



A Sysmex Group Company



Návod k použití

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

Prenatal Enumeration Probe Kit



POUZE K PROFESIONÁLNÍMU POUŽITÍ



ogt.com/IFU

Další informace a více jazyků k dispozici na webové stránce ogt.com/IFU

Zamýšlený účel

Sada sond CytoCell® Prenatal Enumeration Probe Kit je kvalitativní, neautomatizovaný test založený na fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH), který se používá k detekci alfa-centromerických oblastí chromozomů Xp11.1-q11.1, Yp11.1-q11.1 a 18p11.1-q11.1 a oblastí chromozomů 13q14.2 a 21q22.1. Test se provádí na buňkách fixovaných Carnoyovým roztokem (metanol / kyselina octová v poměru 3 : 1), získaných ze vzorků plodové vody za účelem stanovení počtu chromozomů X, Y, 13, 18 a 21 u vysoce rizikových těhotenství s podezřením na Turnerův, Patauův, Edwardsův nebo Downův syndrom.

Návod k použití

Tento prostředek je navržen jako doplněk k dalším klinickým a laboratorním vyšetřením v rámci uznávaných diagnostických a léčebných postupů, jako je ultrazvukový screening a biochemické testování, v případech, kdy je pro další postup péče o pacientku důležitá znalost stavu počtu kopií alfa-centromerických oblastí chromozomů Xp11.1-q11.1 a 18p11.1-q11.1 a oblastí chromozomů 13q14.2 a 21q22.1.

Omezení

Tento prostředek je navržen k detekci chromozomálního materiálu, který zahrnuje centromerické oblasti pokryté zelenými, oranžovými a aqua klony v komponentě prenatalní sondy pro stanovení počtu chromozomů X, Y a 18, a to v uvedeném pořadí pro chromozomy X, Y a 18. Genomové zisky nebo ztráty mimo tyto oblasti, případně částečné ztráty nebo zisky v těchto oblastech, nemusí být tímto prostředkem detekovány.

Tento prostředek je rovněž navržen k detekci chromozomálního materiálu, který zahrnuje oblasti chromozomů 13q14.2 a 21q22.1 pokryté zelenými a oranžovými klony v komponentě prenatalní sondy pro stanovení počtu chromozomů 13 a 21. Genomové zisky nebo ztráty mimo tyto oblasti, případně částečné ztráty nebo zisky v těchto oblastech, nemusí být tímto produktem detekovány.

Tento prostředek není určen k použití v rámci samostatné diagnostiky, jako doprovodná diagnostika, ke screeningu populace, k testování přímo u pacientů ani k provádění autotestování.

Tento prostředek nebyl validován pro jiné typy vzorků, typy onemocnění nebo účely než jsou ty, které jsou uvedeny v zamýšleném účelu. Tento prostředek nebyl validován pro použití k detekci zisků chromozomů X a/nebo Y.

Tento prostředek je koncipován jako doplněk dalších diagnostických laboratorních testů. Terapeutické postupy nesmějí být zahajovány pouze na základě výsledků testů FISH.

Hlášení a interpretace výsledků FISH musejí provádět pracovníci s vhodnou kvalifikací v souladu s profesionálními standardy praxe. Rovněž musejí zohledňovat další klinické a diagnostické informace.

Tento prostředek je určen pouze pro profesionální laboratorní použití.

Nedodržení protokolu může ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním či negativním výsledkům.

Principy testu

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika umožňující detekovat sekvenční DNA na metafázových chromozomech nebo v interfázních jádrech z fixovaných cytogenetických vzorků. Tato technika využívá sondy DNA, které hybridizují na celé chromozomy nebo na jednotlivé jedinečné sekvenční DNA, které

jako důležitý doplněk klasické cytogenetiky. Díky poslednímu vývoji je nyní možno tuto cennou techniku aplikovat jako základní diagnostický nástroj při prenatalní, hematologické a patologické chromozomální analýze. Po fixování a denaturaci je cílová DNA k dispozici pro reasociaci na podobně denaturovanou, fluorescenčně označenou sondu DNA, která má komplementární sekvenci. Po hybridizaci se nevázaná a nespecificky vázaná DNA sonda odstraní a DNA se označí kontrastním barvivem pro účely vizualizace. Fluorescenční mikroskopie potom umožňuje vizualizaci hybridizované sondy na cílovém materiálu.

Informace o sondě

Molekulární cytogenetická analýza hraje klíčovou roli v prenatalním vyhodnocení vysoce rizikových těhotenství, neboť umožňuje přesnou identifikaci chromozomálních abnormalit a posouzení rizika jejich opakování. Nejčastějšími chromozomálními abnormalitami jsou aneuploidie, definované jako abnormální počet kopií chromozomů. Postižení jedinci se obvykle projevují trizomií (tři kopie chromozomu) nebo monozomií (jedna kopie chromozomu).¹ Mezi dobře známé, klinicky významné aneuploidie patří trizomie 13, 18 a 21 a také monozomie X. Tyto abnormality jsou hlavními faktory přispívajícími k vývojovým poruchám a nepříznivým výsledkům reprodukce a patří k nejčastějším indikacím k invazivní prenatalní diagnostice.²

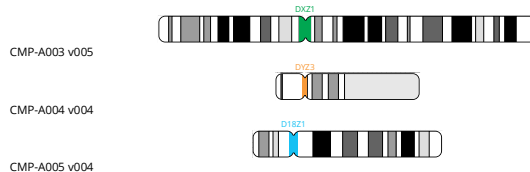
Trizomie 21 (Downův syndrom), nejčastější životaschopná autozomální trizomie, je charakterizována kognitivní poruchou, vrozenými srdečními vadami a multisystémovou morbiditou; zůstává klíčovou indikací pro prenatalní genetické testování.^{3,4} Trizomie 13 (Patauův syndrom) je charakterizována malformacemi mozku (holoprosencefalie), obličejovým dysmorfismem, očními anomáliemi, postaxiální polydaktylií, viscerálními malformacemi (kardiopatie) a těžkou psychomotorickou retardací.⁵ Trizomie 18 (Edwardsův syndrom) je spojena s těžkými vrozenými malformacemi, vysokou perinatální mortalitou a jasně definovanými ultrasonografickými fenotypy, což podtrhuje nezbytnost přesné prenatalní detekce a genetického potvrzení.^{6,7} Monozomie X (Turnerův syndrom), označovaná také jako syndrom vrozené ovariální hypoplazie, je nejčastější abnormalitou pohlavních chromozomů u žen a vzniká v důsledku úplné nebo částečné absence jednoho chromozomu X.⁸

Prenatalní diagnostika je nabízena u vysoce rizikových těhotenství se zvýšeným rizikem chromozomálních abnormalit, jako jsou trizomie 13, 18, 21 a monozomie X. FISH je validovaná molekulární cytogenetická metoda pro rychlou detekci a stanovení počtu kopií chromozomů v interfázních jádrech. Metoda FISH umožňuje cílenou detekci běžných aneuploidií a poskytuje rychlé výsledky pro podporu klinického rozhodování. Je široce využívána v moderní diagnostice aneuploidií, zejména v případech, kdy je vyžadováno okamžité potvrzení stavu počtu kopií chromozomů.^{9,10,11}

Parametry sondy

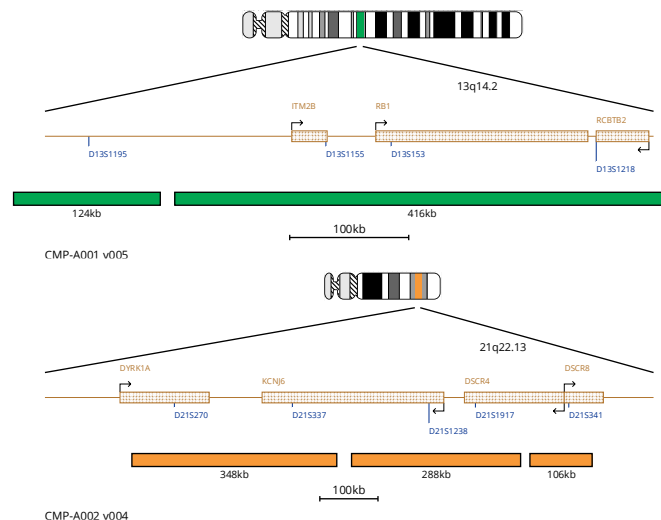
LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Centromera X, Xp11.1-q11.1 (DXZ1), zelená
Centromera Y, Yp11.1-q11.1 (DYZ3), oranžová
Centromera 18, 18p11.1-q11.1 (D18Z1), aqua



LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Unikátní sekvenční 13, 13q14.2, zelená
Unikátní sekvenční 21, 21q22.13, oranžová



Sada obsahuje dvě komponenty sond pro dvě samostatné hybridizace.

LPA002

Komponenta sondy LPA002 je směsí zelených, oranžových a aqua přímo značených fluorescenčních DNA sond:

- Zelená sonda DXZ1 přímo značí sekvenční alfa-satelitní DNA v oblasti DXZ1 chromozomu X.

- Oranžová sonda DYZ3 přímo značí sekvenční alfa-satelitní DNA v oblasti DYZ3 chromozomu Y.
- Aqua sonda D18Z1 přímo značí sekvenční alfa-satelitní DNA v oblasti D18Z1 chromozomu 18.

LPA003

Komponenta sondy LPA003 je směsí zelených a oranžových přímo značených fluorescenčních DNA sond obsahujících unikátní sekvenční:

- Zelená směs sond obsahuje 124kb sondu a 416kb sondu v oblasti 13q14.2, která zahrnuje geny ITM2B, RB1 a RCBTB2, včetně markerů D13S1195, D13S1155, D13S153 a D13S1218.
- Oranžová směs sond obsahuje 348kb sondu, 288kb sondu a 106kb sondu v oblasti 21q22.13, která zahrnuje geny DYRK1A, KCNJ6, DSCR4 a DSCR8, včetně markerů D21S270, D21S337, D21S1238, D21S1917 a D21S341.

Dodaný materiál

Sonda: 50 µl na lahvičku v sadě pro 5 testů, 100 µl na lahvičku v sadě pro 10 testů, 300 µl na lahvičku v sadě pro 30 testů, 500 µl na lahvičku v sadě pro 50 testů. Komponenty sondy jsou dodávány již smíchané v hybridizačním roztoku (< 65 % formamidu, < 20 mg dextran-sulfátu, < 10 % 20× koncentrovaného solného roztoku citrátu sodného (saline-sodium citrate, SSC)) a jsou připraveny k použití.

Kontrastní barvivo: 150 µl na lahvičku v sadě pro 5 testů, 500 µl na lahvičku v sadě pro 10 testů, 1 000 µl na lahvičku v sadě pro 30 testů, 1 200 µl na lahvičku v sadě pro 50 testů. Kontrastním barvivem je DAPI Antifade ES (0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidin-2-fenylinol) v montovacím médiu na bázi glycerolu).

Varování a bezpečnostní pokyny

1. Pro diagnostické použití *in vitro*. Pouze pro profesionální laboratorní použití.
2. Obsluha musí zajistit, aby byl za všech okolností používán a dodržován správný a nejaktuálnější návod k použití.
3. Směsi v sondách obsahují formamid, což je teratogen. Nevdechujte výpary a zamezte kontaktu s pokožkou. Zacházejte s ním opatrně. Noste rukavice a laboratorní plášť.
4. S barvivem DAPI zacházejte opatrně. Noste rukavice a laboratorní plášť.
5. Nepoužívejte, pokud jsou lahvičky poškozeny nebo je obsah lahviček jakýmkoli způsobem narušen.
6. Při stanovování bezpečné likvidace tohoto produktu se řiďte místními předpisy o likvidaci pro vaši lokalitu a doporučeními uvedenými v bezpečnostním listu. To platí i pro poškozený obsah testovací sady.
7. Všechny použité reagenty a jakýkoli jiný kontaminovaný jednorázový materiál zlikvidujte podle postupů zavedených pro infekční nebo potenciálně infekční odpad. Je odpovědností každé laboratoře nakládat s pevnými a kapalnými odpady podle jejich povahy a stupně nebezpečnosti a zacházet s nimi a likvidovat je (nebo je nechat zpracovat a zlikvidovat) v souladu s platnými předpisy.
8. Pracovníci musejí být schopni rozlišit aqua (akvamarníovou), oranžovou a zelenou barvu.
9. Nedodržení předepsaného protokolu, vybavení a reagentů může ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním či negativním výsledkům.
10. Sonda se nesmí ředit ani míchat s jinými sondami.
11. Není-li během kroku predenaturace v rámci protokolu použito 10 µl sondy, může to ovlivnit funkci a vést k falešně pozitivním či negativním výsledkům.
12. Všechny produkty by měly být před použitím validovány.
13. Vnitřní kontroly by měly být prováděny s použitím neovlivněných buněčných populací v testovacích vzorcích.
14. Je třeba přijmout bezpečnostní opatření, aby se zabránilo kontaminaci mezi lahvičkami obsahujícími LPA002 a LPA003.

Vymezení teplot

- -20 °C / zmrazeno / v mrazničce: -25 °C až -15 °C
- 37 °C: +37 °C ± 1 °C
- 72 °C: +72 °C ± 1 °C
- 75 °C: +75 °C ± 1 °C
- Pokojová teplota (PT): +15 °C až +25 °C

Uchovávání a manipulace

 Sadu je třeba uchovávat v mrazničce při teplotách -25 °C až -15 °C až do data expirace, uvedeného na štítku sady. Sonda a lahvičky s kontrastními barvivy musejí být uloženy v temnu.



Sonda FISH, kontrastní barvivo DAPI Antifade ES a hybridizační roztok zůstávají stabilní během cyklů zmrazování a rozmrazování, k nimž dochází během běžného používání (kdy jeden cyklus představuje vyjmutí lahvičky z mrazničky a její vrácení do mrazničky). **FISH sondy:** 5 cyklů pro sadu s 5 testy, 10 cyklů pro sadu s 10 testy, 30 cyklů pro sadu s 30 testy, 50 cyklů pro sadu s 50 testy. **Kontrastní barvivo:** 10 cyklů pro sadu s 5 testy, 20 cyklů pro sadu s 10 testy, 60 cyklů pro sadu s 30 testy, 100 cyklů pro sadu s 50 testy. Expozici světlu je třeba minimalizovat, a pokud možno, se jí vyhnout. Složky skladujte v dodané nádobě odolné proti přístupu světla. Složky používané a skladované za jiných podmínek, než jsou uvedeny na štítku, nemusí fungovat podle očekávání a mohou nepříznivě ovlivnit výsledky analýzy. Je třeba vynaložit veškeré úsilí na omezení expozice světlu.

Potřebné vybavení a materiál, které nejsou součástí dodávky
Je nutné používat kalibrovaná zařízení:
1. Varná deska (s pevnou plotnou a přesným ovládáním teploty do 80 °C)
2. Kalibrované mikropipety s různým objemem a špičkami v rozsahu od 1 µl do 200 µl
3. Vodní lázeň s přesným ovládáním teploty od 37 °C do 72 °C
4. Mikrocentrifugační zkumavky (0,5 ml)
5. Fluorescenční mikroskop (viz oddíl Doporučený fluorescenční mikroskop)

6. Mikroskop s fázovým kontrastem
7. Čisté plastové, keramické nebo skleněné (z ohnivzdorného skla) lahvičky typu „coplin“
8. Chirurgické kleště
9. Kalibrovaný pH metr (nebo pH indikační proužky schopné měřit pH v rozmezí 6,5–8,0)
10. Vlhčená nádoba
11. Imerzní olej na objektiv fluorescenčního mikroskopu
12. Stolní odstředivka
13. Mikroskopová sklička
14. Krycí sklička 24 x 24 mm
15. Stopky
16. Inkubátor 37 °C
17. Lepidlo na bázi kaučukového roztoku
18. Vířivý mixér
19. Odměrné válce
20. Magnetická míchačka
21. Kalibrovaný teploměr

Volitelné vybavení, které není součástí dodávky

1. Cytogenetická sušicí komora

Potřebné reagenty, které nejsou součástí dodávky

1. 20× koncentrovaný solný roztok citrátu sodného (SSC)
2. 100 % etanol
3. Tween-20
4. 1 M hydroxidu sodného (NaOH)
5. 1 M kyseliny chlorovodíkové (HCl)
6. Demineralizovaná voda

Doporučený fluorescenční mikroskop

Pro optimální vizualizaci použijte 100wattovou rtuťovou lampu nebo podobnou a apochromatické objektivy se zvětšením 60/63× nebo 100× s imerzním olejem. Fluorofory použité v této sadě sond budou excitovat a emitovat při následujících vlnových délkách:

Fluorofor	Excitace _{max} [nm]	Emise _{max} [nm]
Aqua	418	467
Zelený	495	521
Oranžový	551	572

Zajistěte, aby byl mikroskop vybaven příslušnými excitačními a emisními filtry, které pokrývají výše uvedené vlnové délky.

Třípásmový filtr DAPI/FITC/TRITC je optimální pro současnou pozorování zelených a oranžových fluoroforů i kontrastního barvení. Aqua fluorofor má specifitu pro spektrum Aqua a DEAC (je vyžadován jednopásmový filtr Aqua nebo DEAC).

Před použitím zkontrolujte správnou funkci fluorescenčního mikroskopu. Použijte imerzní olej vhodný pro fluorescenční mikroskopy připravený pro nízkou autofluorescenci. Dbejte na to, aby nedošlo ke smíchání barviva DAPI antifade s imerzním olejem do mikroskopu, protože by tak došlo k zastření signálů. Dodržujte doporučení výrobce týkající se životnosti lampy a stáří filtrů.

Příprava vzorků

Sada je určena pro použití na buňkách fixovaných Carnoyovým roztokem (metanol / kyselina octová v poměru 3 : 1) získaných ze vzorků plodové vody, a to za účelem stanovení počtu chromozomů X, Y, 13, 18 a 21 u vysoce rizikových těhotenství s podezřením na Turnerův, Patauův, Edwardsův nebo Downův syndrom. Vzorky musejí být připraveny v souladu s pokyny laboratoře nebo příslušného zdravotnického zařízení. Odběr vzorků plodové vody by měl být prováděn podle pokynů laboratoře nebo příslušného zdravotnického zařízení. Vzorky, které se jeví jako krvavé nebo hnědé, by se neměly používat, protože mohou obsahovat mateřskou krev, což může vést k falešným výsledkům. Na mikroskopová sklička naneste vzorky usušené na vzduchu v souladu se standardními cytogenetickými postupy. *Cytogenetics Laboratory Manual* AGT (Příručka pro cytogenetické laboratoře) obsahuje doporučení pro odběr, kultivaci a získávání vzorků a pro přípravu skliček.¹²

Příprava roztoků

Etanolové roztoky

Rozředte 100 % etanol demineralizovanou vodou v následujících poměrech a řádně promíchejte:

- 70 % etanol - 7 dílů 100 % etanolu na 3 díly demineralizované vody
- 85 % etanol - 8,5 dílu 100 % etanolu na 1,5 dílu demineralizované vody

Roztoky skladujte až 6 měsíců při pokojové teplotě ve vzduchotěsné nádobě.

Roztok 2xSSC

Zředte 1 díl roztoku 20xSSC 9 díly demineralizované vody a řádně promíchejte. Zkontrolujte pH a pomocí NaOH nebo HCl podle potřeby upravte na pH 7,0. Roztok skladujte ve vzduchotěsné nádobě při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů.

Roztok 0,4xSSC

Zředte 1 díl roztoku 20xSSC 49 díly demineralizované vody a řádně promíchejte. Zkontrolujte pH a pomocí NaOH nebo HCl podle potřeby upravte na pH 7,0. Roztok skladujte ve vzduchotěsné nádobě při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů.

Roztok 2xSSC, 0,05 % roztok Tween-20

Zředte 1 díl roztoku 20xSSC 9 díly demineralizované vody. Na 10 ml přidejte 5 µl roztoku Tween-20 a řádně promíchejte. Zkontrolujte pH a pomocí NaOH nebo HCl podle potřeby upravte na pH 7,0. Roztok skladujte ve vzduchotěsné nádobě při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů.

Protokol FISH

(Poznámka: Dbejte prosím na to, aby vždy byla omezena expozice sondy světlem v laboratoři.)

Příprava sklička

1. Naneste buněčný vzorek na mikroskopové skličko. Nechte ho uschnout. (**Volitelné při použití cytogenetické sušicí komory:** K optimálnímu nanesení buněčných vzorků by měla komora pracovat při teplotě přibližně 25 °C a vlhkosti 50 %. Pokud cytogenetickou sušicí komoru nemáte, použijte jako alternativu digestoř.)
2. Skličko ponořte na 2 minuty do roztoku 2xSSC při pokojové teplotě. Neprotřepávejte.
3. Dehydratujte pomocí etanolové série (70 %, 85% a 100 %), vždy po dobu 2 minut při pokojové teplotě.
4. Nechte ho uschnout.

Predenaturace

5. Vyjměte sondu z mrazničky a nechte ji zahřát na pokojovou teplotu. Zkumavky před použitím krátce odstředte.
6. Dbejte na to, aby byl roztok sondy rovnoměrně promíchán pipetou.
7. Na každý test odeberte 10 µl sondy a přeneste ji do mikrocentrifugační zkumavky. Zbytek sondy vraťte rychle do mrazničky.
8. Sondu a skličko se vzorkem umístěte na varnou desku a předeheřte po dobu 5 minut při teplotě 37 °C (+/-1 °C).
9. Kápněte 10 µl směsi sondy na buněčný vzorek a opatrně jej překryjte krycím sklíčkem. Neprodyšně uzavřete pomocí kaučukového lepidla a nechte lepidlo úplně uschnout.

Denaturace

10. Zahřívání sklička na varné desce po dobu 2 minut při teplotě 75 °C (+/-1 °C) vzorek a sondu souběžně denaturujte.

Hybridizace

11. Skličko uložte na noc do vlhké neprůsvitné nádoby při teplotě 37 °C (+/-1 °C).

Post-hybridizační vymývání

12. Vyjměte DAPI z mrazničky a nechte ho zahřát na pokojovou teplotu.
13. Opatrně sejměte krycí skličko a odstraňte všechny zbytky lepidla.
14. Skličko ponořte na 2 minuty do roztoku 0,4xSSC (pH 7,0) při teplotě 72 °C (+/-1 °C). Neprotřepávejte.
15. Skličko osušte a na 30 sekund ponořte do roztoku 2xSSC, 0,05 % Tween-20 při pokojové teplotě (pH 7,0). Neprotřepávejte.
16. Skličko osušte a na každý vzorek naneste 10 µl DAPI antifade.
17. Přikryjte krycím sklíčkem, odstraňte veškeré bubliny, uložte do temna a po dobu 10 minut nechte vyvíjet barvu.
18. Zkontrolujte pomocí fluorescenčního mikroskopu (viz **Doporučení ohledně fluorescenčního mikroskopu**).

Doporučení pro zpracování

1. Vypalování nebo stárnutí sklíček může snižovat fluorescenční signál.
2. Podmínky hybridizace mohou být nepříznivě ovlivněny použitím reagentů, které nedodává nebo nedoporučuje společnost Cytocell Ltd.
3. K měření teplot roztoků, vodních lázní a inkubátorů používejte kalibrovaný teploměr, protože tyto teploty jsou velmi důležité k zajištění optimální funkce produktu.
4. Koncentrace promývacího roztoku, pH a teplota jsou důležité, protože nedostatečná důslednost může vést k nespecifickému vázání sondy a přílišná důslednost naopak k nedostatečnému signálu.
5. Neúplná denaturace může vést k nedostatečnému signálu a příliš dlouhá denaturace může rovněž způsobit nespecifické vázání.
6. Nadměrná hybridizace může vést k dodatečným nebo neočekávaným signálům.
7. Uživatelé musejí před použitím testu pro diagnostické účely optimalizovat protokol pro své vlastní vzorky.
8. Neoptimální podmínky mohou vést k nespecifickému vázání, které může být nesprávně interpretováno jako signál sondy.

Interpretace výsledků

Vyhodnocení kvality sklička

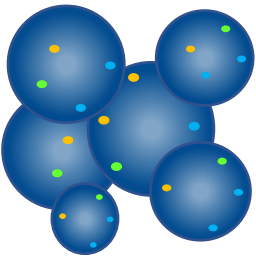
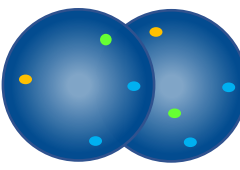
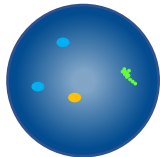
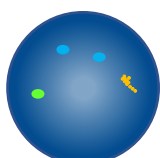
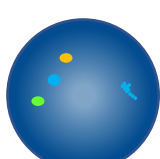
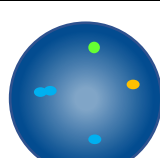
Skličko by se **nemělo** analyzovat, jestliže:

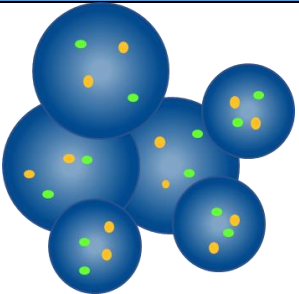
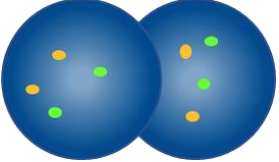
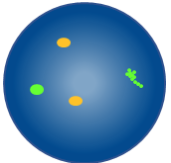
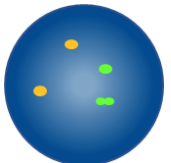
- jsou signály příliš slabé, a nelze je proto analyzovat jednoduchými filtry – pro pokračování v analýze musejí být signály jasné, výrazné a snadno hodnotitelné;
- analýze brání velký počet shluků buněk nebo překrývajících se buněk;
- nebylo hybridizováno >50 % buněk;
- mezi buňkami se nachází příliš mnoho fluorescenčních částic a/nebo fluorescenčního zákalu, který ruší signály – u optimálních sklíček by mělo být pozadí tmavé nebo černé a čiré;
- není možné rozlišit hranice buněčných jader a hranice nejsou nepoškozené.

Pokyny pro analýzu

- Každý vzorek musejí analyzovat a vyhodnotit dva analytici. Jakékoliv nesrovnalosti se musejí vyřešit hodnocením třetího analytika.
- Všichni analytici musejí mít odpovídající kvalifikaci v souladu s uznávanými národními standardy.
- Každý analytik musí nezávisle vyhodnotit dostatečný počet jader z každého vzorku tak, aby kombinovaná skóre analytiků splňovala minimální kritéria stanovená institucionálními, regionálními nebo národními směnicemi. První analytik musí začít provádět analýzu z levé strany sklička a druhý analytik z pravé strany.
- Každý analytik musí zdokumentovat své výsledky na samostatných listech.

- Analyzujte pouze nepoškozená jádra, nikoli překrývající se nebo nahromaděná jádra ani jádra překrytá cytoplazmatickým odpadem či jádra s vysokým stupněm autofluorescence.
- Vyhněte se místům, kde je příliš mnoho cytoplazmatického odpadu nebo kde se vyskytuje nespecifická hybridizace.
- Intenzita signálu se může lišit, dokonce i v rámci jediného jádra. V takových případech použijte jednoduché filtry a/nebo upravte ohniskovou rovinu.
- Za neoptimálních podmínek se mohou signály jevit jako rozptýlené. Jestliže se dva signály stejné barvy vzájemně dotýkají nebo je mezi nimi vzdálenost menší než dvě šířky signálu, případně pokud dva signály spojuje slabý pruh, počítejte je jako jeden signál.
- Pokud si nejste jisti, zda lze buňku analyzovat či nikoli, analýzu neprovádějte.

Pokyny pro analýzu – LPA002	
	Nepočítejte – jádra jsou příliš těsně u sebe, takže není možno určit hranice.
	Nepočítejte překrývající se jádra – nejsou viditelné všechny oblasti obou jader.
	Počítejte jako jeden zelený signál, jeden oranžový signál a dva aqua signály – zelený signál je rozptýlený.
	Počítejte jako jeden zelený signál, jeden oranžový signál a dva aqua signály – oranžový signál je rozptýlený.
	Počítejte jako jeden zelený signál, jeden oranžový signál a dva aqua signály – jeden ze dvou aqua signálů je rozptýlený.
	Počítejte jako jeden zelený signál, jeden oranžový signál a dva aqua signály – mezera v aqua signálu je menší než dvě šířky sondy.

Pokyny pro analýzu – LPA003	
	Nepočítejte – jádra jsou příliš těsně u sebe, takže není možno určit hranice.
	Nepočítejte překrývající se jádra – nejsou viditelné všechny oblasti obou jader.
	Počítejte jako dva oranžové a dva zelené signály – jeden ze dvou zelených signálů je rozptýlený.
	Počítejte jako dva oranžové a dva zelené signály – mezera v jednom zeleném signálu je menší než dvě šířky signálu

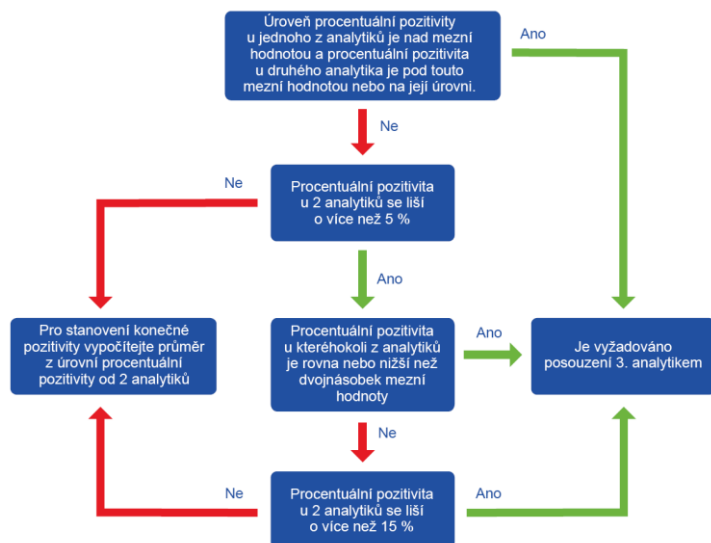
Požadavky na třetího analytika

V závislosti na počtu abnormálních jader zjištěných každým analytikem, může být zapotřebí třetí analytik. Třetí analytik bude analyzovat stejný počet jader jako první dva analytici, jak je stanoveno institucionálními, regionálními nebo národními směnicemi. Pravidla týkající se třetího analytika jsou podrobně uvedena v textu a ve vývojovém diagramu níže.

Třetí analytik se požaduje, pokud:

- Procentuální pozitivita u jednoho z analytiků je nad mezní hodnotou a procentuální pozitivita u druhého analytika je pod touto mezní hodnotou nebo na její úrovni.
- Procentuální pozitivita u obou analytiků se liší o více než 5 % a procentuální pozitivita u kteréhokoli z nich je rovna nebo nižší než dvojnásobek mezní hodnoty.
- Procentuální pozitivita u obou analytiků se liší o více než 15 %.

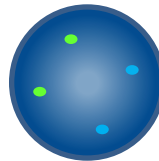
Ze tří získaných skóre budou pro konečnou pozitivitu zprůměrovány dvě nejbližší kladné procentuální hodnoty. Pokud mají 3 výsledky stejný rozdíl, je třeba použít hodnotu mediánu positivity.



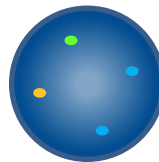
Předpokládané výsledky

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Předpokládané vzory normálního signálu

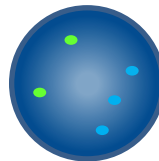


U normální ženské buňky se předpokládají dva zelené a dva aqua signály (2Z2A).

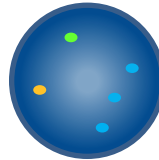


U normální mužské buňky se předpokládají jeden zelený, jeden oranžový a dva aqua signály (1Z1O2A).

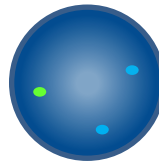
Předpokládané vzorce abnormálního signálu



U ženské buňky s trizomií 18 bude očekávaný vzorec signálů: dva zelené signály a tři aqua signály (2Z3A).



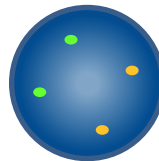
U mužské buňky s trizomií 18 bude očekávaný vzorec signálů: jeden zelený signál, jeden oranžový signál a tři aqua signály (1Z1O3A).



U buňky s Turnerovým syndromem bude očekávaný vzorec signálů: jeden zelený signál a dva aqua signály (1Z2A).

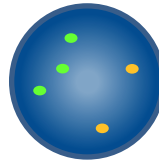
LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Předpokládaný vzor normálního signálu

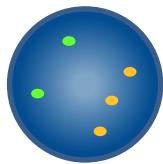


U normální buňky se očekávají dva zelené a dva oranžové signály (2Z2O).

Předpokládané vzorce abnormálního signálu



U buňky s trizomií 13 se očekávají tři zelené signály a dva oranžové signály (3Z2O).



U buňky s trizomií 21 se očekávají dva zelené signály a tři oranžové signály (2Z3O).

U aneuploidních/nevyvážených vzorků jsou možné jiné vzory signálů.

Znamé relevantní interference / rušivé látky

Žádné známé relevantní interference / rušivé látky.

Znamá zkřížená reaktivita

Sonda DXZ1 může vykazovat zkříženou hybridizaci s centromerami chromozomů 1, 11, 17 a Y.

Sonda DYZ3 může vykazovat zkříženou hybridizaci s centromerami chromozomů 13, 14, 15, 20, 21, 22 a X.

Sonda D18Z1 může vykazovat zkříženou hybridizaci s centromerami chromozomů 2, 4, 8, 9, 13, 14, 15, 20, 21 a 22.

Hlášení závažných incidentů

Pro pacienta, uživatele či třetí stranu v Evropské unii a v zemích se stejným regulačním režimem (nařízení (EU) 2017/746 o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro): pokud během používání tohoto prostředku nebo v důsledku jeho používání dojde k závažné události, nahláste ji výrobci a místnímu příslušnému vnitrostátnímu orgánu.

Závažné incidenty v jiných zemích nahláste výrobci a případně místnímu příslušnému vnitrostátnímu orgánu.

Kontaktní osoba pro vigilanci u výrobce: vigilance@oqt.com

Seznam kontaktních osob pro vigilanci u příslušných vnitrostátních orgánů v EU je k dispozici na webové stránce:

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

Specifické výkonnostní charakteristiky

Analytická specifita

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Analytická specifita je definována jako procento signálů, které hybridizují do správného lokusu a na žádné jiné místo. Byly analyzovány 4 chromozomální lokusy v každé z 20 metafázických buněk z 5 vzorků, což poskytlo po 100 datových bodech pro chromozom X i Y a 200 datových bodů pro chromozom 18. Bylo zmapováno umístění všech hybridizovaných sond a byl zaznamenán počet FISH signálů metafázových chromozomů hybridizovaných na správný lokus.

Analytická specifita jednotlivých sond v sadě byla vypočtena jako počet signálů FISH metafázového chromozomu hybridizovaných na správný lokus vydělený celkovým počtem hybridizovaných FISH signálů metafázového chromozomu. Tento výsledek byl vyjádřen jako procento s 95 % intervalem spolehlivosti.

Tabulka 1. Analytická specifita prenatalní sondy LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Cíl	Počet hybridizovaných metafázových chromozomů	Počet správně hybridizovaných lokusů	Analytická specifita	95 % interval spolehlivosti
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

Analytická specifita je definována jako procento signálů, které hybridizují do správného lokusu a na žádné jiné místo. Byly analyzovány 4 chromozomální lokusy v každé z 20 metafázických buněk z 5 vzorků, což poskytlo po 200 datových bodech pro chromozom 13 i 21. Bylo zmapováno umístění všech hybridizovaných sond a byl zaznamenán počet FISH signálů metafázových chromozomů hybridizovaných na správný lokus.

Analytická specifita jednotlivých sond v sadě byla vypočtena jako počet signálů FISH metafázového chromozomu hybridizovaných na správný lokus vydělený celkovým počtem hybridizovaných FISH signálů metafázového chromozomu. Tento výsledek byl vyjádřen jako procento s 95 % intervalem spolehlivosti.

Tabulka 2. Analytická specifita prenatalní sondy LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Cíl	Počet hybridizovaných metafázových chromozomů	Počet správně hybridizovaných lokusů	Analytická specifita	95 % interval spolehlivosti
13q14.2	200	200	100 %	98,12–100 %
21q22.1	200	200	100 %	98,12–100 %

Analytická citlivost

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Analytická citlivost je procento hodnotitelných interfázických buněk s očekávaným normálním vzorcem signálů. U každé z 25 fixovaných buněčných suspenzí ze vzorků plodové vody od karyotypicky normálních mužů a 25 karyotypicky normálních žen, u nichž byla potvrzena normální výbava chromozomů 18, bylo analyzováno minimálně 50 interfázických buněk, což celkově představuje minimálně 2 500 vyhodnocených jader. Byly analyzovány údaje o citlivosti na základě procenta buněk vykazujících normální předpokládaný vzorec signálů a byly vyjádřeny jako procento s 95 % intervalem spolehlivosti.

Tabulka 3. Analytická citlivost prenatalní sondy LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Typ vzorku	Kritéria citlivosti	Výsledek citlivosti
Plodová voda	> 95 %	95,99 % (95,15–96,69 %)

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Analytická citlivost je procento hodnotitelných interfázických buněk s očekávaným normálním vzorcem signálů. U každé z 25 fixovaných buněčných suspenzí ze vzorků plodové vody od karyotypicky normálních mužů a žen, u nichž byla potvrzena normální výbava chromozomů 13 a 21, bylo analyzováno minimálně 50 interfázických buněk, což celkově představuje minimálně 1 250 vyhodnocených jader pro každý typ vzorku. Byly analyzovány údaje o citlivosti na základě procenta buněk vykazujících normální předpokládaný vzorec signálů a byly vyjádřeny jako procento s 95 % intervalem spolehlivosti.

Tabulka 4. Analytická citlivost prenatalní sondy LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Typ vzorku	Kritéria citlivosti	Výsledek citlivosti
Plodová voda	> 95 %	96,24 % (94,84–97,64 %)

Charakteristika normálních mezních hodnot

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Normální mezní data jsou definována jako procento buněk vykazujících falešně pozitivní signální vzorec, při němž by hodnota u pacienta byla považována za normální a neodpovídala klinické diagnóze. U každé z 25 fixovaných buněčných suspenzí ze vzorků plodové vody od karyotypicky normálních mužů a 25 karyotypicky normálních žen, u nichž byla potvrzena normální výbava chromozomů 18, bylo analyzováno minimálně 50 interfázických buněk, což celkově představuje minimálně 2 500 vyhodnocených jader.

Mezní hodnota byla určena pomocí funkce β -inverse (BETAINV) v aplikaci MS Excel. Byla vypočtena jako procento interfázických buněk vykazujících falešně pozitivní signální vzorec pomocí horní hranice jednostranného 95 % intervalu spolehlivosti binomického rozdělení u vzorku normálního pacienta.

Tabulka 5. Charakterizace normálních mezních hodnot prenatalní sondy LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Typ vzorku	Vzor signálů	Výsledek mezní hodnoty
Plodová voda	1Z1O3A	11,62 %
	2Z3A	8,97 %
	1Z2A	13,98 %

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Normální mezní data jsou definována jako procento buněk vykazujících falešně pozitivní signální vzorec, při němž by hodnota u pacienta byla považována za normální a neodpovídala klinické diagnóze. U každé z 25 buněčných suspenzí z plodové vody od 25 karyotypicky normálních mužů nebo žen bylo analyzováno minimálně 50 interfázických buněk, což celkově představuje minimálně 1 250 vyhodnocených jader pro každý typ vzorku.

Mezní hodnota byla určena pomocí funkce β -inverse (BETAINV) v aplikaci MS Excel. Byla vypočtena jako procento interfázických buněk vykazujících falešně pozitivní signální vzorec pomocí horní hranice jednostranného 95 % intervalu spolehlivosti binomického rozdělení u vzorku normálního pacienta.

Tabulka 6. Charakterizace normálních mezních hodnot prenatalní sondy LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Typ vzorku	Vzor signálů	Výsledek mezní hodnoty
Plodová voda	2Z3O	8,97 %
	3Z2O	

Laboratoře si musejí ověřit mezní hodnoty pomocí vlastních dat.^{13,14}

Preciznost

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Byla měřena preciznost tohoto produktu, pokud jde o preciznost v rámci jednoho dne (mezi vzorky), preciznost v různých dnech (mezi dny) a preciznost v rámci různých šarží na jednom pracovišti (mezi šaržemi).

K posouzení preciznosti tohoto produktu byly použity 3 vzorky: 1 vzorek plodové vody s mužským karyotypem (označený jako XY) s normální výbavou

chromozomu 18, 1 vzorek plodové vody s ženským karyotypem (označený jako XX) s normální výbavou chromozomu 18 a 1 slabě pozitivní vzorek plodové vody s ženským karyotypem s trizomií 18.

Preciznost v různých dnech a v rámci jednoho dne byla hodnocena testováním vzorků v triplikátech po dobu 10 na sebe nenavazujících dní. Preciznost mezi šaržemi byla hodnocena testováním 3 nezávislých šarží produktu v triplikátech s použitím stejných vzorků. Výsledky byly vyjádřeny jako celková shoda s očekávanou klasifikací (pozitivní nebo negativní).

Tabulka 7. Reprodukovatelnost a preciznost prenatalní sondy LPA002 Prenatal X, Y, and 18 Enumeration Probe

Proměnná	Typ vzorku	Shoda
V rámci dne	Negativní plodová voda, ženský plod	100,0 %
	Plodová voda s trizomií 18, ženský plod	90,0 %
Mezi dny	Negativní plodová voda, ženský plod	100,0 %
	Plodová voda s trizomií 18, ženský plod	90,0 %
	Negativní plodová voda, mužský plod	100,0 %
V různých šaržích	Negativní plodová voda, ženský plod	100,0 %
	Plodová voda s trizomií 18, ženský plod	100,0 %
	Negativní plodová voda, mužský plod	100,0 %

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Byla měřena preciznost tohoto produktu, pokud jde o preciznost v rámci jednoho dne (mezi vzorky), preciznost v různých dnech (mezi dny) a preciznost v rámci různých šarží na jednom pracovišti (mezi šaržemi).

K posouzení preciznosti tohoto produktu byly použity 3 vzorky: 1 normální vzorek plodové vody s potvrzenou normální výbavou chromozomů 13 a 21, 1 slabě pozitivní vzorek plodové vody s trizomií 13 a 1 slabě pozitivní vzorek plodové vody s trizomií 21.

Preciznost v různých dnech a v rámci jednoho dne byla hodnocena testováním vzorků v triplikátech po dobu 10 na sebe nenavazujících dní. Preciznost mezi šaržemi byla hodnocena testováním 3 nezávislých šarží produktu v triplikátech s použitím stejných vzorků. Výsledky byly vyjádřeny jako celková shoda s očekávanou klasifikací (pozitivní nebo negativní).

Tabulka 8. Reprodukovatelnost a preciznost prenatalní sondy LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Proměnná	Typ vzorku	Shoda
V rámci jednoho dne a v různých dnech	Negativní plodová voda	100,0 %
	Slabě pozitivní plodová voda s trizomií 13	100,0 %
	Slabě pozitivní plodová voda s trizomií 21	96,7 %
V různých šaržích	Negativní plodová voda	88,9 %
	Slabě pozitivní plodová voda s trizomií 13	100,0 %
	Slabě pozitivní plodová voda s trizomií 21	100,0 %

Klinická funkce

LPA002 Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Aby bylo zajištěno, že prenatalní sonda pro stanovení počtu chromozomů X, Y a 18 detekuje záměrná přeskupení, byla v rámci jedné studie stanovena klinická funkce na reprezentativních vzorcích cílové populace pro tento produkt: zbytkový materiál z prenatalních vzorků plodové vody fixovaný směsí metanolu a kyseliny octové (v poměru 3 : 1). Velikost souboru pro tuto studii činila 71 vzorků, přičemž soubor zahrnoval 3 vzorky pozitivní na trizomii 18, 2 vzorky pozitivní na monozomii X a 66 negativních vzorků. Všechny vzorky byly anonymizovány a randomizovány, aby nedošlo ke zkreslení analýzy. Výsledky byly porovnány se známým stavem vzorku. Sonda správně určila stav vzorků ve všech případech.

Výsledky těchto testů byly analyzovány, aby poskytly hodnoty klinické citlivosti, klinické specifity a míru falešné pozitivity (FPR) pozitivních signálů pomocí jednodimenzního přístupu.

Tabulka 9. Klinická funkce prenatalní sondy Prenatal X, Y and 18 Enumeration Probe

Proměnná	Výsledek
Klinická senzitivita (míra skutečné positivity, TPR)	100,0 %
Klinická specifita (míra skutečné negativity, TNR)	100,0 %
Míra falešné pozitivity (FPR) = 1 – specifita	0,0 %

LPA003 Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Aby bylo zajištěno, že prenatalní sonda pro stanovení počtu chromozomů 13 a 21 detekuje záměrná přeskupení, byla v rámci tří studií stanovena klinická funkce na reprezentativních vzorcích cílové populace pro tento produkt: zbytkový materiál z prenatalních vzorků plodové vody fixovaný směsí metanolu a kyseliny octové (v poměru 3 : 1). Velikost souboru pro tuto studii činila 172 vzorků, přičemž soubor zahrnoval 15 vzorků pozitivních na trizomii 13 a 157 vzorků negativních na trizomii 13; dále pak celkem 109 vzorků pozitivních na trizomii 21 a 63 vzorků negativních na trizomii 21. Výsledky byly porovnány se známým stavem vzorku. Sonda správně určila stav vzorků ve všech případech.

Výsledky těchto testů byly analyzovány, aby poskytly hodnoty klinické citlivosti, klinické specifity a míru falešné pozitivity (FPR) pozitivních signálů pomocí jednodimenzního přístupu.

Tabulka 10. Klinická funkce prenatalní sondy Prenatal 13 and 21 Enumeration Probe

Proměnná	Výsledek
Klinická senzitivita (míra skutečné positivity, TPR)	100,0 %
Klinická specifita (míra skutečné negativity, TNR)	100,0 %
Míra falešné pozitivity (FPR) = 1 – specifita	0,0 %

Souhrn údajů o bezpečnosti a klinické funkci (SSP)

Souhrn údajů o bezpečnosti a klinické funkci (SSP) musí být zpřístupněn veřejnosti prostřednictvím Evropské databáze zdravotnických prostředků (Eudamed), kde je propojen se základním UDI-DI prostředkem (Basic UDI-DI). URL adresa databáze Eudamed: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> Základní UDI-DI: 50558449LPA001GG

Pokud databáze Eudamed není plně funkční, bude SSP zpřístupněn veřejnosti na vyžádání zasláním e-mailu na adresu SSP@oqt.com.

Další informace

Další informace o produktu vám sdělí oddělení technické podpory společnosti CytoCell.
Tel.: +44 (0)1223 294048
E-mail: techsupport@cytoCELL.com
WWW: www.oqt.com

Reference

1. Alliance G.(2010). Chromosomal Abnormalities [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK132134/>.
2. Dey M, et al., (2013). Prenatal screening methods for aneuploidies. North American Journal of Medical Sciences.
3. Antonarakis SE, Strydom A., (2020). Down Syndrome. Nature Reviews Disease Primers.
4. Orphanet: Down syndrome [Internet]. www.orpha.net. Available from: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/870>.
5. Orphanet: Trisomy 13 [Internet]. www.orpha.net. Available from: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/3378>.
6. Pyle AK, et al. (2025) Guidance for Caring for Infants and Children With Trisomy 13 and Trisomy 18: Clinical Report. PEDIATRICS.
7. Balasundaram P, et al. (2023). Edwards syndrome. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan–. Updated 2025 Feb 15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570597/>.
8. Shankar Kikkeri N, et al., (2023). Turner Syndrome; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554621/>.
9. Best Practice Guidelines (2024). The Association for Clinical Genomic Science (ACGS). Cytogenetics Constitutional Guidelines.
10. NHS England - National genomic test directory for rare and inherited disease. Available from: <https://www.england.nhs.uk/publication/national-genomic-test-directories/>
11. Silva M. et al. (2019) European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. European Journal of Human Genetics.
12. Arsham, MS., Barch, MJ. and Lawce HJ. (eds.) (2017) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc. References
13. Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: fluorescence in situ hybridization. Genet Med. 2011;13(7):667-675.
14. Wiktor AE, Dyke DLV, Stupka PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW. *Precinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice*. Genetics in Medicine. 2006;8(1):16–23.

Slovníček symbolů

EN ISO 15223-1: 2021 – „Zdravotnické prostředky – Značky používané s informacemi poskytovanými se zdravotnickými prostředky – Část 1: Obecné požadavky“ (© Mezinárodní organizace pro standardizaci)		
Symbol	Název	Referenční číslo (čísla)
	cz: Výrobce	5.1.1

	cz: Autorizovaný zástupce v Evropském společenství / Evropské unii	5.1.2
	cz: Datum spotřeby	5.1.4
	cz: Kód šarže	5.1.5
	cz: Katalogové číslo	5.1.6
	cz: Chraňte před slunečním světlem	5.3.2
	cz: Omezení teploty	5.3.7
	cz: Viz návod k použití	5.4.3
 ogt.com/IFU	cz: Viz elektronický návod k použití	5.4.3
	cz: Upozornění	5.4.4
	cz: Zdravotnický diagnostický prostředek <i>in vitro</i>	5.5.1
	cz: Množství dostačuje k provedení <n> testů	5.5.5
	cz: Jedinečný identifikátor prostředku	5.7.10
Symbole EDMA pro reagentie a složky IVD, revize z října 2009		
Symbol	Název	Referenční číslo (číslo)
	cz: Obsah (nebo obsahuje)	N/A

Patenty a ochranné známky
CytoCell je registrovaná ochranná známka společnosti CytoCell Limited.



Cytocell Limited
Oxford Gene Technology
418 Cambridge Science Park
Milton Road
CAMBRIDGE
CB4 0PZ
SPOJENÉ KRÁLOVSTVÍ

Tel.: +44 (0)1223 294048
E-mail: probes@cytoCell.com
WWW: www.ogt.com



Sysmex Europe SE
Deelbøge 19 D
22297 Hamburk
NĚMECKO

WWW: www.sysmex-europe.com

Historie verzí návodu k použití
V001 2026-03-09: Nový návod k použití pro nařízení (EU) 2017/746