiek definēts kā to signālu procentuālā vērtība, kas hibridizējas uz pareizo lokusu un nekādu citu vietu. Katrā no 20 metafāzes šūnām no pieciem paraugiem tika analizēti četri hromosomu lokusi, dodot 400 datu punktus. Katras hibridizētās zondes atrašanās vieta ir kartēta, un ir ierakstīts metafāzes hromosomu luminiscentās in situ hibridizācijas (Fluorescence in situ hybridisation — FISH) signālu skaits, kas hibridizējās uz pareizo lokusu.

Katras komplekta zondes anālītiskais specifiskums tika aprēķināts kā metafāzes hromosomu FISH signālu skaits, kas hibridizējās uz pareizo lokusu, dalīts ar kopējo metafāzes hromosomu FISH signālu kopējo skaitu, šis rezultāts tika sareizināts ar 100, izteikts kā procentuālā vērtība un dots ar 95% ticamības intervālu.

1. tabula Zondes komplekta Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit anālītiskais specifiskums

Mērķis	Hibridizēto metafāzes hromosomu skaits	Pareizi hibridizēto lokusu skaits	Anālītiskais specifiskums	95% ticamības intervāls
21q22.1	200	200	100%	98,12%–100%
13q14.2	200	200	100%	98,12%–100%

Anālītiskais jutīgums

Anālītiskais jutīgums tiek izteikts kā novērtējamu interfāzes šūnu ar paredzamu normālo signālu modeli procentuālā vērtība. Katrai no 25 fiksētiem amnija šķidruma šūnu suspensiju paraugiem no kariotipiski normāliem vīriešiem vai sievietēm ar normālu 13. un 21. hromosomas papildinājumu, izmantojot FISH vai kariotipa testu, tika analizētas vismaz 50 starpfāzes šūnas, rezultātā sniedzot vismaz 1250 kodolus katram parauga tipam. Jutīguma dati tika analizēti, pamatojoties uz šūnu procentuālo vērtību, kas parāda parastu paredzamo signālu modeli un tiek izteikti kā procentuālā vērtība ar 95% ticamības intervālu.

2. tabula Zondes komplekta Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit anālītiskais jutīgums

Parauga tips	Jutīguma kritēriji	Jutīguma rezultāts
Amnija šķidrums	>95%	96,24% (94,84–97,64%)

Normalitātes robežvērtību raksturojums

Normalitātes robežvērtība tiek definēta kā to šūnu procentuālā vērtība, kas uzrāda aplami pozitīvu signālu modeli, kurā indivīds tiktu uzskatīts par normalitāti un neatbilstošs klīniskajai diagnozei. Katrai no 25 fiksētiem amnija šķidruma šūnu suspensiju paraugiem no kariotipiski normāliem vīriešiem vai sievietēm ar normālu 13. un 21. hromosomas papildinājumu, izmantojot FISH vai kariotipa testu, tika analizētas vismaz 50 starpfāzes šūnas, rezultātā sniedzot vismaz 1250 kodolus katram parauga tipam.

Robežvērtība tika noteikta, programmā MS Excel izmantojot β inversijas (BETAINV) funkciju. Tā tika aprēķināta kā starpfāžu šūnu procentuālā vērtība, kas uzrāda aplami pozitīvu signālu modeli, izmantojot binomiālās izplatības vienkusējās 95% ticamības intervāla augšējo robežu normalitātes pacienta paraugā.

3. tabula Zondes komplekta Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit normalitātes robežvērtību raksturojums

Parauga tips	Robežvērtības rezultāts
Amnija šķidrums	8,97%

Laboratorijām *obligāti* jāapstiprina robežvērtības, izmantojot savus datus, un saskaņā ar jebkuriem iestāžu, reģionālajām vai profesionālām paraugprakses vadlīnijām, kas piemērojamas to diagnostikā vidē.^{6,7}

Precizitāte

Šī izstrādājuma precizitāte ir izmērīta dienas precizitātes (no parauga uz paraugu), starpdienu precizitātes (no dienas uz dienu) un vienas vietas starppartiju precizitātes (no partijas uz partiju) izteiksmē.

Lai novērtētu šā produkta precizitāti, tika izmantoti trīs (3) paraugi: viens normāla amnija šķidruma paraugs, viens nedaudz pozitīvs trisomijas 13 amnija šķidruma paraugs (3Z2O) un viens nedaudz pozitīvs trisomijas 21 amnija šķidruma paraugs (2Z3O). Vāji pozitīvie amnija šķidruma paraugi tika iegūti, izmantojot normāla amnija šķidruma proporciju un pievienojot tai pārbaudīti pozitīvu amnija šķidruma paraugu, ar mērķi izgatavot nedaudz pozitīvus paraugu 2–4x produkta robežvērtības diapazonā.

Lai noteiktu starpdienu un dienas precizitāti, paraugi tika izvērtēti 10 neseģu datumu laikā, un, lai noteiktu precizitāti no partijas uz partiju, trīs (3) produkta partijas tika novērtētas ar vienu un tā paša parauga trīs (3) atkārtojumiem. Rezultāti tika pasniegti kā vispārēja konverģence ar prognozētu negatīvo klasi (negatīviem paraugiem).

4. tabula Zondes komplekta Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit reproducējamība un precizitāte

Mainīgais	Parauga tips	Konverģence
Dienas un starpdienu precizitāte	Amnija šķidrums, negatīvs	100%
	Amnija šķidrums, nedaudz pozitīva trisomija 13 (3Z2O)	100%
	Amnija šķidrums, nedaudz pozitīva trisomija 21 (2Z3O)	96,7%
Starppartiju precizitāte	Amnija šķidrums, negatīvs	88,9%
	Amnija šķidrums, nedaudz pozitīva trisomija 13 (3Z2O)	100%
	Amnija šķidrums, nedaudz pozitīva trisomija 21 (2Z3O)	100%

Klīniskā veikspēja

Lai nodrošinātu to, ka produkts konstatē paredzētos pārkāpumus, klīniskā veikspēja tika noteikta trīs pētījumos produktam paredzētās populācijas reprezentējošiem paraugiem: Atlikušais 3:1 metanolā/etiķskābē fiksētais materiāls no prenataliem amnija šķidruma paraugiem. Pētījumā izmantoto paraugu apjoms bija 172 paraugi, no kuriem 15 paraugi bija trisomijas 13 pozitīvi un 157 paraugi bija trisomijas 13 negatīvi, kā arī 109 paraugi bija trisomijas 21 pozitīvi un 63 paraugi bija trisomijas 21 negatīvi. Rezultāti tika salīdzināti ar zināmo parauga statusu. Zonde pareizi noteica paraugu statusu visās instancēs.

Šo testu rezultāti tika analizēti, lai nodrošinātu klīnisku jutīgumu, klīnisku specifiskumu un kļūdaini pozitīvo rezultātu rādītāja (false positive rate — FPR) vērtības pozitīviem signāliem, izmantojot viendimensijas pieeju.

5. tabula Zondes komplekta Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe Kit klīniskā veikspēja

Mainīgais	Rezultāts
Klīniskais jutīgums (pareizi pozitīvo rezultātu rādītājs (true positive rate — TPR))	100,0%
Klīniskais specifiskums (pareizi negatīvo rezultātu rādītājs (true negative rate — TNR))	100,0%
Kļūdaini pozitīvo rezultātu rādītājs (false positive rate — FPR) = 1 – specifiskums	0,00%

Drošuma un veikspējas kopsavilkums (Summary of Safety and Performance — SSP)

SSP jābūt publiski pieejamam, izmantojot Eiropas medicīnisko ierīču datubāzi (Eudamed), kur tas ir saistīts ar pamata UDI-DI. Eudamed URL: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> Pamata UDI-DI: 50558449LPA003GL

Ja Eudamed nedarbojas pilnībā, SSP ir publiski pieejams pēc pieprasījuma pa e-pastu SSP@ogt.com.

Papildinformācija

Lai saņemtu papildinformāciju par produktu, sazinieties ar CytoCell tehniskā atbalsta nodaļu.
Tālr.: +44 (0)1223 294048
E-pasts: techsupport@cytocell.com
Timeklī: www.ogt.com

Atsauces

- 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, M.S., Barch, M.J. 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.

Simbolu glosārijs

EN ISO 15223-1:2021 — “Medicīniskās ierīces — simboli, kas jāizmanto kopā ar ražotāja nodrošināto informāciju — 1. daļa. Vispārīgas prasības (© International Organization for Standardization)		
Simbols	Nosaukums	Atsauces numurs(-i)
	Iv: Ražotājs	5.1.1
	Iv: Pilnvarotais pārstāvis Eiropas	5.1.2

	Kopienā/Eiropas Savienībā	
	Iv: Derīguma termiņš	5.1.4
	Iv: Partijas kods	5.1.5
	Iv: Kataloga numurs	5.1.6
	Iv: Sargāt no saules gaismas	5.3.2
	Iv: Temperatūras ierobežojums	5.3.7
	Iv: Skatīt lietošanas instrukciju	5.4.3
 ogt.com/IFU	Iv: Skatīt elektronisko lietošanas instrukciju	5.4.3
	Iv: Uzmanību!	5.4.4
	Iv: <i>In vitro</i> diagnostikas medicīniskā ierīce	5.5.1
	Iv: Saturs ir pietiekams <n> testiem	5.5.5
	Iv: Unikālais ierīces identifikators	5.7.10
EDMA simboli IVD reaģentiem un komponentiem, 2009. gada oktobra redakcija		
Simbols	Nosaukums	Atsauces numurs(-i)
	Iv: Sastāvs (vai satur)	N/p

Patenti un preču zīmes
 CytoCell ir reģistrēta Cytozell Limited preču zīme.



Cytocell Limited
Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
APVIENOTĀ KARALISTE

Tālr.: +44 (0)1223 294048
Fakss: +44 (0)1223 294986
E-pasts: probes@cytozell.com
Tīmeklī: www.ogt.com

EC

REP

Sysmex Europe SE
Bornbarch 1
22848 Norderstedt
VĀCIJA

Tālr.: +49 40 527260
Tīmeklī: www.sysmex-europe.com

Lietošanas instrukcijas variantu vēsture
 V001.00 2023-01-11: Jauna lietošanas instrukcija atbilstoši Regulai (ES) 2017/746
 V002 2025-08-29: UKCA zīmes noņemšana.