Vysis MDM2/CEP 12 FISH Probe Kit

en

REF 01N15-010

30-608268/R1

Vysis MDM2/CEP 12
FISH Probe Kit
REF 01N15-010
30-608268/R1

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Биологический риск
	Опасность
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis MDM2 / CEP 12 FISH Probe Kit предназначена для детекции количества копий LSI MDM2 гена, локализованного на хромосоме 12q15 методом флуоресцентной in situ гибридизации (FISH).

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Регион 12q13-q15 достаточно часто подвергается транслокации и амплификации при саркомах мягких тканей и хроническом лимфоцитарном лейкозе. MDM2 ингибирует транскрипционную активность p53 путем связывания p53 и передвижения белка внутрь цитоплазмы. Это приводит к инактивации опухолевого супрессора и формированию опухоли, которая в конечном итоге приводит к образованию рака.

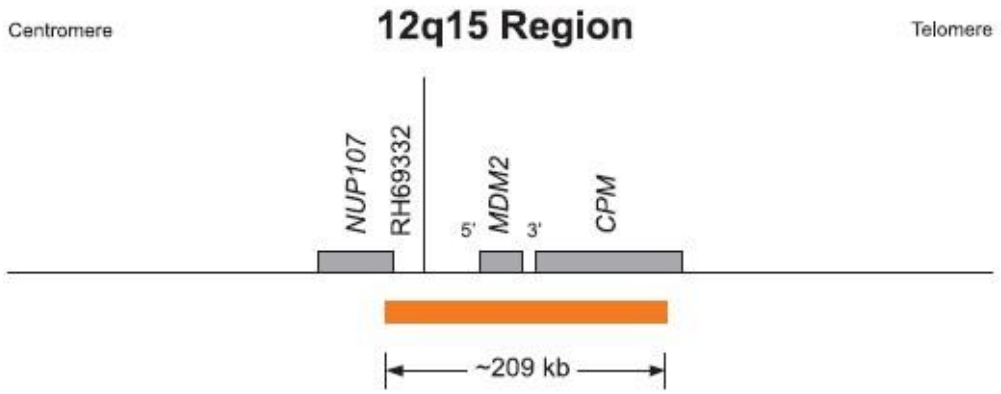
Vysis MDM2/CEP 12 Probe Kit включает в себя двойную пробу, предназначенную для детекции количества копий гена LSI MDM2, локализованного на хромосоме 12q15, с использованием технологии FISH.

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

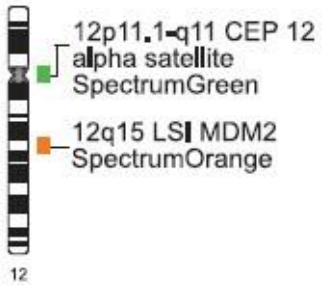
Размером приблизительно 209 kb **(**chr12:67,420,133-67,629,503; Март 2006) SpectrumOrange проба охватывает ген MDM2 в регионе 12q15.

SpectrumGreen CEP 12 проба гибридизуется с альфа-сателлитной последовательностью, расположенной в центромерной области 12 хромосомы (12p11.1-q11).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



LSI MDM2 SpectrumOrange Probe



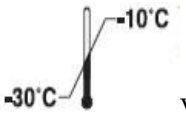
РЕАГЕНТЫ

1. **Vysis LSI MDM2 SpectrumOrange/CEP 12 SpectrumGreen проба (номер по каталогу 30-231098)**
(1 пробирка, 10 мкл на пробирку). 175 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА)

2. Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30-804824)
(1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC (pH 7,0).

Таблицы с Данными о Безопасности Материалов (MSDS) всех предоставленных реагентов можно получить в технической службе компании Abbott Molecular.

Хранение



Vysis MDM2/CEP 12 FISH Probe Kit необходимо хранить при температуре -20ºC (±10) , в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортировка зонда Vysis MDM2/CEP 12 FISH Probe Kit осуществляется на сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI MDM2 SpectrumOrange/CEP 12 SpectrumGreen Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.

Дезактивации и утилизации всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки:

- Формамид.

Применяются следующие предупреждения:



ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Меры предосторожности:

- Vysis MDM2/CEP12 FISH предназначен для использования только с образцами, которые обрабатываются и хранятся в соответствии с вкладышем.
- Не используйте Vysis MDM2/CEP12 FISH Probe Kit по истечению даты, указанной на комплекте или этикетке.
- При работе с пробами всегда следуйте инструкции. Отклонение от инструкции может привести к ложным результатам исследования.

Лабораторные меры предосторожности:

- Все биологические образцы должны рассматриваться как потенциально опасные инфекционные агенты. Поскольку зачастую невозможно знать, какой из агентов является потенциально опасным, все биологические образцы должны быть обработаны с соблюдением универсальных мер предосторожности.
- Следует избегать взаимодействия образцов с кислотами, сильными основаниями, или действию высоких температур. Такие условия могут привести к разрушению ДНК и к неправильным результатам FISH исследования.
- Несоблюдение всех процедур денатурации, гибридизации, детекции может привести к недопустимым или ошибочным результатам исследования.
- Флуорофоры легко распадаются под действием света. Для предотвращения этого распада, храните слайды и пробы в темноте, и обработка всех слайдов и наборов зондов должна осуществляться в защищенном от света месте. Выполните все шаги, которые не требуют света (периоды инкубации, отмывки и т.д.) в темноте или при минимальном освещении.
- Vysis FISH MDM2/CEP 12 FISH Probe Kit содержит формамид, тератоген. Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
- Калибровочные термометры предназначены для измерения температуры растворов, водяных бань и инкубаторов.
- Всегда проверяйте температуру промывочных растворов перед использованием, измеряя температуру растворов в сосудах Коплина с калибровочными термометрами.
- Все опасные материалы должны быть утилизированы в соответствии с правилами утилизации опасных веществ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

АНАЛИЗ
Необходимые материалы

• Vysis LSI MDM2 SpectrumOrange/CEP 12 SpectrumGreen Probes
• Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Необходимые, но не поставляемые материалы

Лабораторные реагенты:

- Иммерсионное масло для флуоресцентной микроскопии
- 100% этанол. Хранить при комнатной температуре
- Очищенная вода
- Клей
- 12 NHCl
- 1 N NaOH
- DAPI II Counterstain/Antifade (List No. 06J50-001)
- 20X SSC (List No. 02J10-032)
- NP-40 (List No. 07J05-001

Лабораторное оборудование:

- Чистые силанизированные или положительно заряженные предметные стекла
- Покровные стекла 22 мм x 22 мм
- Пипеттор (1–10 мкл) и стерильные наконечники
- Таймер
- Микроцентрифуга
- Градуированные цилиндры (от 100 мл до 1000 мл)
- Очищенная водяная баня (70°C to 80°C)
- Статичная водяная баня и водяная баня с циркуляцией (37ºC)
- Стойкий к воздействию растворителей маркер (по желанию)
- Пинцет
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Одноразовые наконечники (от 5 мл до 20 мл)
- Сосуды Коплина (12 × 50 мл рекомендуемый тип: вертикальный сосуд)
- Флуоресцентные микроскопы с рекомендуемыми фильтрами
- Калибровочные термометры
- Магнитная мешалка
- pH метр
- Вортекс
- Фильтры 0,45 μm
- Инкубатор 37 °C
- Слайды (45 до 50°C)
- ThermoBrite или эквивалент
- Карты влажности ThermoBrite

Микроскоп и дополнительные устройства

Микроскоп: для визуализации результатов гибридизации требуется флуоресцентный микроскоп с освещением объекта сверху. При наличии флуоресцентного микроскопа необходимо убедиться в том, что он сможет обеспечить оптимальную визуализацию микропрепаратов с флуоресцентной гибридизацией in situ. Обычные красители для ДНК, например, DAPI, пропидиум йодид и хинакрин могут не подойти для FISH.

Рекомендуется периодически приглашать представителя технического отдела фирмы-производителя микроскопа для очистки и проверки его работы, особенно для регулировки ртутной лампы. **Возбуждающий источник света:** в качестве возбуждающего источника рекомендуется использовать ртутную лампу 100 Вт. Фиксируйте количество часов работы лампы и замените ее до окончания срока службы. Убедитесь в том, что лампа выровнена.

Объективы: для микроскопа с ртутной лампой 100 Вт или лампой с длительным сроком эксплуатации 100 Вт используйте масляно-иммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥0,75. Для сканирования подходит объектив с 40-кратным увеличение и окуляры с 10-кратным увеличением. Для получения удовлетворительных результатов для визуализации FISH используйте масляно-иммерсионный ахроматический объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: иммерсионное масло, используемое совместно с иммерсионными объективами, должно подходить для низкого уровня аутофлуоресценции и должны быть предназначено специально для флуоресцентного микроскопа.

Фильтры: Гибридизация пробы SpectrumOrange к таргетному региону ДНК обозначается оранжевым сигналом флуоресценции. Гибридизация пробы SpectrumGreen к таргетному региону ДНК зеленым сигналом

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

обозначается флуоресценции. Присутствие всех других участков ДНК будет флуоресцировать голубым сигналом как результат окрашивания контркрасителем DAPI II.

Процедура анализа
Соблюдайте меры предосторожности, указанные в упаковке перед взятием образцов для работы.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ:
Приготовление растворов этанола (70%, 85%, и 100%).
Подготовить объем / объемы разведения 70% и 85% с использованием 100% этанола и очищенной воды. Хранить при комнатной температуре в плотно закрытом контейнере если не используете. Растворы могут быть использованы в течение 1 недели, если не происходит испарение или раствор не становится разбавленным или мутным из-за многократного использования.
20X SSC раствор
Смешайте 66 г 20X SSC и 200 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCI, если это необходимо. Доведите объем до 250 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

0.4X SSC/0.3% NP-40 Wash Solution
Смешайте 20 мл 20X SSC и 950 мл очищенной воды. Добавьте 3 мл NP-40 пока NP-40 полностью не растворится. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью 1 N NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды.
Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.
2X SSC/0.1% NP-40 Wash Solution
Смешайте 100 мл 20XSSC (pH 5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Забор образцов и их подготовка для проведения анализа
Лимфоциты необходимо культивировать, получить, фиксировать и поместить на предметные стекла, используя стандартные цитогенетические процедуры.

ПРИМЕЧАНИЕ: Перед началом **автоматической денатурации/гибридизации** процедуры до завершения шага 4 этого раздела, убедитесь, что материалы выдержали достаточно времени для разморозки.

1. Перенесите 20X SSC раствор в сосуды Коплина.
2. Перенесите 20X SSC из сосудов Коплина на водяную баню

приблизительно на 30 минут и перед использованием убедитесь, что раствор
достиг температуры 37±1°C.
3. Определите, что температура 20XSSC достигла 37±1°C с помощью откалиброванных термометров.
4. Погрузите образцы слайдов в 20X SSC на 30 мин. при температуре 37±1°C.
5. Используя пинцет, достаньте слайды из 20X SSC, немедленно погрузите слайды в сосуд Коплина, содержащий 70% этанол минимум на 2 минуты и встряхните слайды в сосуде Коплина от 1 до 3 секунд. После 70% этанола перенесите слайды в 85% этанол минимум на 2 минуты и затем в 100% этанол минимум на 2 минуты.
ПРИМЕЧАНИЕ Погрузите не более 4 слайдов одновременно в каждый сосуд Коплина.
6. После дегидратации в этаноле слайд может быть помещен в температуру 50°C на 2 минуты, чтобы полностью завершить сушку перед нанесением пробы.

АВТОМАТИЧЕСКАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ/ГИБРИДИЗАЦИЯ ПРОБЫ
1. Достаньте ДНК-пробы, LSI/WCP Hybridization Buffer и очищенную воду из упаковки и дождитесь, пока реагенты достигнут комнатной температуры.
2. Отвортексируйте ДНК-пробы, LSI/WCP Hybridization Buffer в течении 2-3 секунд.
3. Центрифугируйте в течении 2-3 секунд.
4. Перенесите 7 мкл LSI/WCP Hybridization Buffer, 2 мкл очищенной воды, 1 мкл ДНК-пробы в 1,5 мл эппендорфы.
5. Отвортексируйте и отцентрифугируйте смесь еще раз тщательно.
6. Используя автоматический дозатор, нанесите 10 мкл пробы и незамедлительно накройте покровным стеклом, избегая образования пузырей.
7. Заклейте покровное стекло, используя резиновый клей.
8. Перед добавлением образцов слайдов, вставьте карты влажности ThermoBrite в специальное углубление под крышкой системы ThermoBrite. Позвольте закладкам внутри крышки поддерживать карты. Обратитесь к руководству по эксплуатации ThermoBrite относительно повторных карт влажности при последующих запусках.
9. После того как карты влажности вставлены, насыщайте полоски дистилированной водой.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. Включите питание в системе ThermoBrite денатурации/гибридизации.

ПРИМЕЧАНИЕ

Включатель системы ThermoBrite расположен на задней панели. Прибор издаст звуковой сигнал, чтобы сообщить, что он включился. Главное меню будет отображаться, когда прибор наберет температуру 37°C.

11.Установите на ThermoBrite программу, согласно следующим параметрам:

- Время денатурации: 2 минуты
- Температура денатурации: 73°C
- Время гибридизации: 12 до 24 часов
- Температура гибридизации: 37°C

После установления программы поместите образцы слайдов на прогретую поверхность 7,0±0,2. Аккуратно протолкните образцы к середине пластины, состыковав край слайда с маркированной позицией на панели слайдов.

ВНИМАНИЕ: Если происходит ибридизация менее чем 12 слайдов, используйте пустые слайды, чтобы общее количество слайдов было равно 12.

12. Закройте крышку ThermoBrite. Курсором нужно выделить линию PGM. Нажмите кнопку Enter для подтверждения.

ПРОЦЕДУРА ПРОМЫВКИ

1. Перенесите 70 мл **0.4XSSC/0.3% NP-40** и 70 мл **2XSSC/0.1% NP-40** в отдельные сосуды Коплина. Перенесите сосуды Коплина, содержащие **0.4XSSC/0.3% NP-40** на водяную баню приблизительно на 30 минут перед использованием. Доведите **2XSSC/0.1% NP-40** до комнатной температуры. Используйте приготовленный раствор только в течении одного дня и дальше утилизируйте.

2. Убедитесь, что температура **2XSSC/0.1% NP-40** 73±1°C, используя откалиброванные термометры.

3. Достаньте образцы слайдов из ThermoBrite.

4. Удалите покровное стекло с одного слайда и сразу же погрузите слайд в **0.4XSSC/0.3% NP-40.** Перемешайте слайд в сосуде Коплина в течении 1-3 секунды. Повторите процесс с другими слайдами до достижения количества 4 слайдов. Начните отсчет времени, когда будет опущен в раствор 4 слайд.

ВНИМАНИЕ: Для поддержания нужной температуры в **0.4XSSC/0.3% NP-40** необходимо промывать 4 слайда одновременно. Если у вас менее 4 слайдов, добавьте пустые слайды, чтобы общее количество стало 4.

5. Удалите слайды после 2 минут±30 секунд.

6. Погрузите слайды в сосуды Коплина, содержащие **0.4XSSC/0.3%NP-40.** Перемешайте слайды в сосуде Коплина в течении 3-5 секунд.

7. Удалите слайды из **0.4XSSC/0.3% NP-40** где они были погружены от 5 до 60 секунд.

ВНИМАНИЕ: Для промывки дополнительных слайдов, убедитесь, что температура промывочного раствора 73±1°C.

ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

1. Высушите каждый слайд коснувшись нижнего края слайда на бумажном полотенце и вытрите нижнюю сторону слайда, ту сторону, которая не содержит образец, высушите на бумажном полотенце.

2. Высушите слайды в темноте на длинной стороне слайда для ускорения испарения и прекратите взаимодействие с **2X SSC/0.1% NP-40** максимум на 2 часа.

3. Достаньте конткраситель DAPI II из упаковки и дождитесь, пока реагент достигнет комнатной температуры.

4. Отвортексируйте DAPI II в течении 2-3 секунд.

5. Отцентрифугируйте конткраситель DAPI II 2-3 секунды.

6. Используя пипетку, добавьте 10 мкл контркрасителя DAPI II к каждому таргетному образцу на слайде и накройте покровным стеклом. Повторите процедуру для каждого слайда.

7. Подождите минимум 10 минут до начала работы на микроскопе.

Процедура архивации

Храните слайды после гибридизации при температуре -20°C избегая попадания света. В таких условиях слайды могут храниться вместе с осушителем в течении 3 недель после нанесения контркрасителя DAPI II без существенной потери интенсивности сигнала.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Исследование слайдов

Просмотр слайдов производится с учетом использования подходящего фильтра на флуоресцентном микроскопе. Следующие наборы оптических фильтров используются при визуализации флуорофоров при гибридизации.

Использование фильтров Vysis	**Одновременное возбуждение и эмиссия**
Одиночный зеленый	SpectrumGreen флуорохром
Одиночный оранжевый	SpectrumOrange флуорохром
Двойной оранжевый/зеленый	SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорохромы
Тройной–DAPI, Green, Orange	DAPI, SpectrumGreen, SpectrumOrange флуорохромы

Фильтры, оптически эквивалентные фильтрам Vysis, также могут использоваться. Например, Chroma® 82000, используется с фильтрами 82102 это эквивалент Vysis Orange/Green v2 фильтра.

Интерпретация результатов

Контроль качества

Оценка адекватности слайда

- Оценка адекватности слайда используется по следующим критериям. Если критерии не встречаются, образцы слайдов не должны оцениваться. Ядерная морфология: Границы ядер должны быть хорошо различимы и не повреждены.
- Общая информация: Фон, который возникает, должен быть темный или черный и относительно свободный от люминисцентных частиц и помутнения.
- Интенсивность сигнала пробы: Сигнал должен быть ярким, компактным, округлой или овальной формы, отличимым и легко оцениваемым.

Подсчет сигналов:

Используя необходимые фильтры, перечисленные выше, две технологии, каждая для подсчета ядер с сигналами паттернов на каждые сто ядер. Первый исследователь оценивает ядра на левой стороне гибридизационной мишени (которая определяется лучше), второй исследователь оценивает ядра на правой стороне гибридизационной мишени (которая определяется лучше). Обратитесь к таблице 1 для подсчета сигналов.

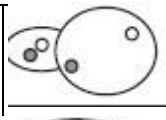
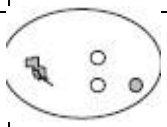
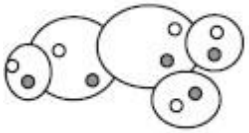
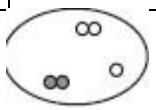
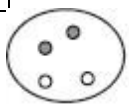
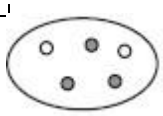
- Выберите только неповрежденные ядра, которые не свернуты, не перекрыты и не завалены омертвевшими клетками.
- Избегайте подсчета слайдов или площадей внутри слайдов, которые имеют чрезмерно неспецифическую гибридизацию или много ядер, которые имеют чрезмерно много или чрезмерно мало сигналов.
- Избегайте подсчета ядер со сгустками или облаками сигналов.
- Сигналы одинакового цвета могут не быть одной интенсивности в данном ядре. Таким образом, возникает необходимость использовать соответствующий одиночный фильтр и/или приспособить фокальную плоскость.
- Сигналы одного цвета, которые соприкасаются, независимо от размера, считаются одним сигналом.
- Если это небольшие нити сигналов, соединяющих разделенные сигналы, они также подсчитываются как один сигнал.
- Оранжевые или зеленые пары сигналов с наложением или с зазором менее чем один сигнал считаются как слитные.
- Если образец имеет низкий уровень абнормальных FISH паттернов, используется соответствующий фильтр пропускания для подтверждения паттернов, которые рекомендованы.
- Несоблюдение этих рекомендаций может привести к неточности при идентификации сигналов.
- Если есть какие-то сомнения относительно того, должны ли быть подсчитаны клетки или нет, не подсчитывайте клетки.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1 Подсчет двойных сигналов

Зеленый сигнал

Оранжевый сигнал

1.		Не подсчитывать. Ядра перекрываются и границы ядер не видимы.
2.		Считать как один оранжевый и один зеленый сигнал. Один оранжевый сигнал диффузный
3.		Не подсчитывать. Ядра находятся близко друг к другу и между ними нет четких границ.
4.		Считается как один оранжевый и один зеленый сигнал. Оранжевый сигнал слитный.
5.		Считать как один оранжевый и два зеленых сигнала. Один зеленый сигнал слитный и один оранжевый сигнал слитный
6.		Считать как два оранжевых и два зеленых сигнала
7.		Считать как три зеленых сигнала и два оранжевых

Ограничение в использовании

Интерпретация результатов FISH-исследования должна проходить с помощью соответствующих контрольных и аналитических методов, а также принимая во внимание другие клинические и диагностические исследования. Индивидуальные лаборатории должны установить аналитически нормальную отсечку для каждого интересующего абнормального сигнала паттернов.

Ограничение процедуры

- Vysis MDM2/CEP 12 FISH Probe Kit предназначена для использования в комбинации с дополнительными биомаркерами, морфологией и другой дополнительной информацией.
- Если образцы имеют низкий уровень абнормальных паттернов FISH, используйте соответствующий одиночный фильтр для подтверждения паттернов, как это рекомендовано. Несоблюдение рекомендаций может привести к неточной идентификации сигналов.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Chene P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(2):102-9.
2. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, et al. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol.*2003;121(2):287-95.
3. Fink SR, Paternoster SF, Smokey SA, et al. Fluorescent-labeled DNA probes applied to novel biological aspects of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2005;29(3):253-62.
4. Nelson BP, Gupta R, Dewald GW, Paternoster SF, Rosen ST, Peterson LC. Chronic lymphocytic leukemia FISH panel: impact on diagnosis. *Am J Clin Pathol.* 2007;128(2):323-32.
5. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2006;24(28):4634-41.
6. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002:12(6):996-1006.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. US Department of Labor Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens*.
8. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline-Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: CLSI; 2005.
10. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. Geneva, Switzerland: WHO; 2004.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for prevention of transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis B virus to health-care and public-safety workers. *MMWR.* 1989;38(S-6):1-37.
12. Sehulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, Melnick JL. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Environ Microbiol.* 1981;42(5):762–7.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline* - Third *Edition*. CLSI Document GP5-A3. Wayne, PA: CLSI; 2011.
14. US Environmental Protection Agency. *EPA Guide for Infectious Waste Management*. Publication No. EPA/530-SW-86-014. Washington, DC: US EPA; 1986:1-1-5-5, R1-R3, A1-A24.
15. Barch MJ, Knusten T, Spurbeck JL. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual.* 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers; 1997.
16. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med*. 2006;8(1):16-23.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Адрес Полномочного Представителя (AR) ABBOTT

Vysis MDM2/CEP 12 FISH Probe Kit защищена патентами 5, 491, 224. LSI, CEP, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange являются зарегистрированными товарными знаками группы компаний различной юрисдикции Abbott Group.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP
Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

CE

© 2011 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
July 2011
30-608268/R1

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis TRA/D Break Apart FISH Probe Kit

en

REF 05N41-020

30-608279/R2

Vysis TRA/D Break Apart
FISH Probe Kit
REF 05N41-020
30-608279/R2

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis TRA/D Break Apart FISH Probe Kit предназначен для обнаружения хромосомных перестроек с участием альфа-рецептора Т-клеток/дельта-локус на хромосоме 14q11.2 с использованием флуоресцентной гибридизации (FISH).

Краткое описание и разъяснения

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) встречается в 25% от всего детского рака и 15% ОЛЛ это Т-клеточная линия (Т-ОЛЛ).

Т-ОЛЛ и Т-клеточная лимфобластная лимфома (T-LBL) описываются в классификации Всемирной организации здравоохранения, как аналогичные структуры, которые различимы относительным процентом инфильтрацией костного мозга.

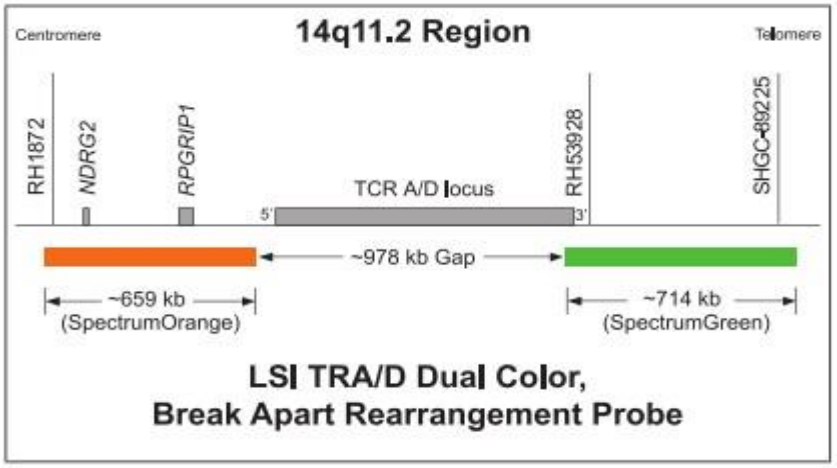
Vysis TRA/D Break Apart FISH Probe Kit используется в исследовании для обнаружения TCR alpha/delta перестроек у 22 случайно отобранных пациентов среди детей.

Описание зонда

SpectrumOrange проба размером около 659 Кб (chr14: 20433430-21092293, март 2006) центромерной области Т-клеточного рецептора альфа/дельта локуса**.**

SpectrumGreen проба размером около 714 Кб (chr14: 22069931-22784042; март 2006) теломерной области Т-клеточного рецептора альфа/дельта локуса.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru





Реагенты

1.Vysis LSI TRA/D Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Part No. 30-231070)

(1 флакон, 20 мкл на флакон). 550 нг/мкл, флуорофор-меченый ДНК-зонд и блокиратор ДНК в Трис-ЭДТА буфере.

2. Vysis LSI/WCP гибридизационный буфер (Part No. 30-804826)

(1 флакон, 150 мкл на флакон). Декстрансульфат, формамид, ССК (pH 7,0)

Инструкция по хранению



Vysis TRA/D Break Apart FISH Probe Kit должен хранится при температуре -20°C (±5°C), в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Vysis TRA/D Break Apart FISH Probe Kit транспортируется на сухом льду. Если вы получили реагенты, которые находятся в состоянии, не соответствующем рекомендациям на этикетке, или которые были повреждены, свяжитесь со службой технической поддержки Abbott Molecular.

Предупреждения и меры предосторожности

IVD **Для диагностического использования in vitro**

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство Дезактивация и утилизация всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

Применяются следующие предупреждения:



ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорт безопасности: Важная информация относительно безопасной обработки, транспортировки и утилизации данного продукта содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности материалов (MSDS) для всех реагентов, предоставляются по запросу у Отдела технической службы Abbott Molecular.

Подготовка реагентов

Примечание: Там, где указано, измерить pH растворов при температуре окружающей среды. Использовать pH-метр со стеклянным электродом, если не указано иное.

20X SSC раствор

Тщательно смешайте 132 г 20X SSC и 400 мл очищенной воды. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCl. Добавьте очищенную воду, чтобы довести до конечного объема 500 мл. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при температуре окружающей среды. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

2X SSC/0.1% NP-40 промывочный раствор

Тщательно смешайте 100 мл раствора 20XSSC (pH 5,3) с 850 мл очищенной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно перемешайте NP-40, пока он не будет полностью растворен. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Добавьте очищенной воды с доведением конечного объема до 1 л. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Хранить при температуре окружающей среды. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Денатурационный раствор (70% формамид / 2XSSC)

Тщательно смешайте 49 мл формамида, 7 мл раствора 20X SSC (pH 5,3), и 14 мл очищенной воды в стеклянной банке Коплин. С помощью индикатора pH полоски, проверьте, чтобы pH находился в интервале между 7,0 и 8,0. Между использованием, хранить в защищенном месте от 2 до 8 °C. Утилизируйте через 7 дней.

Спиртовые растворы (70%, 85%, 100%)

Готовят при разведении 100% этанола с очищенной водой. Между различными видами использования, хранить при температуре окружающей среды. Утилизируйте раствор через 6 месяцев.

2X SSC/0.3% NP-40 Wash Solution

Тщательно смешайте 100 мл раствора 20X SSC (pH 5,3) с 850 мл очищенной воды. Добавить 3 мл NP-40. Тщательно перемешайте NP-40, пока он не будет полностью растворен. Измерьте pH и доведите pH до 7,0 с до 7,5 с помощью NaOH. Добавьте очищенной воды с доведением конечного объема до 1 л. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Хранить при температуре окружающей среды. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Хранение LSI ДНК-зонд: LSI ДНК-зонд следует хранить при - 20°C (±5°C), в защищенном от света месте.

Разрушение: под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Забор образцов и подготовка к анализу

Из образцов тканей, фиксированных в формалине и залитых в парафин, необходимо получить срезы с использованием стандартной технологии. Подготовка залитых в парафин препаратов для FISH: препараты необходимо стандартными способами депарафинизировать и обработать так, чтобы проницаемость тканей и гибридизация были максимальными.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Методика

Необходимые материалы

• Vysis TRA/D Dual Color Break Rearrangement Probe
• Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

• 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
• 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
• Емкости Коплина стеклянные
• Калиброванный термометр
• Щипцы лабораторные
• Градуированный цилиндр (1000 мл)
• Магнитная мешалка
• Этанол
• Микроцентрифуга
• Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
• Микропипет-дозатор, от 1 до 10 мкл
• pH метр
• Чистые стекла для микроскопа
• Очищенная вода
• Таймер
• Вихревая мешалка
• Водяная баня (37єС и 72єС)
• Флуоресцентный микроскоп
• Термостат на 37 єС
• 20X SSC
• NP-40
• Формамид, очень высокой степени очистки
• Краситель DAPI II
• Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% этанола в одну из трех емкостей; 70 мл 85% этанола в другую емкость; 70 мл 70% этанола в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление. Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в этой инструкции. Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО ОБРАЗЦА

ПРИМЕЧАНИЕ: **Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1°C приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.**

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1°C. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% этанол на 1 минуту, затем–в 85% этанол на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% этанол.

ПРИМЕЧАНИЕ: стекла находятся в 100% этаноле до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.

Приготовление раствора зондов

1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):

7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: **Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.**

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1°C приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Гибридизация зонда и образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру–поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºС.

1. Извлеките стекла из 100% этанола.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50ºС для того, чтобы выпарить оставшийся этанол.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи герметика изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат

при 37ºС на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка стекол

Приготовление промывочных растворов:

Налейте 70 мл 2XSSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºС минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня, затем утилизируйте.

Налейте 70 мл 2XSSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня, затем утилизируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: **Для поддержания должной температуры 2XSSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества. Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.**

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 2X SSC/0,1% NP-40. Повторите операцию для остальных стекол, ждите от 2 до 5 минут, чтобы покровные стекла отделились от предметных.
2. Поместите стекла в 2XSSC/0,3% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол
3. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºС перед промывкой других 4 слайдов.

4. Погрузите стекла в 2XSSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Orange / Green	Green SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно ко-денатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации. Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий спектр показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области образца добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):

7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP

1 мкл зонда

2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи резинового клея создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite. При использовании системы ThermoBrite необходимо обеспечить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу этой инструкции, описывающему устранение неисправностей.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73°C и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73°C и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Hyb Temp на 37°C и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область образца и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

С образцами тканей пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.

Ожидаемые результаты

Ожидаемый нормальный сигнал Vysis TRA / D Break Apart FISH Probe Kit это два слитных сигнала. Нетипичный сигнал Vysis TRA/D Break Apart FISH Probe Kit один оранжевый, один зеленый и один слитный сигнал.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	Решение
Перекрестная Гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одни из следующих советов:
	Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2°C
	При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.
	Уменьшите температуру размораживания на 2°C.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: Увеличьте продолжительность гибридизации. Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. Промойте микропрепарат раствором 0.4XSSC/0,3% NP40 при температуре 70-73°C.
Диффузный сигнал (образование «спеклструктур»)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: Уменьшите температуру размораживания на 2°C. Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. Промойте раствором 0.4XSSC/0,3 % NP-40 при температуре 73-76°C.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: Уменьшите температуру размораживания на 2°C. Уменьшите продолжительность размораживания. ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2XSSC (196 мкл формамида/28 мкл 2XSSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Проблема	Вероятная причина	Решение
«Искаженная» морфология хромосомы»	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1°C; уменьшите температуру до 72°C. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45- 50°C) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4°C. Срок хранения–7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов –1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0–8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Сигнал слабый или отсутствует	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1°C. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74°C. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50°C) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
	Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
	Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера:1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
	Зонд денатурирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1°C.
	ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Сигнал слабый или отсутствует	Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100% этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1°C) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50°C). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
	Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
	Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
	Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20°C и беречь от света. Высушенные негибридизованные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20°C (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизованные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20°C в течение 3 недель.
Сигнал слабый или отсутствует	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флюорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. **ПРИМЕЧАНИЕ:** чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		выцветанию (список №06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: Концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20°C и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Библиография

1. Heim S, Mitelman F. Cancer Cytogenetics. 3rd ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2009.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, eds. WHO Classification of Tumours of Hemato-poietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008:265-6.
3. Smock KJ, Nelson M, Tripp SR, et al. Characterization of childhood precursor T- lymphoblastic lymphoma by immunophenotyping and fluorescent in situ hybridization: a report from the Children's Oncology Group. Pediatr Blood Cancer. 2008;51(4):489-94.
4. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. Genome Res. 2002:12(6):996-1006.
5. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. Genet Med. 2006;8(1):16-23.
6. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition. CLSI Document M29-A3 (ISBN 1-56238-567-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
9. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual, Geneva: World Health Organiza- tion, 2004.

Техническая поддержка

Для получения технической помощи Abbott Molecular звонить по телефону
+ 49-6122-580 или посетите веб-сайт Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold, ThermoBrite являются зарегистрированными товарными знаками группы компаний Abbott различной юрисдикции.
Все остальные товарные знаки являются собственностью соответствующих обладателей.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP
Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

CE

© 2010, 2012 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
October 2012
30-608279/R2

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit

en

REF 05J38

30-608368/R5

AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit
REF 05J38
30-608368/R5

Используемые символы

	Официальный производитель
	Номер списка
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Глобальный номер товара
	Количество достаточно для <n> тестов
	Температурный режим
	Биологический риск
	Отрицательный контроль
	Положительный контроль
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. инструкцию по применению
	Использовать до (срок годности)
	Авторизованный представитель в Европейском сообществе

Набор Aneuvysion многоцветный
(Vysis CEP 18/X/Y-альфа сателлит/LSI 13/21)
Номер партии 32-161075, каталожный номер 05J38-030;
Номер партии 33-161075, каталожный номер 05J38-010;
Номер партии 35-161075, каталожный номер 05J38-050

ФИРМЕННОЕ НАЗВАНИЕ ПРОБЫ
Многоцветная ДНК-проба AneuVysion (Vysis CEP 18, X, Y-альфа сателлит, LSI 13 и 21)

ОБЩЕЕ ИЛИ ОБЫЧНОЕ НАЗВАНИЕ
Реагенты для проведения флуоресцентной гибридизации in situ

НАЗАЧЕНИЕ ПРОБЫ
AneuVysion (Vysis CEP 18, X, Y-alha salellite, LSI 13 и 21) многоцветная проба предназначена для детекции альфа-сателлитных сиквенсов в центромерных регионах хромосомы 18, X и Y-хромосомы и LSI 13/21 пробы для детекции 13q14 региона, 21q22.13 и 21q22.2 регионов. Набор AneuVysion предназаначен для идентификации и увеличения числа хромосом: 13, 18, 21, X и Y методом FISH в метафазных клетках и интерфазных ядрах, выделенных из амниотической жидкости у беременных женщин с высокой степенью риска. Данная проба не предназначена для использования в качестве самостоятельного анализа при принятии клинических диагнозов. Результаты FISH предназначены для использования в качестве помощи в диагностике численных аномалий хромосом 13, 18, 21 X или Y в сочетании с другой информацией в настоящее время используются в пренатальной диагностике в соответствии с профессиональными стандартами на практике. Наборы для FISH диагностики предназначены только

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

для использования с амниотическими клетками; наборы не могут быть использованы и не могут быть валидированы с другими матрицами. Данная FISH диагностика не предназначена для детекции структурных хромосомных аномалий, что также может привести к врожденным дефектам. Данный FISH анализ проводится в лаборатории цитогенетики.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И РАЗЪЯСНЕНИЕ

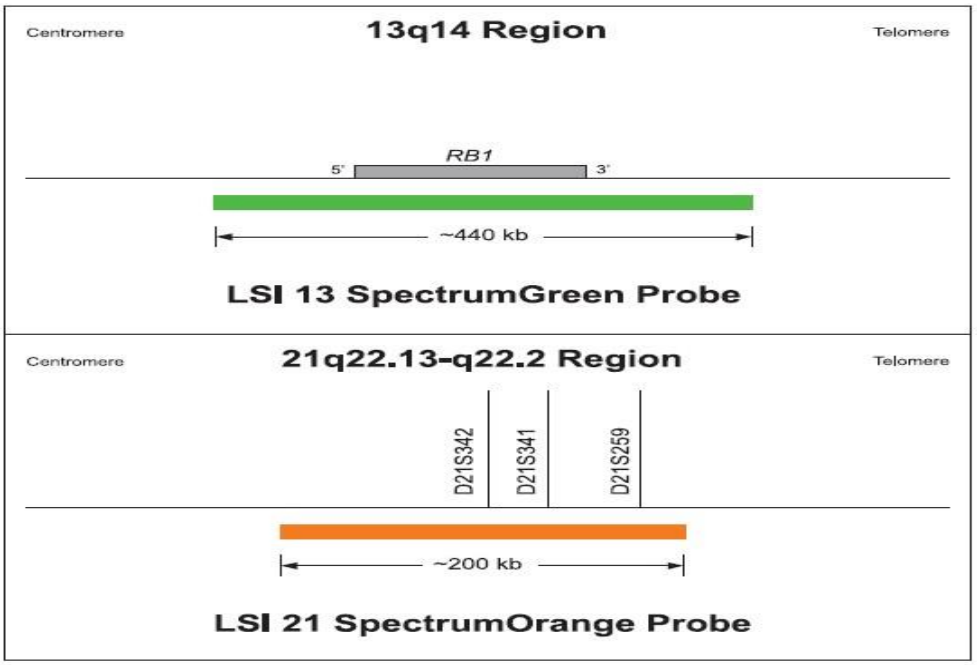
Женщинам с высоким риском развития хромосомных аномалий предлагается рутинный амниоцинтест с последующим цитогенетическим анализом фетальных клеток. Показаниями к пренатальной диагностике является возраст, повышенный риск трисомии для плода, выявляемый в материнской сыворотке путем скрининга, желание самой матери и плохие результаты ультразвукового исследования. В настоящее время хромосомные аномалии диагностируются стандартным хромосомным анализом (кариотип), метод для детекции анеуполидии 13, 18, 21 и Y – хромосомы и с высокой точностью выявляет видимые структурные аномалии. Метод FISH с использованием хромосом-специфических ДНК-зондов может использоваться для оценки численных аутомосомных аббераций в интерфазных клетках в прямых или в культивированных образцах препаратов амниотической жидкости. Поскольку обработка образца для интерфазного FISH-анализа не требует выделения и очистки ДНК и/или мечение ДНК-пробы радиоактивной меткой, результаты FISH обычно получают до начала стандартного хромосомного анализа. Результаты FISH могут быть представлены достаточно быстро, однако клиническое действие принятия решения на основе результатов FISH должны быть тщательно рассмотрены наряду с другими медицинскими доказательствами, используемыми в настоящее время в пренатальной диагностике.

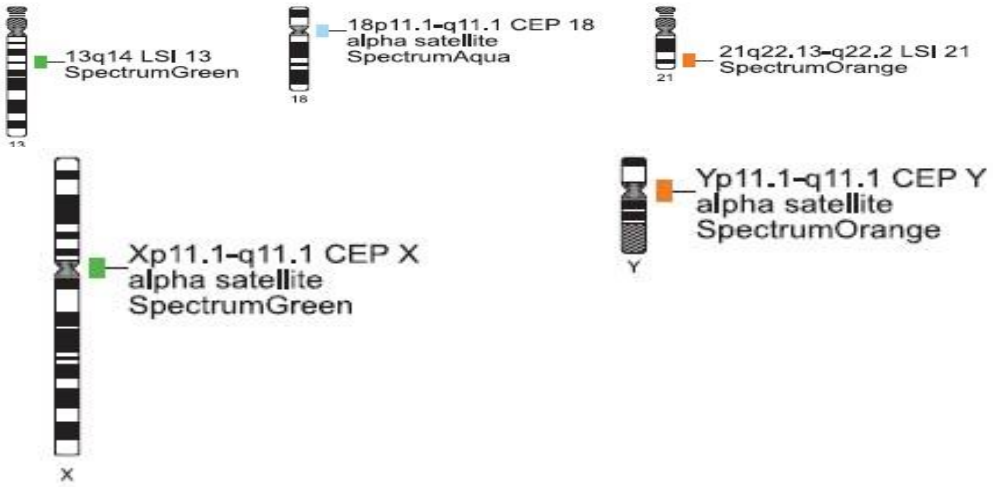
ПРИНЦИПЫ ПРОЦЕДУРЫ

In situ гибридизация представляет собой метод, который позволяет визуализировать специфические последовательности нуклеиновых кислот в клеточной популяции. В частности, ДНК FISH включает точный отжиг одноцепочечной меченой флуорохромом ДНК-пробы, комплементарной мишени последовательности. Гибридизованная проба с ДНК визуализируется под флуоресцентным микроскопом. Клетки из образцов амниотической жидкости наносятся на стеклянные слайды с использованием стандартных цитогенетических протоколов. Полученный образец ДНК денатурируют до одноцепочечной ДНК, что в последствии дает возможность гибридизации с CEP18/X/Y и LSI 13/21 пробой. После гибридизации не связавшаяся проба удаляется путем серии отмывок, а хромосомы и ядра прокрашиваются специфическим контркрасителем DAPI, вызывающим голубую флуоресценцию. Гибридизация CEP 18/X/Y и LSI 13/21 визуализируется с использованием флуоресцентного микроскопа, оснащенного соответствующими фильтрами возбуждения и эмиссии, позволяющими визуализировать интенсивность оранжевого, зеленого и голубого флуоресцентных сигналов и окрашенных в голубой цвет хромосом и ядер. Увеличение числа 13, 18, 21, X и Y хромосом проводится с помощью микроскопического исследования интерфазных ядер. Флуоресцентно окрашенные хромосомы ярко выделяются на фоне голубого свечения ядерной ДНК. FISH-методика позволяет визуализировать увеличенное число хромосом 13, 18, 21, X и Y внутри ядра.

CEP 18/X/Y проба представляет собой смесь прямо меченых ДНК-зондов, специфичных для D18Z1, DXZ1, и DYZ3 регионов хромосом 18, X и Y соответственно. Проба LSI 13/21 содержит смесь уникальных ДНК-сиквенсов, которые гибридизуются в 13q34 регионе хромосомы 13 и уникальные ДНК-сиквенсы, комплементарные D21S259, D21S341, и D21S342, содержащиеся в 21q22.13 и 21q22.2 области на длинном плече 21-й хромосомы. Проба LSI 13 была создана из набора перекрывающихся клонов, которые содержат весь ген RB1, а также областей, выходящих за пределы гена с обеих сторон. Проба выходит за пределы 180 Kb гена RB1 от 110 до 170 Kb в 5' направлении и приблизительно 120 Kb в 3' направлении, вся проба имеет размер от 410 до 470 Kb. CEP 18/X/Y это трехцветная проба, смесь голубого, оранжевого и зеленого флуорохромов и LSI 13/21 это смесь зеленого и оранжевого флуорохромов. Обе смеси зондов предварительно денатурируют в гибридизационном буфере для простоты использования.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru





РЕАГЕНТЫ И ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Поставляемые реагенты:

AneuVysion Kit - 10 Assay (Номер партии 33-161075, каталожный номер 05J38-010)

1) LSI 13/21 ДНК проба: Низкое число копий вектора E.coli Номер партии: 33-171076
Количество: 100 мкл/ на флакон (50 нг/мл)
Условия хранения: - 20°C (±5°C), в защищенном от света месте
Состав: Меченая флуорохромом проба LSI 13 SpectrumGreen и ДНК-проба LSI 21, меченая SpectrumOrange с блокирующей ДНК и гибридизационным буфером (сульфат декстрана, формамид и буфер SSC).
2) CEP 18/X/Y ДНК-проба: плазмида E. Coli
(проба предварительно денатурирована) Номер партии: 33-171075
Количество:100 мкл/ на флакон (25 нг/мл)
Условия хранения: -20°C (±5°C), в защищенном от света месте
Состав: SpectrumAqua меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК 18 проба, SpectrumGreen меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК X проба и SpectrumOrange меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК Y проба предварительно смешанная с флуорохромами SpectrumGreen, SpectrumOrange SpectrumAqua и немеченая блокирующая ДНК, а также гибридизационный буфер (декстрана сульфат, формамид, SSC).
3) Контркраситель DAPI II
Номер партии: 30-804861
Количество: 600 мкл на 1 флакон
Условия хранения: -20°C (±5°C), в защищенном от света месте
Состав: 125 нг/мкл DAPI (4,6 –диамидино –2-фенилиндол в фенилендиамине дигидрохлориде, глицерол и буфер.
4) NP-40
Номер партии: 30-804820
Количество: 4 мл/ 2 флакона Условия хранения: -20 до 25°C
Состав: неионный детергент
5) 20X SSC
Номер партии: 30-805850

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Количество: 66 г/ на 1 контейнер
Условия хранения: -20 до 25°С Состав: хлорид натрия цитрат натрия

AneuVysion набор - 30 исследований (Part No. 32-161075, list No. 05J38-030)
1) LSI 13/21 ДНК проба: Низкое количество копий вектора E.coli (проба преденатурирована) Номер партии: 30-171078
Количество: 300 мкл/ 1 флакон (50 нг/мкл)
Условия хранения: - 20°С (±5°С), в защищенном от света месте
Состав: Меченая флуорохромом проба LSI 13 SpectrumGreen и ДНК-проба LSI 21, меченая SpectrumOrange с блокирующей ДНК и гибридизационным буфером (сульфат декстрана, формамид и буфер SSC).
2) CEP 18/X/Y ДНК-проба: плазмида E. Coli (проба предварительно денатурирована) Номер партии: 30-171077
Количество: 300 мкл/ на флакон (25 нг/мл)
Условия хранения: - 20°С (±5°С), в защищенном от света месте
Состав: SpectrumAqua меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК 18 проба, SpectrumGreen меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК X проба и SpectrumOrange меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК Y проба предварительно смешанная с флуорохромами SpectrumGreen, SpectrumOrange и SpectrumAqua и немеченая блокирующая ДНК, а также гибридизационный буфер (декстрана сульфат, формамид, SSC).
3) Контркраситель DAPI II
Номер партии: 30-804861
Количество: 1200 мкл/ 2 флакона
Условия хранения: - 20°С (±5°С), в защищенном от света месте
Состав: 125 нг/мкл DAPI (4,6 – диамидино – 2-фенилиндол в фенилендиамине дигидрохлориде, глицерол и буфер.
4) NP-40
Номер партии: 30-804820
Количество: 4 мл/ 2 флакона Условия хранения: -20 до 25 °С Состав: неионный детергент
5) 20X SSC
Номер партии: 30-805850
Количество: 66 г/ на 1 контейнер Условия хранения: -20 до 25°С Состав: хлорид натрия цитрат натрия
AneuVysion Kit - 50 Assay (Part No. 35-161075, list No. 05J38-050)
1) LSI 13/21 ДНК проба: Низкое количество копий вектора E.coli
Номер партии: 35-171078
Количество: 500 мкл/ 1 флакон (500 нг/мкл)Условия хранения: -20°С (±5°С), в защищенном от света месте
Состав: Меченая флуорохромом проба LSI 13 SpectrumGreen и ДНК-проба LSI 21, меченая SpectrumOrange с блокирующей ДНК и гибридизационным буфером (сульфат декстрана, формамид и буфер SSC).
2) CEP 18/X/Y ДНК-проба: плазмида E. Coli
(проба предварительно денатурирована) Номер партии: 35-171077
Количество: 500 мкл/ на флакон (25 нг/мл)
Условия хранения: - 20°С (±5°С), в защищенном от света месте
Состав: SpectrumAqua меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК 18 проба, SpectrumGreen меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК X проба и SpectrumOrange меченая флуорохромом альфа саттелитная ДНК Y проба предварительно смешанная с флуорохромами SpectrumGreen, SpectrumOrange и SpectrumAqua и немеченая блокирующая ДНК, а также гибридизационный буфер (декстрана сульфат, формамид, SSC).
3) Контркраситель DAPI II
Номер партии: 30-804861
Количество: 1200 мкл/ 2 флакона
Условия хранения: -20°С (±5°С), в защищенном от света месте
Состав: 125 нг/мкл DAPI (4,6 –диамидино –2-фенилиндол в фенилендиамине дигидрохлориде, глицерол и буфер.
4) NP-40
Номер партии: 30-804820
Количество: 4 мл/2 флакона Условия хранения: -20 до 25°С Состав: неионный детергент
5) 20X SSC Номер партии: 30-805850
Количество: 66 г/ на 1 контейнер Условия хранения: -20 до 25°С Состав: хлорид натрия цитрат натрия

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА



Хранить неоткрытый набор AneuVysion при температуре -20 °C (±5°C) в защищенном от света и влажности месте. 20X SSC и NP-40 должны храниться отдельно при комнатной температуре. Дата окончания срока годности для каждого компонента указана отдельно на индивидуальной этикетке. Эти условия хранения применяются как для открытых для и не для открытых компонентов. Следует избегать воздействия света, тепла и влажности, что может повлиять на сроки годности хранения некоторых компонентов набора. Если компоненты хранятся в условиях, отличных от указанных на этикетках, это может негативно повлиять на результаты анализа.

Необходимые, но не поставляемые материалы

Примечание: Если условия хранения не перечислены внутри упаковки или на этикетке продукта, хранить реагенты необходимо в соответствии с рекомендациями поставщика.

Лабораторные реагенты

- ProbeChek Normal Male Amniocyte Control Slides, Part No. 30-805010, List No. 05J39-005. Фиксированные биологические образцы, полученные от нормальных человеческих амниоцитов, помещенные на слайды к микроскопу. Количество: 5 слайдов (10 целевых областей). Хранить контрольные слайды при температуре -20°C (±5°C) в герметичном контейнере с осушителем, чтобы защитить их от влажности.
- ProbeChek Пренатальные положительные контрольные слайды Part No. 30-805017, List No. 05J36-005. Фиксированные биологические образцы, выделенные из человеческих фибробластных клеток, помещенные на слайды к микроскопу. Количество: 5 слайдов (10 целевых областей). Хранить контрольные слайды при температуре - 20°C (±5°C) в герметичном контейнере с осушителем, чтобы защитить их от влажности.
- Формамид, высокоочищенный
- Этанол (100%). Хранить при комнатной температуре.
- Концентрированная (12N) соляная кислота (HCl)
- 1N гидроксид натрия (NaOH)
- Очищенная вода (дистиллированная или деонизированная). Хранить при комнатной температуре.
- Фиксатор (3:1 метанол: уксусная кислота). Готовится ежедневно.
- Осушитель
- 1X трипсин/ЭДТА (0,05% трипсин, 0,53 Мм ЭДТА–4Na в сбалансированном солевом растворе Хенкса без CaCl, $MgCl_2$
- 0,56% хлорид калия (KCL)
- Реагенты для оптимальной пробоподготовки клеток амниотической жидкости:
- Рабочий раствор пепсина (2,5 мг пепсина добавляют к 50 мл 0,01 N HCl)
- Постфиксационный раствор (1,3 мл 37% формальдегида, 0,23 $MgCl_2$ и 48,7 мл PBS)

Лабораторное оборудование

- Флуоресцентные микроскопы с рекомендуемыми фильтрами
- Фазово-контрастный световой микроскоп
- Предварительно очищенные предметные стекла
- Слайды (от 45 до 50°C)
- 22 мм× 22 мм покровные стекла
- Микродозаторы (от 1 до 10 мкл) с наконечниками
- Таймер
- Микроцентрифуги
- Градуированные цилиндры (от 100 мл до 1000 мл)
- Водяные бани (от 70 до 80°C)
- Водяные бани (37°C)
- Устойчивый маркер
- Ножницы
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Одноразовые пипетки (от 5 до 20 мл)
- Сосуды Коплина (12×50 мл). Рекомендуемый тип: Продукт Уинтон №900570 вертикальный сосуд для окрашивания.
- Калибровочные термометры
- Коробочка с крышкой из слайдов для микроскопа
- Магнитные мешалки
- pH метр и лакмусовая бумага
- Вортекс
- 0,45 мм фильтрационные единицы
- 37°C инкубатор
- Слайды (45 до 50°C)
- Штативы для пробирок
- Клей
- Фильтры с диаметром пор 0,45 мкм

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Микроскоп и дополнительные устройства

Микроскоп: для визуализации результатов гибридизации требуется флуоресцентный микроскоп с освещением объекта сверху. При наличии флуоресцентного микроскопа необходимо убедиться в том, что он сможет обеспечить оптимальную визуализацию микропрепаратов с флуоресцентной гибридизацией in situ. Обычные красители для ДНК, например, DAPI, пропидиум йодид и хинакрин могут не подойти для FISH.

Рекомендуется периодически приглашать представителя технического отдела фирмы- производителя микроскопа для очистки и проверки его работы, особенно для регулировки ртутной лампы.

Примечание: предположительная несостоятельность реагентов может свидетельствовать о нарушении работы или неправильном выборе флуоресцентного микроскопа или использовании неподходящего набора фильтров, в то время как гибридизация прошла успешно.

Возбуждающий источник света: в качестве возбуждающего источника рекомендуется использовать ртутную лампу 100 Вт. Фиксируйте количество часов работы лампы и замените ее до окончания срока службы. Убедитесь в том, что лампа выровнена.

Объективы: для микроскопа с ртутной лампой 100 Вт или лампой с длительным сроком эксплуатации 100 Вт используйте масляно-иммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥0,75. Для сканирования подходит объектив с 40-кратным увеличение и окуляры с 10-кратным увеличением. Для получения удовлетворительных результатов для визуализации FISH используйте масляно-иммерсионный ахроматический объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: иммерсионное масло, используемое совместно с иммерсионными объективами, должно подходить для низкого уровня аутофлуоресценции и должны быть предназначено специально для флуоресцентного микроскопа.

Фильтры: Одиночные или двойные фильтры к флуоресцентному микроскопу оптимизированы для использования с набором AneuVysion и доступны у Abbott Molecular для большинства моделей микроскопа. Рекомендуемые фильтры для набора AneuVysion это оранжевый, зеленый и голубой одиночные фильтры и тройные фильтры DAPI/Зеленый/Оранжевый. Конфигурация этих трех фильтров позволяет производить одновременное возбуждение и излучение флуорофоров SpectrumGreen, SpectrumOrange и DAPI. Сигналы SpecrumOrange будут оранжевого цвета, сигналы SpectrumGreen будут зеленовато-желтоватого цвета. Все другие молекулы ДНК будут флюоресцировать голубым цветом как результат окрашивания конткрасителем DAPI.

Приготовление рабочих растворов реагентов20X SSC (pH 5.3):

Смешайте:

66г	20X SSC
200 мл	очищенной воды
250	мл общий объем

Тщательно перемешайте. Измерьте pH при комнатной температуре с помощью pH метра. Доведите до pH 5.3 концентрированной HCl, если необходимо. Доведите общий объем до 250 мл. Профильтруйте через 0.45 мкм фильтр. Хранить в закрытом контейнере при комнатной температуре до 6 месяцев.

Раствор для денатурации

Смешайте вместе:

49 мл	Формамида
7 мл	20XSSC pH 5,3
14 мл	Очищенная вода
70 мл	Общий объем

Спиртовые растворы

Приготовьте разведения 70%, 85% и 100% растворов, используя 100% этанол и очищенную воду. Добавьте 70 мл каждого раствора в сосуды Коплина и храните при комнатной температуре. Неиспользуемые растворы хранить в закрытых контейнерах в течении 6 месяцев. Используемые для проведения анализы растворы могут быть использованы в течении недели, если не произошло испарение растворов или если растворы становятся чрезмерно разбавленными после многократного использования.

0.3% NP-40 в 0.4X SSC (Раствор для промывки после гибридизации):

Смешайте вместе:

950 мл	очищенной воды
20 мл	20X SSC pH 5.3
3 мл	NP-40
1000 мл	общий объем

Смешайте интенсивно. Доведите объем до 1000 мл очищенной водой. Тщательно перемешайте. Доведите pH до 7.0-7.5 1N NaOH, при необходимости, используя pH метр со стеклянным pH электродом. Профильтруйте через 0,45 мкм фильтр. Хранить неиспользованный раствор в закрытом контейнере при комнатной температуре в течение 6 месяцев. Утилизировать раствор, который был использован в исследовании в конце каждого дня.

0.1% NP-40 в 2X SSC (Раствор для промывки после гибридизации):

Смешайте:

100 мл	20XSSC pH 5.3
849 мл	очищенной воды
1 мл	NP-40

1000 мл общий объем

Интенсивно перемешать. Доведите объем до 1000 мл очищенной водой. Тщательно перемешайте. Доведите pH до 7.0-7.5 1N NaOH, при необходимости, используя pH метр со стеклянным pH электродом. Профильтруйте через 0,45

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

мкм фильтр. Добавьте 70 мл в сосуд Коплина и храните при комнатной температуре. Хранить неиспользованный раствор в закрытом контейнере при комнатной температуре до 6 месяцев. Утилизировать раствор, который был использован при количественном определении в конце каждого дня.
Примечание: для обработки образца и процедуры подготовки слайдов необходимы дополнительные реагенты. Обратитесь к конкретному разделу для получения деталей.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ:
ПРЕДНАЗНАЧЕНО ДЛЯ ДИАГНОСИКИ IN VITRO

1. Для диагностики in vitro.
2. Со всеми биологическими образцами следует обращаться как с потенциальными источниками инфекционных агентов. Контрольные препараты из этого набора изготовлены из клеточных линий человека, фиксированных в растворе метанола и уксусной кислоты (3:1). *Часто невозможно убедиться в инфекционной безопасности образца, поэтому со всеми образцами человека и контрольными препаратами следует обращаться, соблюдая универсальные меры предосторожности. Руководство по обращению с такими образцами можно получить в Центрах контроля и профилактики заболеваний США.*
3. Условия гибридизации могут изменяться при использовании других реагентов, кроме реагентов, поставляемых Vysis, Inc.
4. Несоблюдение всех процедур денатурации, гибридизации и детекции может привести к получению неприемлемых или неправильных результатов.
5. Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Это относится и ко всем этапам работы с гибридизованными препаратами. Проводите все манипуляции, не требующие света (инкубация, промывка и т.д.), в темноте.
6. Набор содержит формамид, являющийся тератогеном. Не допускайте его контакта с кожей и слизистыми.
7. Измерение температуры растворов, водяных бань и инкубаторов следует проводить градуированными термометрами, т.к. температура является критической при выполнении анализа.
8. Все опасные материалы следует утилизировать в соответствии с местными и государственными правилами.

Заявление о биобезопасности для компонентов набора

- **LSI 13/21 ДНК-проба**
- **CEP 18/X/Y ДНК-проба**



Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.
Дезактивации и утилизации всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

- **LSI 13/21 ДНК-проба и CEP 18/X/Y DNA**



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

NP-40



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Определяющие опасность компоненты маркировки:

H315	Может вызвать повреждения кожи
H319	Может вызвать повреждения глаз
P280	Надевайте защитные перчатки, защитную одежду, защиту для глаз
P264	После работы тщательно помойте руки.
P305+ P351+P338	При попадании в глаза: Промойте обильно водой в течении нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они есть и продолжайте промывать водой.
P302+P352	При попадании на кожу: обильно промыть водой
P337+P313	В случае попадания в глаза: Обратитесь за медицинской помощью
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

ПАСПОРТА БЕЗОПАСНОСТИ: Важная информация по безопасности, хранению, транспортировке и утилизации содержится в Паспортах Безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (MSDS) для всех реагентов, представленных в комплекте, доступны по запросу от Службы Технической поддержки Abbott Molecular

СБОР ОБРАЗЦОВ, ОБРАБОТКА И ХРАНЕНИЕ И ПОДГОТОВКА СЛАЙДОВ

Сбор образцов и их обработка

Набор AneuVysion разработан для использования как на культивируемых так и на некультивируемых амниоцитах. Сбор амниотической жидкости должен быть проведен в соответствии с руководством лаборатории. Руководство ACT содержит ряд рекомендаций по сбору и культивированию образцов. Образцы амниотической жидкости должны быть собраны таким образом, чтобы свести к минимуму риск контаминации материнскими клетоками. Для уменьшения контаминации ACOG рекомендует удалить первые один или два мл амниотической жидкости. Для сбора амниотической жидкости ACT рекомендует использовать шприц с герметиком, который не влияет неблагоприятно на рост клеток и специально маркированные контейнеры, одобренные для культивирования клеток. Рекомендуются также предварительно упакованные амниоцентезные лотки. Минимальный объем амниотической жидкости, рекомендованной для проведения FISH исследования от 2 до 5 мл в зависимости от гестационного возраста. Пользователи должны внимательно взвесить все за и против использования аликвот образца для выполнения FISH – исследования, когда объем образца не соответствует минимальным требованиям как для FISH-метода так и для цитогенетических методов. См. **таблицу 1.** Согласно руководству ACT время от сбора амниотической жидкости до культивирования должно быть максимально коротким, насколько это возможно (незамедлительно) и следует также соблюдать осторожность при воздействии высоких температур. Образцы не должны замораживаться и размораживаться.

Кровавые образцы могут помешать правильному культивированию стандартным цитогенетическим анализом. Следует также избегать воздействия на образцы кислот, сильных оснований и высоких температур. Такие условия как известно могут повредить ДНК и могут привести к неудачному проведению FISH-исследования. Образцы околоплодных вод, которые имеют кровавый или коричневый цвет, не должны использоваться, т.к. эти образцы могут содержать материнскую кровь.

Таблица 1. Рекомендуемые объемы амниотической жидкости для FISH-исследования и стандартного хромосомного анализа

	Объем (мл)		
Беременность (Недели)	**Общий объем (мл)**	**Зарезервировано для стандартного хромосомного анализа**	**Минимальный объем (мл) для FISH**
11 до 15	14	12	2
16	16	13	3
17	16	13	3
18	18	14	4
19	18	14	4
20 до 27	25+	15+	5+

Подготовка слайдов из некультивируемой амниотической жидкости

Используется следующий метод для подготовки слайдов из некультивируемых образцов амниотической жидкости.

1. Центрифугировать от 2 до 5 мл образцов цельной амниотической жидкости в течении 5 минут при 1000 об./мин. Образец не должен быть кровавого или коричневого цвета.
2. Ресуспензировать осадок в 2-5 мл 1X трипсина/ЭДТА (0,05% трипсин, 0.53 мМ ЭДТА в солевом растворе Хэнкса без $CaCl_2$, $MgCl_2*6H_2O$, и $MgSO_4*7H_2O$ и инкубировать при 37±1°C на водяной бане в течении по крайней мере 15 минут.
3. Центрифугировать суспензию в течении 5 мин. При 1000 об./мин.
4. Ресуспензировать осадок в 2-5 мл 0.56% KCl и инкубировать в течении 20 минут при 37±1°C на водяной бане.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Добавить от 0.8 до 2 мл фиксатора (3:1 метанол: ледяная уксусная кислота) и клетки/гипотонический раствор и аккуратно перемешайте на вортексе.
6. Отцентрифугируйте суспензию в течении 5 минут при 1000 об./мин. и ресуспензируйте осадок в 1 мл свежего фиксатора. Храните фиксированные образцы при 4°C по крайней мере в течении 30 минут или до выполнения FISH-исследования. При более длительном хранении, хранить фиксированные образцы при -20°C (±5°C) в фиксаторе.
7. Перед помещением клеток на слайды, отрегулируйте объем клеточной суспензии согласно размеру клеточного осадка. При необходимости, особенного после длительного хранения (>1 месяца), промойте осадок с фиксатором перед подготовкой слайдов.
8. Перед подготовкой слайдов для FISH, капните суспензию клеток прямо на 1 или 2 холодных стекляных предметных стекла, создавая тем самым 2 гибридизационных области (15 до 25 мл клеточной суспензии для каждой области).
9. Перейдите к предварительной обработке клеток некультивируемой амниотической жидкости. Если не были произведены оптимальные стандартные процедуры предварительной обработки, опустите слайды в 2X SSC от 30 мин. до 1 часа при 37°C или при комнатной температуре на 24 часа с открытой крышкой перед гибридизацией или хранением.

Предобработка для клеток некультивируемой амниотической жидкости (оптимально)

Следующий метод может быть использован для предварительной обработки образцов слайдов, подготовленных из образцов некультивируемой амниотической жидкости. Эта процедура рекомендуется для достижения оптимальных результатов FISH-исследования. Предварительная обработка особенно полезна для образцов позднего гестационного возраста и образцы сразу должны быть гибридизованы после приготовления слайдов.

1. Поместите слайды, подготовленные из некультивируемых амниоцитов, в 2X SSC на один час при температуре 37±1°C.
2. Поместите слайды к только что приготовленный рабочий раствор пепсина (к 2.5 мг пепсина добавляют 50 мл 0.01 N HCl) на 13 минут при 37±1°C.
3. Промыть слайд (ы) в фосфатно-солевом буфере (ПБС) при комнатной температуре в течении 5 минут.
4. Поместите слайды в раствор после фиксации (0.95% формальдегид: 1.3 мл 37% формальдегида, 0.23 г $MgCl_2$ и 48.7 мл ПБС. Хранить при температуре 4°C. Использовать в течении месяца) на 5 минут при комнатной температуре.
5. Промыть слайды в ПБС при комнатной температуре в течении 5 минут.
6. Высушить слайды. Для ускорения высыхания, используйте Пастеровскую пипетку, направив поток сжатого воздуха на слайд.
7. Погрузите слайды в 70% этанол при комнатной температуре. Необходимо, чтобы слайды постояли в промывочном растворе этанола 70% в течении одной минуты.
8. Удалите слайды из 70% этанола. Повторите шаг 7 с 85% этанолом, и затем с 100% этанолом.
9. Денатурируйте слайды в соответствии с инструкцией внутри упаковки.

Подготовка слайдов для фиксированного клеточного осадка из культивируемых образцов.

Для подготовки слайдов из культивируемых образцов может быть использован следующий метод.

1. Поместите водяную баню и полоски влажности в специальную камеру, расположенную на передней панели. Накройте переднюю часть устройства полиэтиленовой пленкой, но не полностью, чтобы обеспечить доступ к внутренним районам. Если показания комнатного гигрометра ниже 45%, используйте увлажнители воздуха.
2. Прогрейте водяную баню до 67±2°C. Поместите штативы для пробирок в центр водяной бани, чтобы они не касались стенок бани. Поддерживайте уровень воды в верхней части штатива для пробирок на протяжении всей процедуры, не допуская попадания воды на низ слайдов.
3. Приготовьте клеточный осадок с фиксатором, чтобы суспензия была слегка замутненной.
4. Очистите предметное стекло микроскопа, намочив обе стороны слайда 70% этанолом (выдавите из бутылки). Протрите слайд насухо, с использованием лабораторных салфеток и проведя по всей длине слайда до маркированного конца. Используйте карандаш, чтобы нанести отметку на слайд.
5. Поместите слайд в сосуд Коплина, содержащий фиксатор. Наклоните слайд таким образом, чтобы покрыть фиксатором поверхность слайда.
6. Незамедлительно поместите слайд над водяной баней. Удерживая пипетку Пастера над слайдом на уровне 2-4 дюймов, нанесите 3-4 капли суспензии клеток по всей длине слайда.
7. Поместите слайд образцом вверх на подставке для пробирок на водяной бане. Дайте слайду высохнуть в течении 10 минут.
8. Переместите слайд с подставки для пробирок и просмотрите под фазово-контрастным микроскопом. Изучите количество ядер на поле под низким увеличением (10X объектив). Для оптимального анализа необходимо приблизительно 100 клеток на поле. Скорректируйте клеточную суспензию путем добавления свежего фиксатора для достижения рекомендуемого количества интерфазных ядер.
9. Аккуратно обрисуйте область, содержащую интерфазные ядра на задней части слайда алмазным наконечником. Покровное стекло (22×22 мм) должно использоваться для формирования зоны гибридизации, обозначенная область должна быть в пределах области покровного стекла.
10. Погрузите образцы слайдов в 2X SSC на 30 минут или на час при 37±1°C или при комнатной температуре на 24 часа в закрытую коробку со слайдами до процесса гибридизации или перед хранением.

Хранение слайдов

Поместите подготовленные слайды в закрытую коробку для слайдов. Запечатайте слайд-боксы в пластиковый пакет, содержащий приблизительно одну столовую ложку Драйерита. Храните при температуре -20°C (±5°C) до гибридизации. Хранение образцов амниоцитов на подготовленных слайдах для FISH-анализа достаточно длительно не рекомендуется. Длительное хранение подготовленных слайдов может привести к плохому качеству сигнала. Когда

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

амниоциты хранятся в соответствии с рекомендациями, FISH-анализ на свежеприготовленных слайдах неизменно приводит к лучшему качеству сигнала. В рутинном применении FISH-исследование обычно проводится сразу же после подготовки слайдов.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА: КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

Денатурация ДНК в образце

1. Заранее подогрейте до 37°C увлажненную камеру для гибридизации (воздухонепроницаемый контейнер с кусочком влажной промокательной бумаги или бумажного полотенца размером примерно 1x3 дюйма, прикрепленным к стенке контейнера), поместив ее перед подготовкой препаратов в инкубатор с температурой 37°±2°C.
2. Налейте раствор для денатурации в емкость Коплина и поместите на водяную баню с температурой 73±1°C по крайней мере на 30 минут. Проверьте температуру раствора перед использованием.
3. Перед каждым использованием раствора для денатурации убедитесь, что его pH составляет 7,0-8,0. Проведите денатурацию ДНК в образце, погрузив подготовленные стекла в раствор для денатурации с температурой 73±1°C на 5 минут. Не проводите денатурацию более 4 препаратов в одной емкости Коплина одновременно.
4. С помощью пинцета извлеките стекла из раствора для денатурации и сразу погрузите их в промывочный раствор 70%-ного этанола комнатной температуры. Поболтайте стекло для удаления формамида. Оставьте стекла в этаноле на 1 минуту.
5. Извлеките стекла из 70%-го этанола. Повторите этап 4 с 85%-ным этанолом, а затем - 100%-ным этанолом.
6. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла лабораторной салфеткой.
7. Просушите стекла на нагревателе для стекол в течение не более 2 минут при 45-50°C, пока вы не будете готовы добавить раствор зондов.

Примечание: Если в процессе проведения гибридизации на подготовку зондов может понадобиться более двух минут, стекло необходимо оставить в емкости со 100% спиртом. Не давайте стеклу высохнуть на воздухе перед его помещением в нагреватель для стекол.

Подготовка зондов

1. Дайте раствору зондов прогреться до комнатной температуры, пока его вязкость не уменьшится достаточно для точного пипетирования.
2. Перемешайте на вортексе. Отцентрифугируйте каждую пробирку в течение 1-3 секунд с помощью настольной микроцентрифуги, чтобы содержимое пробирки стекло на дно пробирки. Снова аккуратно перемешайте на вортексе.

Гибридизация

1. Нанесите зонд на стекло. Сразу накройте эту область покровным стеклом размером 22 x 22 мм и дайте смеси равномерно распределиться под покровным стеклом. Пузырьки воздуха мешают гибридизации, поэтому не допускайте их образования.

Примечание: Не добавляйте раствор зондов на область-мишень, пока не подготовлены покровные стекла.

2. Закрепите покровное стекло резиновым герметиком следующим образом. Наберите герметик в шприц на 5 мл. Выдавите его небольшое количество по краям покровного стекла, захватывая и покровное, и предметное стекла, формируя таким образом изолирующий слой вокруг покровного стекла.
3. Поместите стекла в предварительно нагретую увлажненную камеру для гибридизации. Плотно закройте камеру крышкой и инкубируйте при 37°C в течение 6-24 часов.

Промывка после гибридизации

1. Налейте буфер для промывки после гибридизации (2X SSC/0,3% NP-40) в емкость Коплина. Подогрейте буфер, поместив емкость Коплина на водяную баню с температурой 73±1°C по крайней мере на 30 минут, или пока раствор не нагреется до 73±1°C. *Примечание: Промывочный раствор следует нагревать до 73±1°C перед промывкой каждой партии.*
2. Налейте буфер для промывки (2X SSC/0,1% NP-40) во вторую емкость Коплина и оставьте при комнатной температуре. Оба промывочных раствора можно использовать в течение 1 суток.
3. Удалите герметик с первого стекла, аккуратно потянув его пинцетом. Снимите покровное стекло с области-мишени, и немедленно перенесите стекло в емкость Коплина, содержащую 0,4X SSC/0,3% NP-40 при температуре 73±1°C. Поболтайте стекло в буфере в течение 3 секунд. Повторить операцию для остальных стекол и инкубировать 2 мин. Не помещайте более чем 4 слайда в раствор одновременно. Если промывается более чем 4 слайда одновременно, убедитесь, что температура промывочного раствора 73±1°C перед каждым использованием.

Примечание: Не снимайте покровные стекла с нескольких предметных стекол перед их помещением в промывочную баню. Начните 2-минутный отсчет инкубации, когда последнее стекло будет добавлено в промывочную баню.

4. Извлеките каждое стекло из промывочной бани и поместите их в емкость, содержащую 2X SSC/0,1% NP-40, при комнатной температуре на 5-60 сек, встряхивая их в течение 1-3 сек после помещения в баню.
5. Высушите стекла на воздухе в темноте в вертикальном положении. (Подойдет закрытый ящик или полка внутри закрытого шкафа.)
6. Нанесите 10 мкл красителя DAPI II на отмеченную область стекла и накройте покровным стеклом. До проведения подсчета храните препараты в темном месте.

Хранение препаратов

Гибридизованные препараты (с покровными стеклами) храните при -20°C (±5°C) в темном месте. При этих условиях стекла могут храниться до 12 месяцев без существенной потери интенсивности флуоресцентного сигнала. При

длительном хранении покровные стекла можно заклеить герметиком для предотвращения испарения, и предметные стекла храните при -20°C (±5°C).

Подсчет сигналов

Оценка приемлемости препарата

Приемлемость препарата оценивается по следующим критериям:

- Интенсивность сигнала зонда: сигнал должен быть ярким, четким и легко оцениваемым. Сигналы должны быть в форме либо яркого овала с четкими границами, либо вытянутого овала с расплывчатыми границами.
- Фон: фон должен быть темным или черным и относительно свободным от флуоресцирующих частиц или помутнений.
- Специфичность объектной области в отношении перекрестной гибридизации: Зонд должен гибридизоваться и окрашивать только таргетную область хромосомы. Метафазные пластинки следует исследовать для идентификации любой перекрестной гибридизации необъектных последовательностей. По крайней мере, 98% клеток дают один или более сигналов для приемлемой гибридизации (см. правила по подсчету сигналов, описанные ниже). Если любой из выше перечисленных признаков не удовлетворяет критериям приемлемости, обратитесь к разделу по устранению возможных проблем (Таблица 2) и приготовьте новый препарат.

Выбор оптимального для анализа участка и ядер, подлежащих оценке

Для просмотра гибридизованной области и определения подходящего участка используйте объектив 25X. Выбирайте области, в которых образец распределен равномерно, лишь несколько интерфазных ядер или метафазных пластинок могут перекрываться, и несколько интерфазных ядер или метафазных пластинок могут быть просканированы в поле зрения. Не анализируйте ядра с нечеткими границами. Пропускайте ядра с сомнительными сигналами, требующими субъективного решения. Пропускайте сигналы слабой интенсивности и неспецифичные, а также при фоновых помехах. Пропускайте ядра, недостаточно окрашенные для определения их границ. Подсчитывайте только клетки с дискретными сигналами.

Подсчет сканирования

Используя объективы 40X или 63X начните анализ в верхнем левом квадранте выбранной области, сканируя слева направо, подсчитывая количество сигналов в каждой видимой метафазной области или внутри ядерной границы каждой оцениваемой интерфазной клетки. Площади на стекле с высокой плотностью клеток должны быть пропущены случайным образом для того, чтобы отсканировать цельные таргетные области. Продолжайте сканировать до тех пор, пока не насчитаете 50 ядер и не проанализируете таргетные области. Если ожидается мозаицизм (от 10 до 60% анеуплоидных клеток), 200 ядер на таргетную область должно быть перечислено. Таргетные области с менее чем 50 видимыми ядрами должны быть дополнены дополнительными слайдами или представляться как неинформативные случаи.

Подсчет интерфазных сигналов

Подсчитайте число флуоресцентных сигналов в каждом доступном интерфазном ядре с помощью объектива 40X или 63X. Следуйте инструкциям по подсчету сигналов в **Таблице 1** или **2**. Объективы с большим увеличением (например 63X или 100X) следует использовать для верификации или решения вопросов о слитном или диффузном сигнале.

- Два сигнала примерно одинакового размера, находящиеся друг от друга на близком расстоянии, но не имеющих видимого соединения, считаются как два сигнала.
- Считайте размытый сигнал как один сигнал, если сигнал непрерывный и в приемлемых границах.
- Два малых сигнала, имеющих видимое соединение, считаются как один сигнал.
- Для CEP 18, LSI 13 и LSI 21 посчитайте число ядер с 0, 1, 2, 3, 4 или> 4. Посчитайте только ядра с 1 или более FISH-сигналом. Если точность подсчета вызывает сомнения, повторите подсчет в другой области слайда.
- Для CEP X/Y, посчитайте количество ядер с 0,1,2,3,4 и более>4 сигналов (для оранжевого и зеленого сигналов) и запишите количество в двусторонней таблице, и затем подсчитайте процент ядер с X, Y, XY, XX, XXY, XYY, XXX. Подсчитайте только те ядра с одним и более FISH-сигналом другого цвета. Если точность подсчета вызывает сомнения, повторите подсчет в другой области слайда.
- Не подсчитывайте ядра с нечетким сигналом.

Таблица 2 Устранение неполадок

Проблема	Возможные случаи	Пути решения
Сигнал слабый или отсутствует	• Неправильно подобраны фильтры для анализа слайдов	• Используйте правильные фильтры
	• Микроскоп неправильно работает	• Свяжитесь с техническим представителем фирмы-производителя микроскопа
	• Использованы несоответствующие лампы (ксеноновые или вольфрамовые)	• Используйте ртутные лампы (желательно на 100 Вт)
	• Старая ртутная лампа	• Замените новую лампу
	• Ртутная лампа смещена	• Откорректируйте лампу
	• Коллекторные линзы загрязнились или треснули	• Промойте или замените линзы
	• Зеркало в корпусе для лампы загрязнилось или разбито	• Промойте или замените зеркало
	• Ненадлежащие объективы	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Не соблюдены условия гибридизации • Неправильные условия промывки • Под покровное стекло попали пузырьки воздуха, которые затрудняют доступ для зондов • Зонды хранились неправильно	• Используйте рекомендуемые объективы • Проверьте температуру водяной бани 73±1°C • Проверьте температуру 37±2°C инкубатора • Проверьте температуру водяной бани 73±1°C • Проверьте состав водяной бани (pH, и т.д.) • Покровное стекло должно наноситься сначала путем прикосновения к поверхности гибридизационной смеси • Хранить зонды при температуре -20°C (±5°C) в темноте
Низкая специфичность сигнала	• Не соблюдены условия гибридизации • Температура промывочного раствора низкая	• Проверьте температуру 37±2°C инкубатора • Установите температуру промывочного раствора на 73±1°C
Фоновые помехи на стеклах	• Препараты содержат слишком много цитоплазмы • В клеточных препаратах находится клеточный дебрис • ДНК в образцах недостаточно чистая • Использование широкополосного фильтра, пропускающего много света	• Увеличить время денатурации слайдов до 10 мин. • Промойте клеточный препарат 5 раз свежим фиксатором и повторите процедуру нанесения • Замените промывочный раствор после гибридизации 0.4X SCC промывочным раствором на основе формамида следующим образом: 1. промыть стекла 3 раза в течение 10 мин каждое в растворе 50% формамида/2X SSC, pH 7.5-8.0 при 46±1°C 2. промыть стекла 1X раз в течение 10 минут в 2X SSC при 46±1°C 3. промыть стекла 1X раз в течение 5 минут в 2X SSC/0.1% NP-40 при 46±1°C • Замените на фильтр с более узкой полосой пропускания или фильтр с несколькими полосами пропускания
	• Неправильные условия промывки или неправильно подготовленные растворы	• Проверьте температуру водяной бани, pH, и/или растворов
	• Слайды недостаточно чистые перед нанесением клеток на них	• Погрузите слайды в этанол и протрите лабораторной салфеткой перед нанесением клеток
Разрушенная морфология хромосом (культивируемые образцы)	• Слайды были высушены достаточно быстро во время подготовки образцов	• Увеличьте относительную влажность во время подготовки образцов слайдов
	• Слайды достаточно свежие до денатурации	• Увеличьте время высушивания образца • Выдержите слайды по крайней мере 24 часа при комнатной температуре до денатурации
	• Слайды недостаточно хорошо высушены для денатурации	• Высушите слайды при температуре 45°C в течении 10 или 15 минут до проведения денатурации
	• Достаточно высокая температура в денатурационной бане	• Проверьте температуру водяной бани
Чрезмерно яркий сигнал	• Концентрация зонда достаточно высокая для вашего микроскопа	• Попытайтесь блокировать некоторые сигналы путем помещения фильтра с нейтральной плотностью на пути возбуждающего луча

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 3. Распределение сигналов для CEP 18, X, и Y (альфа) и LSI 13 и 21 с использованием нормальных мужских слайдов для контроля амниоцитов

	% 0 сигналы	**% 1 сигналы**	**% 2 сигналы**	**% 3 сигналы**	**% 4 сигналы**	**% >4 сигналы**	
CEP 18	0.0-2.0	0.0-2.1	93.0-100	0.0-2.1	0.0-4.0	0.0-1.0	
LSI 13	0.0-2.0	0.0-2.1	93.0-100	0.0-2.1	0.0-5.0	0.0-1.0	
LSI 21	0.0-2.0	0.0-2.1	93.0-100	0.0-2.1	0.0-5.0	0.0-1.0	
	% X	**%Y**	**%XX**	**%XY**	**%XXX**	**%XXY**	**%XXY**
CEP X/Y	0.0-2.0	0.0-2.0	0.0-2.0	93.0-100	0.0-2.0	0.0-2.0	0.0-2.0

Таблица 4. Распределение сигналов для CEP 18, X, и Y (альфа) и LSI 13 и 21 с использованием ProbeChek положительных контрольных слайдов для пренатальной диагностики

	% 0 сигналы	**% 1 сигналы**	**% 2 сигналы**	**% 3 сигналы**	**% 4 сигналы**	**% >4 сигналы**
CEP 18	0.0-1.0	0.0-2.0	0.0-10.0	86.0-100.0	0.0-2.0	0.0-1.0
CEP X	0.0-1.0	0.0-1.0	80.0-100.0	0.0-14.0	0.0-5.0	0.0-1.0
CEP Y	0.0-2.0	96.0-100.0	0.0-3.0	0.0-1.0	0.0-1.0	0.0-1.0
LSI 13	0.0-1.0	0.0-1.0	0.0-5.0	94.0-100.0	0.0-1.0	0.0-1.0
LSI 21	0.0-1.0	0.0-1.0	0.0-2.0	95.0-100.0	0.0-2.0	0.0-1.0

Рисунок 1. Руководство по подсчету одноцветных сигналов (LSI 21 СпектрумОранж: используйте оранжевый одиночный фильтр для подсчета, LSI 13 СпектрумГрин: используйте зеленый одиночный фильтр для подсчета и CEP 18 СпектрумАква: используйте голубой одиночный фильтр для подсчета сигналов

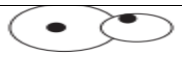
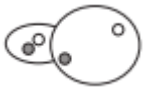
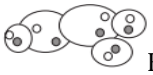
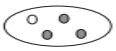
1		Не подсчитывайте, пропустите. Это может быть 2 клетки с одним сигналом в каждой или одно скрученное ядро
2		Подсчитывайте как два сигнала: один сигнал достаточно компактный и один диффузный
3		Не подсчитывайте, пропустите. Пользователь не может определить, какая клетка содержит сигнал
4		Считать как два сигнала, один сигнал слитный
5		Считать как три сигнала
6		Считать как 4 сигнала
7		Считать как три сигнала. Один сигнал слитный

Рисунок 2. Руководство по подсчету двухцветных сигналов (CEP X СпектрумГрин/CEP Y СпектрумОранж: используйте DAPI/Оранж/Грин фильтр для подсчета сигналов и используйте специфический одиночный для подтверждения.

1		Не подсчитывать. Ядра перекрываются и все области обеих ядер не видны.
2		Считать как один оранжевый и один зеленый сигнал. Оранжевый сигнал диффузный.
3		Не подсчитывать. Ядра находятся слишком близко друг к другу, невозможно определить границы клеток.
4		Считать как один оранжевый и один зеленый сигнал. Оранжевый сигнал слитный.
5		Считать как один оранжевый и два зеленых сигнала. Один зеленый сигнал слитный и оранжевый сигнал слитный.
6		

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	 Считать как два оранжевых и один зеленый сигнал.
7	 Считать как три оранжевых и один зеленый сигналы.
8	 Считать как 4 оранжевых сигнала.

Контроль качества

Использование контрольных слайдов - положительный контроль (клеточная линия фибробластов человека) и слайды с отрицательным контролем (нормальные мужские амниоциты человека) должны быть запущены одновременно со слайдами пациентов для мониторинга эффективности анализа и оценки точности подсчета сигналов. Контрольные слайды должны ставится каждый день при проведении FISH исследования и с каждой новой партией лота. Рекомендуются ProbeChek контрольные слайды. Адекватность слайдов и нумерация сигналов должны оцениваться с использованием критериев, описанных выше в разделе подсчет сигналов. Выполнять подсчет сигналов на 50 до 200 ядер. Для CEP 18, LSI 13 и LSI 21, перечисляется количество ядер с 0, 1, 2, 3, 4 или> 4 сигналами. Подсчитывать только те ядра с 1 или более сигналами FISH любого цвета. Для CEP X/Y, перечислите количество ядер с 0, 1, 2, 3, 4 или> 4 сигналами (для обоих как оранжевых, так и зеленых сигналов) и запишите значения в двухстороннюю таблицу, а затем рассчитать процент ядер с X, Y, XY, XX, XXY, XYY, XXX и другие. Снова посчитайте только те ядра с одним или несколькими FISH сигналами любого цвета. Запишите количество ядер с 1, 2, 3, 4 и > 4 сигналами для зонда ДНК CEP или LSI, а затем рассчитать процент ядер с 3 сигналами среди всех клеток с по меньшей мере 1 гибридизованным сигналом. Критерии для соответствия слайдов должны быть убедительны и результаты подсчета сигналов должны быть внутри спецификации, описанной в Таблице 3 и 4 для определения приемлемости выполнения теста.

Если контрольные слайды не соответствуют критериям приемлимости слайдов, анализ не может быть выполнен должным образом или компонент(ы) набора AneuVysion возможно, выполнены неадекватно. Повторите анализ с новыми контрольными слайдами и при необходимости со слайдами образцов пациента. Обратитесь к **Руководству по устранению неисправностей и к Таблице 2** для поиска возможных причин и действий, необходимых для устранения проблем.

Если контрольные слайды соответствуют критериям приемлемости, но значения количества находятся за пределами указанного диапазона, подсчет, возможно, не был выполнен правильно и независимо, повторная оценка того же самого слайда может быть уместна.

Ни в коем случае нельзя выдавать результат FISH-исследования, если контрольные слайды не сработали. Для клинических образцов, когда интерпретация гибридизационных сигналов достаточно сложная и недостаточно образца для повторного анализа, тест будет считаться неинформативным. Если для анализа недостаточно клеток, тест также считается неинформативным.

ИНТЕПРИТАЦИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сообщается о результатах подсчета 50 интерфазных ядер на мишень как количества так и процента ядер с 1, 2, 3, 4 и> 4 сигналами для CEP 18, LSI 13 и LSI 21, а также число и процент ядер с X, Y, XX, XY, XXY, XYY, XXX и др. для CEP X/Y. Наш клиническое исследование показало, что образцы с истинной анеуплоидией, выявленные стандартным хромосомным анализом, показали > 60% анеуплоидных ядер методом FISH-анализа; и те, которые были цитогенетически эуплоидными, все показали <10% анеуплоидных ядер методом FISH-анализа. Значения около 10% так называемый cut-off должны быть интерпретировать с осторожностью, так как низкие уровни мозаицизма не могут быть не учтены. Должны быть выполнены стандартные цитогенетические процедуры, чтобы различать истинный мозаицизм и псевдомозаизм. Пользователь должен проверить эти ожидаемые значения или установить свои собственные.

Расхождения в результатах среди методов исследований могут быть связаны с неточными результатами одного или нескольких методов, различиях в аналитической чувствительности/специфичности, фактические различия в статусе анеуплоидии среди популяций клеток, оцененные различными методами (например, циклические метафазные клетки против нециклических интерфазных клеток) среди других. Повторите FISH (одновременно с материалом QC) и/или повторите стандартный хромосомный анализ с оставшимся образцом, что может быть полезно для оценки возможности получения неверных результатов теста. Если основа для каких-либо расхождений в результатах теста не определяется, или если результаты теста не согласуются с другими клиническими данными, оправдана консультация между цитогенетиком и лечащим врачом.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Набор AneuVysion предназначен только для идентификации целевых областей хромосом X, Y, 18, 13 и 21 в интерфазных ядрах из некультивируемых и культивируемых образцов амниоцитов.
2. Клиническая интерпретация любого результата (ов) теста должна быть сделана в сочетании с другими результатами диагностических лабораторных исследований и должна оцениваться в контексте с историей болезни пациента и текущими факторами риска. Принятие клинического решения должно быть основаны на информации по результатам FISH- исследования и по крайней мере одного из следующих методов: подтверждающий стандартный хромосомный анализ или соответствующая клиническая информация, такое как аномальное ультразвуковое исследование или положительные результаты скринингового теста на синдром Дауна или трисомию 18 хромосомы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Результаты FISH анализа могут быть неинформативными, если качество образца или подготовка слайдов недостаточна.
4. Данный анализ не обнаружит наличие структурных отклонений, часто связаны с врожденными дефектами. Частота этих случаев встречается в популяции и зависит от гестационного возраста.
5. Этот анализ не следует проводить на образцах амниоцитов с умеренным или сильным загрязнением материнскими клетками. Результаты теста FISH на образцах амниоцитов с умеренным загрязнением материнскими клетками должны интерпретироваться с осторожностью.
6. Никакие терапевтические действия не должны начинаться, основываясь только на одном положительном FISH-исследовании. Положительные результаты должны быть далее охарактеризованы с использованием стандартного хромосомного анализа для определения мутационного механизма учета отклонений, детектируемых методом FISH. Эта информация может помочь в консультировании по поводу возможного риска выявленных нарушений, которые могут произойти во время будущей беременности.
7. Врачи, консультанты и другие медицинские работники должны понимать риск отклонений, которые данный тест не предназначен детектировать. Пациенты должны быть информированы, что имеется небольшой риск низкого уровня мозаицизма, зашифрованных транслокаций или других не детектируемых событий, которые не могут быть детектированы методом FISH или методами стандартной цитогенетики. Кроме того, существует маленький риск того, что некоторые индивиды являются носителями генетических полиморфизмов, которые могут повлиять на интенсивность, присутствие или отсутствие сигнала пробы, что в конечном итоге приведет к невозможности постановки диагноза.
8. Когда объем образца не достаточен для удовлетворения минимальных потребностей для постановки как FISH-исследования так и стандартных цитогенетических процедур, пользователь должен внимательно взвесить риски и преимущества использования такого материала для FISH. Консультация между лабораторным генетиком и/или генетическим консультантом и врачом и пациентом может помочь уточнить какая информация требуется и какой метод тестирования может быть использован.
9. Пользователи, выполняющие подсчет сигналов FISH, должны быть способными визуально различать оранжевый, зеленый и голубой сигналы.
10. Хотя зонд на 13 хромосому охватывает локус гена Rb1, эта проба не была валидирована для обнаружения мутаций, ассоциированных с ретинобластомой. В редких случаях локус Rb1 гена может быть детектирован, что может усложнить интерпретацию результатов FISH-исследования.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Подсчет количества интерфазного сигнала проводился на образцах эуплоидных и анеуплоидных амниотической жидкости для оценки ожидаемого процента клеток с 0,1,2,3 или >4 сигналов (CEP18, LSI 13 и LSI 21) и с X, Y, XX, XY, XXY, XYY, XXX и другими (CEP X/Y).

Значения среди нормальных образцов амниотической жидкости

Интерфазный FISH- анализ проводился как на культивируемых так и на некультивируемых образцах амниотической жидкости у 504 здоровых доноров (429 некультивируемых и 75 культивируемых), собранных в 31 месте, для определения ожидаемых значений и для верификации точки отсечения. Не было выявлено никакой существенной разницы в распределении сигналов между некультивируемыми и культивируемыми образцами среди этих нормальных случаев. Пятьдесят ядер были подсчитаны на пробу, распределение сигналов для этих объектов представлены в **Таблице 5** и **6**.

Таблица 5. Распределение процента клеток с хромосомой 13, 18 и 21 Сигналы в нормальных образцах амниотической жидкости

		Процент клеток с				
Хромосомная статистика		**0 -сигнал**	**1-сигнал**	**2-сигнал**	**3-сигнал**	**4-сигнал**
13	Значение	0.59	2.71	95.6	0.70	0.04
	S.D.	2.73	3.17	5.17	1.43	0.37
18	Значение	0.38	3.75	94.4	0.99	0.01
	S.D.	1.94	4.01	5.47	1.87	0.20
21	Значение	0.34	2.93	94.6	1.57	0.10
	S.D.	2.06	3.29	5.33	2.18	0.77

Для CEP X/Y-процент клеток с X, Y, XX, XY, XXY, XYY, XXX, и другие категории интересов для оценки ожидаемых значений, среди которых процент клеток с XX у женщин и XY в мужчины являются критическими категориями в цитогенетически нормальных образцах амниотической жидкости. Среднее (± S.D.) процентное содержание клеток со специфическими X/Y сигналами приведены в **Таблице 6.**

Таблица 6. Распределение процента клеток с X и Y сигналами в 376 женских и 445 мужских нормальных образцах амниотической жидкости

Генетическая статистика пола	**X0**	**0Y**	**XX**	**XY**	**XXX**	**XXY**	**XYY**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

46, XX	Значение	0.002	96.0	0.02	0.60	0.09	0.00
	S.D.	0.052	4.46	0.24	1.29	0.57	0.00
46, XY	Значение	0.36	0.30	96.9	0.00	0.35	0.39
	S.D.	1.44	1.66	4.39	0.00	1.07	1.23

В цитогенетически нормальных образцах амниотической жидкости процент би-сигнальных и трех-сигнальных клеток это две критические категории для оценки ожидаемых значений для CEP 18, LSI 13 и LSI 21. Среднее (±S.D.) процентное содержание би-сигнальных и трехсигнальных ядер составило 95,60% (±5,17%) и 0,70% (±1,43%) соответственно для хромосомы 13; 94,44% (±5,47%) и 0,99% (±1,87%) соответственно для хромосомы 18; и 94,63% (± 5,33%) и 1,57% (±2,18%), соответственно, для хромосомы 21. Для CEP X/Y процент клеток с ядрами XY у мужчин и XX ядер у женщин являются двумя критическими категориями для оценки ожидаемых значений. Средний (± S.D.) процент клеток с ядрами XY у нормальных мужчин составил 96,91% (±4,39%). Среднее (± S.D.) процентное содержание клеток с XX ядер у нормальных женщин составило 96,01% (±4,46%).

Значения среди анеусомических образцов амниотической жидкости

В цитогенетически аномальных образцах амниотической жидкости, критическими категориями для LSI 13, CEP 18 и LSI 21 - это процент клеток с тремя сигналами (% три-сигнальных ядер). Критическая категория для CEP X/Y это процент клеток с другими сигналами, отличными от ядер XY у мужчин и XX ядер у женщин. Эти критические категории для хромосом 13, 18, 21, X и Y будут называться анеуплоидными клетками.

Была произведена оценка 854 (821 истинных анеуплоидных и 33 триплоидных) анеуплоидных образцов с помощью стандартного хромосомного анализа в главном исследовании. Из этих 854 образцов, 455 были культивированы и 399 не были культивированы. Процент распределения анеуплоидных клеток показал 6 образцов (0,7%) с 63 до 69%, 25 (3,0%) с 70 до 79%, 73 (8,9%) с 80 до 89% и 717 (87,3%) с 90 до 100%. Процент анеуплоидных ядер не был статистически значимым для культивируемых и некультивируемых образцов для всех видов анеусомии. Среднее значение и S.D. % анеуплоидных клеток для этих объектов представлен в **Таблице 7**. для анеуплоидии.

Таблица 7. Средний процент (±S.D.) анеуплоидных клеток при анеуплоидии

% Анеуплоидных клеток			
Анеуплоидия	**n**	**Значение**	**S.D.**
+13	75	91.52	5.91
+18	192	88.87	7.10
+21	322	91.51	7.03
Триплоид -XXY	14	94.64	9.28
Триплоид-XXX	19	93.21	6.15
X	107	96.96	5.11
XXX	44	93.56	7.61
XXY	57	95.84	5.44
XYY	24	94.96	5.51

Верификация точки отсечения

В ключевых исследованиях, опубликованная точка отсечения составила 60%. Среди 504 эуплоидных образцов, большой процент анеуплоидных клеток был на уровне 10% и среди 854 анеуплоидных образцов малый процент анеуплоидных клеток, выявленных FISH-методом, составил 63%. Был отмечен большой разрыв между наибольшим значением среди анеуплоидных образцов и наименьшим значением среди анеуплоидных образцов, уменьшая шанс ошибочной классификации до 60% как точки отсечения.

Значения среди мозаичных образцов амниотической жидкости

В 62 цитогенетически мозаичных образцах амниотической жидкости, процент анеуплоидных клеток, детектируемых методом FISH, варьировал от 2% до 94%. Процент анеуплоидных ядер, выявленных методом FISH и стандартными цитогенетическими методиками, коррелировал (r=0.76), но корреляция была не идеальной. Еще предстоит установить, какое из двух измерений коррелирует лучше с фенотипической экспрессией.

Значения среди псевдомозаичных образцов амниотической жидкости

В 76 цитогенетически псевдомозаичных образцах, процент би-сигнальных ядер по данным FISH-анализа, варьировал от 86% до 100% и процент анеуплоидных клеток варьировал от 0% до 4.8%.

ОСОБЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность и специфичность

Эффективность гибридизации

В проведенных исследованиях**,** среди человеческих образцов амниотической жидкости средний процент клеток без гибридизационого сигнала составил 0.42% для LSI 13, CEP 18, и LSI 21. Средний процент клеток только с одним Y гибридизационным сигналом составил 0.06% для CEP X/Y. Таким образом, <2% клеток без сигнала или только с одним сигналом для каждой пробы является более реалистическим стандартом.

Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность набора AneuVysion была проверена воспроизводимостью результатов испытаний, описанных ниже. В данном исследовании, 100% XY (или 0% X0) образцов были оценены со значением 0.04% (±0.2%) и 10% образцов X были оценены со значением 9.10% (±1.79%). Верхний 95% КН составил 0.43 для 0% 45, образцов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

и нижний 95% КН для 10% X образцов были 5.59%. Таким образом предел детекции для набора AneuVysion в интерфазных клетках оценивается как 3%.

Аналитическая специфичность

Исследования специфичности локуса проводились на метафазных пластинках, согласно стандартным протоколам контроля качества Abbott Molecular. В общей сложности 705 метафазных пластинок были последовательно изучено методом G-бэндинга для идентификации хромосом 13, 18, 21, X и Y и после этого FISH-методом. Никакой перекрестной гибридизации с другими локусами хромосом в обследуемых 705 клетках не наблюдалось; гибридизация была ограничена таргетными регионами хромосом 13, 18, 21, X и У.

Были проведены также более жесткие исследования, согласно стандартным протоколам контроля качества Abbott Molecular на образцах лимфоцитов и амниоцитов для определения температуры, при которой происходит сбой анализа; определение модели перекрестной гибридизации в более мягких условиях и оценки эффективности гибридизации в нормальных условиях или более жестких условиях. Все анализы, выполненные в пределах рекомендуемого температурного диапазона (т.е. от 72 до 74°C) прошли оценку качества и достигли самого высокого общего рейтинга среди всех испытательных тестов. Некультивируемые образцы амниоцитов показали хорошие результаты в условиях пониженной жесткости и были достигнуты хорошие баллы даже при протекании процесса при температуре 62°C. Перекрестная гибридизация зонда CEP 18 наблюдалась среди культивируемых амниоцитов при низких температурах отмывки, ниже 72°C. Перекрестная гибридизация была подтверждена путем детального анализа изображений, проводимого путем изменения DAPI-связывающих паттернов на метафазах и было отмечено специально на центромерной паре 20 хромосомы, и не на каких-либо других хромосомах или хромосомных парах. Температура отмывки больше 74°C приводила к уменьшению интенсивности сигнала, но специфичность, перекрестная гибридизация и оценка фона остались приемлемыми для достижения целей.

Воспроизводимость

Для оценки воспроизводимости теста AneuVysion, пользователи подсчитывают процент анеуплоидных клеток и также была проведена оценка воспроизводимости для местоположения, между схожими клетками, между днями и между наблюдателями. Один нормальный (46, XY) плюс три культивируемых смеси человеческих амниоцитов с уже заранее известным процентом мозаичности [45,X(10%)/46,XX(90%),45,X(17%)/46,XX(47%)/47, XXX(36%), and 47,XY+21(50%)/46,XY(50%)] были оценены на процент анеуплоидных клеток согласно инструкции для подсчета сигналов, находящейся внутри упаковки. Общий показатель успешной гибридизации составил 85% (102/120) с первой попытки. Гибридизация 18 сменных слайдов (все для одного сайта) была проведена успешно. При использовании ANOVA, никаких статистически значимых изменений не наблюдалось ни в одном из параметров исследования. Среднее значение, стандартное отклонение, и процент CV для наблюдаемого процентного показателя анеуплоидных клеток показаны в **Таблице 8-12.**

Таблица 8. Точность в процентах % анеуплоидных клеток по уровню мозаичности по

Образец	N	Суммарная статистика	%X	%XX	%XXX	%XY	+21	%2-sig CH-21	%2-sig CH-18	%2-sig CH-13
100%, XY	24	Значение	0.04	0.04	0.00	98.88	0.079	96.7	94.60	97.1
		S.D.	0.20	0.20	0.00	1.88	0.79	2.34	3.37	2.35
		C.V (%)	-	-	-	1.9	100	2.4	3.6	2.4
10% X/90% XX	24	Значение	9.10	88.17	0.85	0.00	1.25	94.80	94.90	95.60
		S.D.	1.79	2.88	1.08	0.00	0.97	4.35	4.16	4.14
		C.V (%)	19.7	3.30	-	-	77.6	4.6	4.4	4.3
17% X/ 47% XX/ 36% XXX	24	Значение	19.48	42.56	36.68	0.00	1.16	96.10	95.70	97.30
		S.D.	4.14	4.88	3.58	0.00	0.98	3.11	3.37	2.09
		C.V (%)	21.3	11.5	9.8	-	84.5	3.2	3.5	2.1
50% XY+21/ 50% XY	24	Значение	0.04	0.00	0.00	98.13	52.03	45.98	96.10	97.10
		S.D.	0.14	0.00	0.00	2.65	4.58	6.82	3.29	2.94
		C.V (%)	-	-	-	2.7	8.8	14.8	3.4	3.0

Таблица 9. Суммарная статистика в % ядер со специфическим сигналом по местоположению

Образец	(n)[a]	Статистика	%X	%XX	%X	%XXX	%+21	%bl-sig 18	%bl-sig 13
100%, XY	1(8)	Значение	99.94	0.00	0.00	0.00	0.75	99.00	99.00
		S.D.	0.18	0.00	0.00	0.00	0.80	1.34	1.31
		C.V (%)	0.2	-	-	-	-	1.4	1.3
	2(8)	Значение	95.56	0.00	0.00	0.00	1.92	93.15	95.57
		S.D.	1.68	0.00	0.00	0.00	0.96	2.22	2.49
		C.V (%)	1.8	-	-	-	50.0	2.4	2.6
	3(8)	Значение	99.94	0.00	0.00	0.00	0.00	98.56	99.38
		S.D.	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00	1.29	1.41
		C.V (%)	0.2	-	-	-	-	1.3	1.4
	1(8)	Значение	0.00	87.19	11.88	0.94	0.50	98.88	98.94
		S.D.	0.00	1.49	1.71	0.86	0.60	0.74	0.78

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		C.V (%)	-	1.7	14.4	91.5	-	0.7	0.8
10% X/90% XX	2(8)	Значение	0.00	86.20	7.37	2.56	2.49	89.95	90.28
		S.D.	0.00	1.95	1.36	1.82	1.46	3.01	2.20
		C.V (%)	-	2.3	18.5	71.1	58.6	3.3	2.4
	3(8)	Значение	0.00	89.78	10.16	0.06	0.00	98.63	99.31
		S.D.	0.00	1.08	0.98	0.18	0.00	0.52	0.65
		C.V (%)	-	1.2	9.6	-	-	0.5	0.7
17% X/ 47% XX/ 36% XXX	1(8)	Значение	0.00	46.10	17.28	36.63	0.50	98.13	98.69
		S.D.	0.00	3.03	1.38	2.09	0.53	1.60	1.19
		C.V (%)	-	6.6	8.0	5.7	-	1.6	1.2
	2(8)	Значение	0.00	43.03	18.89	34.34	1.81	91.94	93.65
		S.D.	0.00	5.04	3.49	5.42	1.07	1.45	2.18
		C.V (%)	-	11.7	18.5	15.8	59.1	1.6	2.3
	3(8)	Значение	0.00	47.75	17.25	35.00	0.00	98.69	99.25
		S.D.	0.00	2.10	2.04	1.75	0.00	1.13	0.96
		C.V (%)	-	4.4	11.8	5.0	-	1.1	1.0
50% XY+21/ 50% XY	1(8)	Значение	100	0.00	0.00	0.00	48.81	99.25	98.94
		S.D.	0.00	0.00	0.00	0.00	1.07	0.46	0.82
		C.V (%)	-	-	-	-	2.2	0.5	0.8
	2(8)	Значение	93.01	0.00	0.44	0.00	59.08	92.94	96.08
		S.D.	2.17	0.00	0.49	0.00	6.76	1.63	1.68
		C.V (%)	2.3	-	-	-	11.4	1.8	1.7
	3(8)	Значение	100.0	0.00	0.00	0.00	52.81	98.88	99.94
		S.D.	0.00	0.00	0.00	0.00	3.14	1.43	0.18
		C.V (%)	-	-	-	-	5.9	1.4	0.2

Таблица 10. Суммарная статистика в % ядер со специфическим сигналом по зондам

Образец	**Lot (n)[a]**	**Статистика**	**%XY**	**%XX**	**%X**	**%XXX**	**%+21**	**%bl-sig 18**	**%bl-sig 13**
100%, XY	6618 (6)	Значение	98.59	0.00	0.00	0.00	0.58	91.10	97.00
		S.D.	2.03	0.00	0.00	0.00	0.74	2.82	2.70
		C.V (%)	2.1	-	-	-	-	2.9	2.8
	6619 (6)	Значение	98.33	0.00	0.00	0.00	0.83	97.08	98.75
		S.D.	2.41	0.00	0.00	0.00	1.12	3.04	2.10
		C.V (%)	2.5	-	-	-	-	3.1	2.1
	6620 (6)	Значение	98.42	0.00	0.00	0.00	1.32	96.68	98.09
		S.D.	3.01	0.00	0.00	0.00	1.27	4.11	2.49
		C.V (%)	3.1	-	-	-	96.2	4.3	2.5
	6621 (6)	Значение	98.58	0.00	0.00	0.00	0.83	96.76	98.09
		S.D.	2.33	0.00	0.00	0.00	1.20	3.40	2.85
		C.V (%)	2.4	-	-	-	-	3.5	2.9
10% X/90% XX	6618 (6)	Значение	0.00	87.19	11.88	0.94	0.50	98.88	98.94
		S.D.	0.00	1.49	1.71	0.86	0.60	0.74	0.78
		C.V (%)	-	1.7	14.4	91.5	-	0.7	0.8
	6619 (6)	Значение	0.00	86.20	7.37	2.56	2.49	89.95	90.28
		S.D.	0.00	1.95	1.36	1.82	1.46	3.01	2.20
		C.V (%)	-	2.3	18.5	71.1	58.6	3.3	2.4
	6620 (6)	Значение	0.00	89.78	10.16	0.06	0.00	98.63	99.31
		S.D.	0.00	1.08	0.98	0.18	0.00	0.52	0.65
		C.V (%)	-	1.2	9.6	-	-	0.5	0.7
	6621 (6)	Значение	0.00	88.42	9.33	1.59	0.91	96.67	96.35
		S.D.	0.00	2.31	3.28	2.29	1.62	3.04	4.22
		C.V (%)	-	2.6	35.2	-	-	3.1	4.4
17% X/ 47% XX/ 36% XXX	6618 (6)	Значение	0.00	46.10	17.28	36.63	0.50	98.13	98.69
		S.D.	0.00	3.03	1.38	2.09	0.53	1.60	1.19
		C.V (%)	-	6.6	8.0	5.7	-	1.6	1.2
	6619 (6)	Значение	0.00	43.03	18.89	34.34	1.81	91.94	93.65
		S.D.	0.00	5.04	3.49	5.42	1.07	1.45	2.18
		C.V (%)	-	11.7	18.5	15.8	59.1	1.6	2.3
	6620 (6)	Значение	0.00	47.75	17.25	35.00	0.00	98.69	99.25
		S.D.	0.00	2.10	2.04	1.75	0.00	1.13	0.96
		C.V (%)	-	4.4	11.8	5.0	-	1.1	1.0
		Значение	0.00	47.92	19.05	31.78	0.58	96.42	97.01

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	6621 (6)	S.D.	0.00	2.91	2.04	4.58	0.97	3.99	2.91
		C.V (%)	-	6.1	10.7	14.4	-	4.1	3.0
50% XY+21/ 50% XY	6618 (6)	Значение	97.83	0.00	0.17	0.00	55.28	96.76	98.18
		S.D.	3.86	0.00	0.26	0.00	6.30	3.72	1.95
		C.V (%)	3.9	-	-	-	11.4	3.8	2.0
	6619 (6)	Значение	97.76	0.00	0.33	0.00	51.48	97.08	97.92
		S.D.	3.51	0.00	0.60	0.00	6.10	3.60	2.29
		C.V (%)	3.6	-	-	-	11.8	3.7	2.3
	6620 (6)	Значение	97.76	0.00	0.00	0.00	54.31	97.08	98.83
		S.D.	3.56	0.00	0.00	0.00	7.98	3.61	1.75
		C.V (%)	3.6	-	-	-	14.7	3.7	1.8
	6621 (6)	Значение	97.33	0.00	0.08	0.00	53.21	97.17	98.34
		S.D.	4.32	0.00	0.20	0.00	3.87	2.66	2.27
		C.V (%)	4.4	-	-	-	7.3	2.7	2.3

Таблица 11. Суммарная статистика в % ядер со специфическим сигналом по дням исследования

Образец	**День (n)[a]**	**Статистика**	**%XY**	**%XX**	**%X**	**%XXX**	**%+21**	**%bl-sig 18**	**%bl-sig 13**
100%, XY	1(6)	Значение	98.42	0.00	0.00	0.00	1.08	96.42	97.59
		S.D.	2.22	0.00	0.00	0.00	1.27	3.10	2.91
		C.V (%)	2.3	-	-	-	-	3.2	3.0
	2(6)	Значение	98.42	0.00	0.00	0.00	0.91	96.56	97.59
		S.D.	3.01	0.00	0.00	0.00	1.37	3.88	2.57
		C.V (%)	3.1	-	-	-	-	4.0	2.6
	3(6)	Значение	98.67	0.00	0.00	0.00	1.00	97.76	98.33
		S.D.	2.08	0.00	0.00	0.00	0.77	3.28	2.89
		C.V (%)	2.1	-	-	-	77.0	3.4	2.9
	4 (6)	Значение	98.41	0.00	0.00	0.00	0.58	96.83	98.41
		S.D.	2.46	0.00	0.00	0.00	0.97	3.01	1.94
		C.V (%)	2.5	-	-	-	-	3.1	2.0
10% X/90% XX	1(6)	Значение	0.00	87.60	9.91	1.25	1.16	94.92	96.17
		S.D.	0.00	1.86	1.54	1.21	1.35	6.05	4.59
		C.V (%)	-	2.1	15.5	96.8	-	6.4	4.8
	2(6)	Значение	0.00	88.33	9.33	1.67	1.16	96.92	96.26
		S.D.	0.00	1.99	2.99	2.27	1.56	3.31	4.16
		C.V (%)	-	2.3	32.0	-	-	3.4	4.3
	3(6)	Значение	0.00	87.50	10.17	1.00	0.50	95.26	95.77
		S.D.	0.00	3.00	2.34	1.51	0.77	5.30	5.11
		C.V (%)	-	3.4	23.0	-	-	5.6	5.3
	4 (6)	Значение	0.00	87.45	9.80	0.83	1.17	96.17	96.51
		S.D.	0.00	2.00	2.70	1.21	1.94	4.23	5.19
		C.V (%)	-	2.3	27.6	-	-	4.4	5.4
17% X/ 47% XX/ 36% XXX	1(6)	Значение	0.00	45.28	17.63	35.77	0.66	96.50	95.84
		S.D.	0.00	5.65	3.06	2.84	0.98	4.36	3.89
		C.V (%)	-	12.5	17.4	7.9	-	4.5	4.1
	2(6)	Значение	0.00	45.88	17.29	36.09	1.00	96.42	97.43
		S.D.	0.00	4.02	2.40	1.93	1.45	2.80	2.86
		C.V (%)	-	8.8	13.9	5.3	-	2.9	2.9
	3(6)	Значение	0.00	45.22	19.57	33.97	0.91	95.75	97.59
		S.D.	0.00	3.17	1.96	1.75	0.00	1.13	0.96
		C.V (%)	-	7.0	10.0	16.8	-	3.8	3.2
	4 (6)	Значение	0.00	46.13	16.74	35.47	0.50	96.33	97.93
		S.D.	0.00	3.77	2.01	2.87	0.77	3.56	2.12
		C.V (%)	-	8.2	12.0	8.1	-	3.7	2.2
50% XY+21/ 50% XY	1(6)	Значение	97.76	0.00	0.00	0.00	55.14	96.83	98.75
		S.D.	3.56	0.00	0.00	0.00	7.26	3.44	1.75
		C.V (%)	3.6	-	-	-	13.2	3.6	1.8
	2(6)	Значение	97.83	0.00	0.17	0.00	53.54	96.92	98.01
		S.D.	3.86	0.00	0.26	0.00	7.32	3.84	1.96
		C.V (%)	3.9	-	-	-	13.7	4.0	2.0
	3(6)	Значение	97.76	0.00	0.33	0.00	52.89	97.00	98.09
		S.D.	3.51	0.00	0.60	0.00	5.98	3.51	2.29
		C.V (%)	3.6	-	-	-	11.3	3.6	2.3

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	4(6)	Значение	97.33	0.00	0.08	0.00	52.79	97.33	98.42
		S.D.	4.32	0.00	0.20	0.00	4.34	2.80	2.29
		C.V (%)	4.4	-	-	-	8.2	2.9	2.3

Таблица 12. Суммарная статистика в % специфически-сигнальных ядер сделанная наблюдателями

Образец	N	Суммарная статистика	%X	%XX	%XXX	%XY	+21	%2-sig CH-21	%2-sig CH-18	%2-sig CH-13
100%, XY	1(12)	Значение	0.04	0.04	0.00	98.88	0.079	96.7	94.60	97.1
		S.D.	0.20	0.20	0.00	1.88	0.79	2.34	3.37	2.35
		C.V (%)	-	-	-	1.9	100	2.4	3.6	2.4
10% X/90% XX	24	Значение	9.10	88.17	0.85	0.00	1.25	94.80	94.90	95.60
		S.D.	1.79	2.88	1.08	0.00	0.97	4.35	4.16	4.14
		C.V (%)	19.7	3.30	-	-	77.6	4.6	4.4	4.3
17% X/ 47% XX/ 36% XXX	24	Значение	19.48	42.56	36.68	0.00	1.16	96.10	95.70	97.30
		S.D.	4.14	4.88	3.58	0.00	0.98	3.11	3.37	2.09
		C.V (%)	21.3	11.5	9.8	-	84.5	3.2	3.5	2.1
50% XY+21/ 50% XY	24	Значение	0.04	0.00	0.00	98.13	52.03	45.98	96.10	97.10
		S.D.	0.14	0.00	0.00	2.65	4.58	6.82	3.29	2.94
		C.V (%)	-	-	-	2.7	8.8	14.8	3.4	3.0

Сравнение методов: Клинические образцы

Было проведено мульти центровое, контролируемое сравнительное исследование для дальнейшего определения характеристик набора AneuVysion относительно стандартного хромосомного анализа, стандарты осмотрительности в культивируемых и некультивируемых образцах амниотической жидкости. Было проведено 31 обследование на месте образцов амниотической жидкости, полученных у 1561 пациента с одним или более факторов риска, перечисленных ниже:

1. Возраст матери: 978 образцов
2. Плохие результаты ультразвукового исследования: 751 образец
3. Плохие результаты скрининга: 591 образец
4. Семейный анамнез: 78 образцов
5. Повышенный уровень альфа-фетопротеина в сыворотке у матери: 72 образца
6. Желание самой матери: 15 образцов
7. Другое: 75 образцов.

Все исследовательские центры проводили исследования в соответствии с предписанным анализом процедуры и руководству по подсчету сигналов.

Всего было получено и проанализировано 2238 образцов амниоцитов, выделенных и проанализированных у 1516 пациентов. Из 2 238 образцов 55 считались неинформативными. Эти 55 неинформативных образца включали три, которые были контаминированы материнскими клетками, 4 после неудачных попыток FISH-исследования и у 48 было недостаточно (<40) ядер для анализа. Т.о. на основе выборки показатель информативности составил 97,5% (2183/2238). Отмечено, что среди 48 неинформативных случаев из-за недостаточного (<40) количества ядер, полученных для одной или двух проб, 31 были частично не информативны либо для CEP 18/X/Y (22) или для LSI 13/21 (9).

Из 1516 пациентов 13 пациентов с как с некультивируемыми так и с культивируемыми образцами были включены в 55 неинформативных образцов. Таким образом показатель информативности на каждого пациента коэффициент информативности составил 99.8% (1503/1516). Один образец на пациента был включен в первичный анализ. Из них, 598 были культивируемыми и 927 были некультивируемыми образцами. **Таблица 13** обобщает исследование образцов по кариотипу и типу образцов.

Таблица 13 Характеристика образцов по типу анеуплоидии

Анеуплоидия	Культивируемые	Прямой	Общий
Норма	76	435	511
+13	34	41	75
+18	107	87	194
+21	156	167	323
-21	0	1	1
Триплоид	12	21	33
Тетраплоид	1	0	1
X	54	54	108
XXX	31	15	46
XXY	45	12	57
XXXXY	1	0	1
XXY, +18	1	0	1
XXX, +18	0	1	1

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

XXYY	1	0	1
XYY	17	7	24
45, XX, idic(18)	0	1	1
Псевдомозаицизм	14	62	76
Мозаицизм	39	23	62
Общее кол-во	**589**	**927**	**1516**

Возраст матери варьировал от 13 до 52 года, со средним возрастным значением (±S.D) 33.2 года (±6.8 лет). Гестационный возраст варьировал от 11 до 38 недель, со средним значением (±S.D.) 18,8 недель (±4.6 недели). Значения материнского возраста варьировал в зависимости от места исследования, в то время как значения гестационного возраста нет.

Сравнение результатов FISH-анализа и стандартного хромосомного анализа.

Каждый шаг FISH-анализа был выполнен в соответствии с инструкциями к набору AneuVysion, находящемуся внутри упаковки. Процент анеуплоидных клеток был определен методом FISH после подсчета минимум 50 интерфазных ядер на мишень, при этом минимум 40 оцениваемых ядер должны считаться информативными.

Из этого основного мульти центрового исследования, описанного выше, результаты интерфазного FISH-анализа сравнили со стандартным хромосомным анализом, представленным в **Таблице 14.**

Таблица 14 % анеуплоидных клеток, полученных методом FISH, категории стандартного хромосомного анализа. Все участки объединены и все образцы информативны для обоих проб.

% Анеуплоидных клеток		**Стандартный цитогенетический хромосомный анализ**				
		Анеуплоидия[a]	**Мозаицизм[b]**	**Псевомозаицизм[c]**	**Эуплоидия**	**Общее кол-во**
FISH	>60%	860[d]	15[e]			875
	10-60%	1[f]	35			36
	<10%		12[g]	76	504[h]	592
	Неудачный анализ	6			7	13
	Общее кол-во	**867**	**62**	**76**	**511**	**1516**

[a] Включает 75 +13; 192+ 18;322 +21; 107 45,X; 44 47,XXX; 57 47, XXY, 24 47, XYY; один -21; один XXY +18; один XXX +18; один 49,XXXXY, один 48,XXYY; один тетраплоид 92,XXYY и 33 триплоида (19 69, XXX и 14 69, XXY).

[b] Включено 23 случая, ассоциированных с 45, X, 10 с XXX, 8 с XXY, 7 с +21, 4 с +18, 2 с -18, 3 с +13 и 5 с 45,X комплекса.

[c] Включено 7 +13, 9 -13, один +18, 24 -18, 11 +21, 19 -21, 25 XO, один XXX, один XXY, один XYY и 6 XXYY

[d] Включено один случай 47,XX, +21 и один случай 47,XY, +21 с небольшой контаминацией материнскими клетками.

[e] В 8 случаях из 15, стандартный цитогенетический анализ показал что % анеуплоидных метафаз ≥60%.

[f] Один случай с 46,XX, idic (18), результат FISH был на уровне 35% +18 и 96% XX в некультивируемых образцах. FISH анализ культивируемого образца этого же образца показал 100% для обоих +18 и XX.

[g] В 7 из 12 случаев, стандартный цитогенетический анализ также показал % процент анеуплоидных метафаз ≤ 10%.

[h] Включен один случай 47,XY+22 и три случая 46,XY с незначительной контаминацией материнскими клетками.

Истинные случаи анеуплоидии

Среди 861 случаев анеуплоидии, были 75 +13; 192 +18; 322 +21; 107 45,X; 44 47, XXX; 57 47,XXY; 24 47,XXY; один -21; один XXY +18; один XXX +18; один 49,XXXXY; один 48, XXYY; один тетраплоид 92,XXYY и 33 трипоида (19 69,XXX и 14 69, XXY) и один 46,XX, idic(18). Из которых 860 с процентом анеуплоидных клеток, выявленных методом FISH больше 60% и один 35% - из-за длительного хранения приготовленного слайда. Т.о. при самом плохом сценарии, для детекции истинной анеуплоидии, методом FISH можно выявить 99,9% (860/861) случаев, выявляемых стандартным хромосомным анализом. Следует также отметить, что один случай женский и один мужской трисомии 21 хромосомы с незначительным загрязнением материнскими клетками считались информативными.

Случаи мозаицизма

Было выявлено 62 случая истинного мозаицизма, выявляемого стандартным хромосомным анализом. Из них было 23 случая, ассоциированных с 45,X, 10 с XXX, 8 с XXY, 7 с +21, 4 с +18, 2 с -18, 3 с +13 и 5 с XO. Даже несмотря на то, что клеточные линии анеуплоидных клеток были выявлены в 60 случаях, 12 из 62 случаев мозаицизма показали менее чем 10% анеуплоидных клеток методом FISH и 15 показали больше, чем 60%. Процент корреляции между методом FISH и стандартным хромосомным анализом составил 0.76.

Случаи псевдомозаицизма

Всего было выявлено 76 случаев псевдомозаицизма методом стандартного хромосомного анализа. Среди этих 76 случаев, наблюдалось 7+13, 9-13, один +18, 24-18, 11 +21, 19 -21, 25 XO, один XXY, один XYY и шесть XXYY. Результаты FISH анализа показали менее чем 10% анеуплоидных клеток, что согласуется с эуплоидным состоянием.

Эуплоидные случаи

Среди 504 эуплоидных случаев, выявляемых методом стандартного хромосомного анализа, методом FISH выявлено менее 10% анеуплоидных клеток. Т.о. для определения эуплоидии, методом FISH можно детектировать 100% (504/504) случаев, детектируемых стандартным хромосомным анализом. Обратите также внимание, что все 4 мужских эмбриона с незначительным заражением материнскими клетками считались информативными.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Попарное сравнение между культивируемыми и некультивируемыми образцами

Всего в исследование было включено 722 пациента, которым был проведен FISH-анализ как на культивируемых так и на некультивируемых образцах. Сравнительный анализ результатов исследования 722 культивируемых и некультивируемых образцов представлен в **Таблице 15.** В случаях мозаицизма**,** анеуплоидные линии клеток, детектируемые методом FISH, с различным процентом анеуплоидных клеток, между культивируемыми и некультивируемыми образцами. Результаты FISH-анализа при анеуплоидии, эуплоидии и в случаях пседомозаицизма совпадали в случаях между культивируемыми и некультивируемыми образцами.

Таблица 15 Сравнение результатов анализа на культивируемых и некультивируемых образцах одного и того же образца

	Некультивируемые					
Культивируемые	**Анеуплоидия**	**Мозаицизм**	**Псевдомозаицизм**	**Эуплоидия**	**Ошибки**	**Общее кол-во**
Анеуплоидия	299	2[d]			19	320
Мозаицизм	1[d]	9		1[d]		11
Псевдомозаицизм			54		9	63
Эуплоидия	1[d]			313	11	325
Ошибки						
Общее кол-во		1	1	1		3

[a] Включено 27 +13; 66 +18; 147 +21; 25 45,X; 10 47,XXX; 4 47,XYY; 4 47,XYY; 9 триплоид; один 46,XX, idic(18); один 46,XX, -21, +mar, der (21) (wcp21+).

[b] Включено 5 45,X; 2,XXY; один XXX; один +13; один +21; и один -18. Даже если были обнаружены все линии анеуплоидных клеток, % анеуплоидных клеток варьировал.

[c] У 42 пациентов были как культивируемые так и некультивируемые пары образцов, в которых 19 были с анеуплоидией, 10 с псевдомазаицизмом, 12 с эуплоидией и 1 с мозаицизмом.

[d] Хотя были обнаружены как анеуплоидные и/или эуплоидные линии клеток методом FISH-анализа, % анеуплоидных клеток варьировал между культивируемыми и некультивируемыми образцами.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. American College of Medical Genetics. Technical and clinical assessment of fluorescence in situ hybridization: an ACMG/ASHG position statement. I. Technical considerations. Genet Med. 2000; 2(6):356-361.
2. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, et al. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. Br Med J. 1988; 297:883-887.
3. Canick JA, Palomaki GE, Osthanondh R. Prenatal screening for trisomy 18 in the second trimester. Prenat Diagn. 1990; 10:546-548.
4. Ried T, Landes G, Dackowski W, et al. Multicolor fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of probe sets for chromosomes 13, 18, 21, X and Y in uncultured amniotic fluid cells. Hum Mol Genet. 1992;1:307-313.
5. Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, et al. Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4,500 specimens. Am J Hum Genet. 1993;52:854-865.
6. Robinson A, Puck M, Pennington B, et al. Abnormalities of the sex chromosomes: a prospective study on randomly identified newborns. Birth Defects. 1979;15:203-241.
7. West JD, Gosden CM, Gosden JR, et al. Sexing the human fetus and identification of polyploid nuclei by DNA-DNA in situ hybridization in interphase nuclei. Mol Reprod Dev.1989;1:129-137.
8. Cacheux V, Tachdjian G, Druart L, et al. Evaluation of X, Y, 18, and 13/21 alpha satellite DNA probes for interphase cytogenetic analysis of uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. Prenat Diagn. 1994;14:79-86.
9. Romana SP, Tachdjian G, Druart L, et al. A simple method for prenatal diagnosis of trisomy 21 on uncultured amniocytes. Eur J Hum Genet. 1993;1:245-251.
10. Zheng YL, Ferguson-Smith MA, Warner JP, et al. Analysis of chromosome 21 copy number in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization using a cosmid contig. Prenat Diagn. 1992;12:931-943.
11. Lebo RV, Flandermeyer RR, Diukman R, et al. Prenatal diagnosis with repetitive in situ hybridization probes. Am J Med Genet. 1992; 43:848-854.
12. Zahed L, Murer-Orlando M, Vekemans M. In situ hybridizations studies for the detection of common aneuploidies in CVS. Prenat Diagn1992; 12:483-493.
13. Christensen B, Bryndorf T, Philip J, et al. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 18 and triploidy in interphase nuclei of uncultured amniocytes by non-radioactive in situ hybridization. Prenat Diagn. 1992;12:241-250
14. Gersen SL, Carelli MP, Ward BE. A retrospective statistical study of 4,500 prenatal FISH analyses: trisomic vs. disomic cutoff thresholds for autosomal aneuploidies. Am J Hum Genet Suppl. 1993;53:A1411.
15. Ward BE, Wright M, Lytle C, et al. Prenatal aneuploidy detection by fluorescence in situ hybridization (FISH) in 1,068 second trimester pregnancies with fetal ultrasound abnormalities. Am J Hum Genet Suppl. 1994;55:A1696.
16. Kuo W-L, Tenjin H, Segraves R, et al. Detection of aneuploidy involving chromosomes 13,18, or 21 by fluorescence in situ hybridization (FISH) to interphase and metaphase amniocytes. Am J Hum Genet. 1991;49:112-119.
17. Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): two-year multi-center retrospective study and review of the literature. Prenat Diagn. 2001;21(4):293-301.
18. U.S. Centers for Disease Control. Morbidity and Mortality Weekly Review. 1987;36 (suppl. 2S):2S-18S.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

19. Barch MJ, ed. The ACT Cytogenetics Laboratory Manual. 2nd ed. New York, NY: Raven Press, Ltd; 1991:17-105, 297-536.
20. Winsor EJT, Silver MP, Theve R, et al. Maternal cell contamination in uncultured amniotic fluid. Prenat Diagn. 1996;16:49-54.
21. Hsu LYF, Kaffe S, Jenkins EC, et al. Proposed guidelines for diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies. Prenat Diagn. 1992;12:555-573.
22. ACOG Practice Bulletin No. 88: Invasive Prenatal Testing for Aneuploidy. Obstet Gynecol. 2007;110(6):1459-67.
23. Cunniff C, et al. Prenatal screening and diagnosis for pediatricians. Pediatrics. 2004;114(3):889-94.
24. Hong Kong College of Obstetricians and Gynaecologists. Guidelines for genetic amniocentesis. HKCOG Guidelines [serial online]. July 2000;4:1-4. Available at: http://www.hkcog.org.hk/docs/guidelines/Genetic%20 Amniocentesis_2000.pdf. Accessed April 19, 2010.
25. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
26. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
27. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline - Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
28. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефонам (1-800-553-7042) (в США) +49-6122-580 (другие регионы) или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

AneuVysion, Vysis, LSI, СпектрумАква, СпектрумГрин, СпектрумОранж, и ProbeCheck– торговые марки группы компании Abbott

AneuVysion и другие ДНК-пробы защищены патентом США. Патенты 5,663,319 и 5,491,224. Vysis LSI, CEP WCP меченые флуорохромами ДНК-пробы защищены патентом США. Патенты RE40, 494, 6,596,479, 5,756,696, 7, 115,709 и 6,203,977 даны исключительно на продукцию Abbott Molecular Inc Калифорнийским Университетом. Методы детекции гибридизационных сигналов одновременно защищены патентами США. Патент 6,203,977 даны на продукцию Abbott Molecular Inc., Йельским университетом.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

CE

EC REP ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580

© 2006, 2014 Abbott Laboratories

www.abbottmolecular.com

February 2014
30-608368/R5

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

UroVysion
Bladder Cancer Kit

en
REF 02J27
30-608385/R7

UroVysion
Bladder Cancer Kit
REF 02J27
30-608385/R7

Используемые символы

	Официальный производитель
REF	Номер списка
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
Σ	Количество достаточно для <n> тестов
	Температурный режим
	Биологический риск
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
!	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. инструкцию по применению
	Использовать до (срок годности)
EC REP	Авторизованный представитель в Европейском сообществе

НАБОР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

(Номер партии 30-161070, кат. номер 02J27-025;
Номер партии 32-161070, кат. номер 02J27-020;
Номер партии 36-161070, кат. номер 02J27-095;
Номер партии 37-161070, кат. номер 02J27-099).

ЗАПАТЕНТОВАННОЕ НАЗВАНИЕ
Набор для идентификации рака мочевого пузыря

ОБЩЕЕ ИЛИ ОБЫЧНОЕ НАЗВАНИЕ
Реагенты для проведение флуоресцентной гибридизации in situ

НАЗНАЧЕНИЕ
Набор для идентификации рака мочевого пузыря UroVysion (UroVysion Kit) предназначен для выявления анеуплоидии хромосом 3, 7, 17 и потери локуса 9p21c методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) в образцах мочи у пациентов с гематурией, с подозрениями на рак мочевого пузыря. Полученные результаты набором UroVysion предназначены для использования в сочетании с существующими стандартными диагностическими процедурами, а не вместо их, в качестве помощи для диагностики рака мочевого пузыря у

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

пациентов с гематурией и последующего наблюдение за рецидивом опухоли у пациентов с ранее с диагностированным раком мочевого пузыря.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ

По последним оценкам в 2010 году 70 530 новых случаев рака мочевого пузыря диагностирован в Соединенных Штатах (52 810 среди мужчин и 18 170 среди женщин). Рак мочевого пузыря, четвертый по распространенности рак, встречается в 3 раза чаще у мужчин, чем у женщин в США.

За этот же период ожидается приблизительно 14 680 смертей (10 410 среди мужчин и 4270 среди женщин) от рака мочевого пузыря. Рак мочевого пузыря редко диагностируется у лиц моложе 40 лет.

Поскольку медиана возраста для выставления диагноза составляет 65 лет, сопутствующие заболевания часто принимаются во внимание при наблюдении за пациентами. Девяносто процентов случаев рака мочевого пузыря классифицируются как переходно-клеточный рак (ПКР), в то время как оставшиеся 10% - преимущественно плоскоклеточный рак или аденокарцинома. Есть 4 клинически значимых подгруппы ПКР, как определено патологической классификацией: карцинома in situ (pTIS), неинвазивный папиллярный ТСС (pTa), минимально инвазивные ТСС (pT1) и мышечно-инвазивные опухоли (PT2-pT4). Каждая подгруппа

отличается по клиническому течению. В презентациях 75% опухолей являются «поверхностными» (т.е. pTa, pT1 или pTIS), из которых от 50 до 80% будут иметь одно или несколько повторений, и 15-25% будут прогрессировать как инвазивные опухоли. По этой причине пациенты с «поверхностным» раком мочевого пузыря регулярно контролируется на предмет рецидива и прогрессирования опухоли с цистоскопией и иногда цитологией мочи. Цистоскопическое обследование мочевого пузыря, и часто цитология мочи, также являются стандартным методом обследования для пациентов старше 40 лет с гематурией.

Ряд исследований, однако, показали, что цитология мочи имеет низкую чувствительность для выявления рака мочевого пузыря, а также необходимы улучшенные лабораторные тесты для выявления рака мочевого пузыря. Недавние исследования показали, что анализ FISH на анеуплоидию определенных хромосом может быть полезным для выявления рака мочевого пузыря.

ПРИНЦИПЫ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Флуоресцентная гибридизация in situ - это метод, позволяющий визуализировать специфические нуклеотидные последовательности в популяции клеток.

В частности, метод FISH включает в себя точный отжиг однонитевой, флуоресцентной меченой ДНК-пробы, комплементарной таргетному региону. Гибридизация зонда с клеточной ДНК видна путем прямой детекции с использованием флуоресцентного микроскопа. UroVysion проба представляет собой флуоресцентно-меченные последовательности нуклеиновых кислот для проведения гибридизации in situ на образцах мочи, фиксированных на предметных стеклах.

Набор UroVysion состоит из смеси 4 меченых флуоресцентно зондов, содержащих сиквенсовые последовательности, гомологичных специфическим регионам на хромосомах 3, 7, 9 и 17.

Смесь зондов UroVysion состоит из следующих проб: зонд (CEP) 3 SpectrumRed, CEP 7 SpectrumGreen, CEP 17 SpectrumAqua и локус-специфическая проба (LSI) 9p21 SpectrumGold. Зонды предварительно смешивают и предварительно денатурируют в буфере для гибридизации для простоты использования.

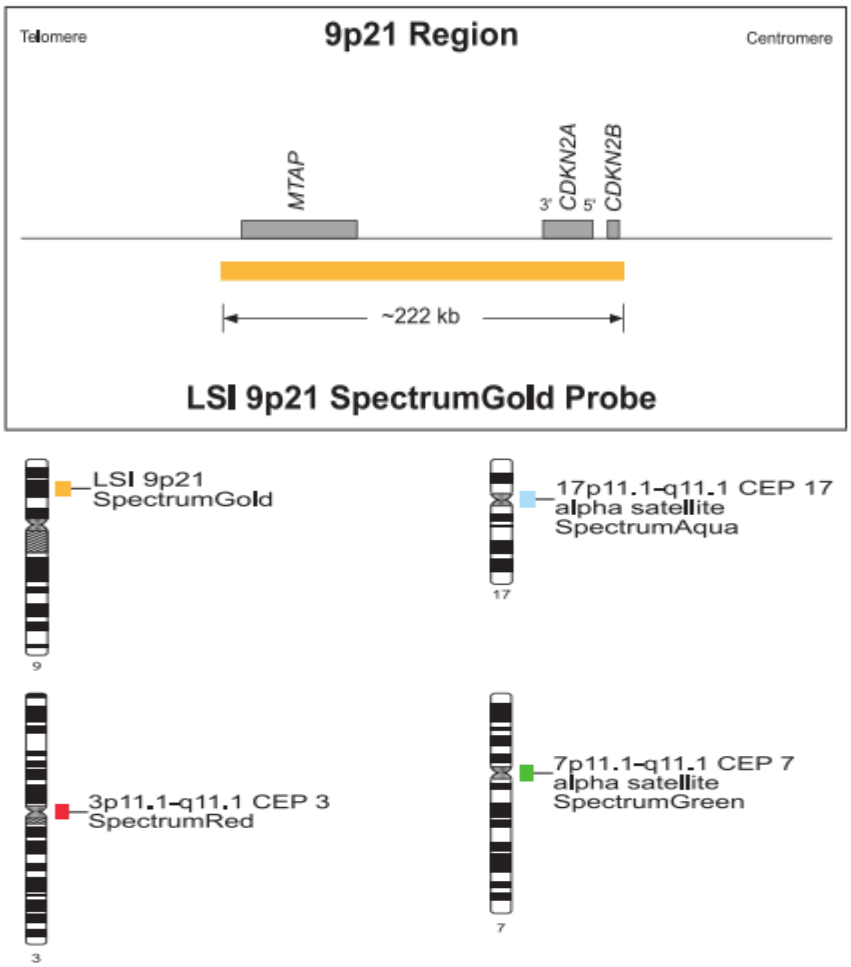
Немеченая блокирующая ДНК также включена в зонды для подавления последовательности, содержащиеся в целевых локусах, которые являются общими с другими хромосомами. При гибридизации и визуализации эти зонды дают информацию о количестве копий хромосом при подсчете количества хромосом. Набор UroVysion предназначен для обнаружения и количественного определения хромосом 3, 7 и 17 и локуса 9p21 в образцы мочи человека методом FISH.

Клетки, извлеченные из гранул мочи, фиксируют на предметных стеклах. ДНК денатуририруют до одноцепочечной формы, что в последствие позволяет гибридизоваться с зондом UroVysion.

После гибридизации несвязанный зонд удаляется серией промывок, а ядра окрашивается конткрасителем DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндолом), специфичным для ДНК пятно, которое флуоресцирует синий. Гибридизация зонда UroVysion рассматривается с использованием флуоресцентного микроскопа, оснащенного соответствующими фильтрами возбуждения и эмиссии, позволяющие визуализировать интенсивный красный, зеленый, голубой, и золотые флуоресцентные сигналы.

Подсчет CEP 3, 7 и 17 и LSI 9p21 сигналов проводят при микроскопическом исследовании ядра.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



РЕАГЕНТЫ И ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Поставляемые реагенты:

Этот набор содержит достаточное количество реагентов, достаточное примерно для 20 или 100 анализов (в зависимости от каталожного номера).

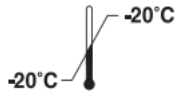
1) Смесь ДНК-зондов UroVysion
Номер партии: 30-171070 (20 тестов); 36-171070 (100 тестов)
Количество: 60 мкл (20 тестов); 300 мкл (100 тестов)
Условия хранения: -20°C в темном месте
Состав: Флуорофор-меченые ДНК-зонды для хромосом 3, 7 и 17, и локуса 9p21 в буфере для гибридизации. Буфер гибридизации состоит из декстрана сульфата, формамида и SSC.

2) DAPI II Контркраситель
Номер партии: 30-804841 (20 тестов); 30-804941 (100 тестов)
Количество: 300 мкл (20 тестов); 1000 мкл (100 тесов)
Условия хранения: -20°C в темном месте
Состав: DAPI 125 нг / мл (4,6-диамидино-2-фенилиндол) в 1,4-фенилендиамин, глицерин и буфер

3) NP-40
Номер партии: 30-804820
Количество: 4 мл (2×2 мл)
Хранение: -20°C до 25°C
Состав: NP-40 (неионный детергент)

4) 20× SSC
Номер партии: 30-805850
Количество: 66 г довести 250 мл 20×SSC раствора
Хранение: -20°C до 25°C
Состав: хлорид натрия, цитрат натрия

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



Храните неоткрытый комплект UroVysion при -20 ° C, в защищенном от света и влажности месте. 20X SSC и NP-40 могут храниться отдельно при комнатной температуре. Срок годности для каждого из неоткрытых компонентов указаны в индивидуальной упаковке. Эти условия хранения применяются как к открытых, так и для неоткрытых компонентов упаковки.
Следует избегать воздействия света, тепла или влажности, что может повлиять на срок годности некоторых компонентов комплекта. Компоненты, хранящиеся в условиях, отличных от указанных на этикетках, могут работать неправильно, что может отрицательно повлиять на результаты анализа.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Лабораторные реагенты

Примечание: если условия хранения не указаны на вкладке, храните реагенты в соответствии с рекомендациями поставщика.

- ProbeChek UroVysion контрольные слайды, номер лота 32-805070 / каталожный номер 02J27-011 и номер лота 32-805070, каталожный номер 02J27-010. Три предметных стекла, содержащие как положительный контроль. 20так и отрицательный контроль на одном и том же слайде (то есть, 2 целевые области на слайд - 1 негативный, 1 позитивный). Негативный контроль приготовлен из фиксированной культивируемой нормальной клеточной линии лимфобластов человека (GM11854); положительный контроль приготовлен из фиксированной, культивируемой клеточной линия карциномы рака мочевого пузыря (UM-UC-3). Хранить контрольные слайды при -20 ° C в закрытом контейнере с поглотителем влаги, для защиты от влажности.
- Vysis FISH реагент для пробоподготовки (номер лота 32-801270)/ каталожный номер 02J03-032), который включает:
- Vysis Протеаза (3×50 мл)
  Активность фермента 1:3000 к 1:3500

Примечание: Пепсин расщепляет не менее 3000 и не более 3500 за раз коагулированного яичного альбумина.

- Vysis Буфер для пепсина (3×50 мл)
  10 mM HCl
- Vysis PBS (2×250 мл)
  1× Фосфатный буферный раствор
- Vysis 100×$MgCl_2$ (3×0.5 мл)
  2M $MgCl_2$
- Vysis 20×SSC (66 г)
- 10% нейтральный забуференный формалин
- Фиксатор Карнуа (3:1) метанол: ледяная уксусная кислота). Ежедневно готовить свежий раствор.
- Иммерсионное масло для соответствующего микроскопа. Хранить при комнатной температуре (15°C до 30°C)
- 100% этанол. Хранить при комнатной температуре.
- Концентрированная (12N) HCl
- 1N NaOH
- Высокоочищенная вода (Milli-Q). Хранить при комнатной температуре.
- Клей
- Высокоочищенный формамид

<u>Хранение образцов</u>

- Карбовакс (2% полиэтиленгликоль в 50% этаноле). Рекомендуемый производитель: Sigma-Aldrich.
- ThinPrep PreservCyt Solution, Hologic (Cytyc) Corp.

<u>Лабораторное оборудование</u>

- Стеклянные покровные стекла (рекомендуются 12 мм круглые и 18 мм квадратные стеклянные покровные стекла)
- 12-луночные, 6-миллиметровые круглые предметные стекла. Рекомендуемый тип: Шандон
- Дозаторы (от 1 до 10 мкл и от 20 до 200 мкл) и стерильные наконечники
- Конические центрифужные пробирки (15 и 50 мл)
- Таймер (±1 секунда)
- Магнитная мешалка
- Вортекс
- Микроцентрифуга
- Настольная центрифуга
- Мерный цилиндр

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Водяные бани (37±1°C и 73±1°C)
• Увлажненный бокс для гибридизации
• Инкубатор (37±1°C)
• Щипцы
• Одноразовый шприц (5 мл)
• Сосуды Коплина (10) Предлагаемый тип: Wheaton № 900570
Эпифлуоресцентный микроскоп, оснащенный 100-ваттной ртутной лампой и рекомендуемые фильтры к нему (желтый одиночный, аква одиночный, DAPI однополостный, и зеленый/красный широкополостные фильтры)
• Фазоконтрастный микроскоп с объективом 20X
• pH-метр и лакмусовая бумага
• Калиброванный термометр
• 0,45 мкм поры для фильтрации
• осушитель
• Параметры автоматического коденатурационного анализа:
• Система HYBrite - обратитесь к руководству пользователя для получения инструкций.
• Система ThermoBrite - см. Системное руководство пользователя.
• Опция автоматического анализа перед обработкой:
• Процессор VP 2000 - см. Системное руководство для инструкции пользователя

Микроскоп и аксессуары

Микроскоп: Требуется эпифлуоресцентный микроскоп с освещением для оценки результатов гибридизации. Если существующая флуоресценция не видна на микроскопе, его следует проверить, чтобы убедиться, что он работает правильно, чтобы обеспечить оптимальный просмотр флуоресценции образцов для анализа гибридизации. Микроскоп, используемый с общей ДНК, окрашенной такими красителями как DAPI, пропидий йодид и хинакрин, могут не работать адекватно для FISH-анализа. Рекомендуется регулярная очистка микроскопа и периодическое профилактическое обслуживание техническим представителем производителя.

ПРИМЕЧАНИЕ: предположительная несостоятельность реагентов может свидетельствовать о нарушении работы или неправильном выборе флуоресцентного микроскопа или использовании неподходящего набора фильтров, в то время как гибридизация прошла успешно.

Источник света возбуждения: лампа возбуждения является источником света, что это возбуждает флуорофоры для последующей флуоресценции. Если лампа возбуждения находится в неправильном положении, оптимальное изображение не будет сгенерировано. Рекомендуется использовать ртутную лампу с максимальным сроком службы около 200 часов в качестве источника возбуждения. Запишите, сколько часов отработала лампа и замените лампу, прежде чем она превысит номинальное время.

Обьективы: для микроскопа с ртутной лампой 100 Вт или лампой с длительным сроком эксплуатации 100 Вт используйте масляно-иммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥0,75. Для сканирования подходит объектив с 40-кратным увеличение и окуляры с 10-кратным увеличением. Для подсчета сигналов Urovysion теста и получения удовлетворительных результатов для визуализации FISH используйте масляно-иммерсионный ахроматический объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: иммерсионное масло, используемое с целью погружения в масло должны быть сформулированы для низкой автофлуоресценции и специально для использовать в флуоресцентной микроскопии.

Фильтры: наборы фильтров для флуоресцентного микроскопа, оптимизированные для использования с CEP и LSI и доступны у Abbott Molecular для большинства моделей микроскопов. Рабочие характеристики UroVysion.

Анализ с использованием других фильтров должен быть определен и подтвержден пользователем. Эксплуатационные характеристики анализа Уровижин при работе с другими фильтрами должны быть установлены и валидированы пользователем.

Рекомендуемые наборы фильтров для UroVysion – желтый одиночный, аква одиночный, DAPI одиночный и зеленый/красный двойной. Гибридизация LSI 9p21 и CEP 3, 7, и 17 зондов с таргетными регионами отмечены золотым, красным, зеленым, и аква цветом флуоресценции, соответственно. Ядерная ДНК будет флуоресцировать синим при окраске DAPI.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление рабочих растворов реагентов

1% Раствор формальдегида

Смешайте:

12,5 мл	10% нейтрального забуференного формалина
37 мл	1×X PBS очищенной воды
0,5 мл	100×X $MgCl_2$ (1 пробирка из набора Vysis FISH реагент для пробоподготовки)
50 мл	Финальный объем

Тщательно перемешайте. Перелейте раствор в сосуды Коплина. Утилизируйте раствор по истечению недели. Хранить неиспользуемый раствор при температуре от 2°C до 8°C в течении 6 месяцев.

20X SSC (3M хлорид натрия, 0,3M цитрат натрия, pH 5,3)

Приготовить 20X SCC pH 5,3, смешайте:

66г	20X SSC
200 мл	очищенной воды
250	мл общий объем

Тщательно перемешать. Измерьте pH при комнатной температуре с помощью pH-метра. Доведите pH до 5,3 с помощью концентрированной HCl. Довести общий объем до 250 мл добавив очищенную воду. Фильтруют через фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Хранить при комнатной температуре до 6 месяцев.

Раствор для денатурации (70% Формамид/2X SSC pH 7,0–8,0)

ПРИМЕЧАНИЕ: Не для автоматизированного (HYBrite или ThermoBrite) коденатурационного анализа.

Для приготовления денатурационного раствора смешайте:

49 мл	Формамида
7 мл	20× SSC pH 5,3
14 мл	Очищенная вода
70мл	общий объем

Тщательно перемешайте. Измерьте pH при комнатной температуре, используя лакмусовые бумажки, убедитесь, что pH составляет от 7,0 до 8,0. Приготовленный раствор может использоваться в течении недели. Проверяйте pH перед каждым использованием. Хранить при температуре от 2 до 8 ° C в плотно закрытом контейнере, если он не используется.

Спиртовые растворы для промывки

Приготовьте разведения спиртов 70%, 85%, используя 100% этанол и очищенную воду. Данные разведения могут использоваться в течение 1 недели, если не происходит испарение или раствор становится разбавленным из-за чрезмерного использования. Хранить при в комнатной температуре в плотно закрытых емкостях, если они не используются.

0.4X SSC/0.3% NP-40

Для приготовления смешайте:

20 мл	20× SSC pH 5,3
877 мл	Очищенная вода
3 мл	NP-40
1000мл	общий объем

Тщательно перемешать. Измерьте pH при комнатной температуре, используя pH-метр. Доведите pH до 7,5±0,2 с помощью 1N NaOH. Доведите объем до 1 литра с помощью очищенной воды. Пропустите через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Утилизируйте использованный раствор в конце каждого дня. Храните неиспользованный раствор при комнатной температуре до 6 месяцев.

2X SSC/0.1% NP-40

Для приготовления смешайте:

1000 мл	20× SSC pH 5,3
849 мл	Очищенная вода
1 мл	NP-40
1000мл	общий объем

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Тщательно перемешать. Измерьте pH при комнатной температуре, используя pH-метр. Доведите pH до 7,5±0,2 с помощью 1N NaOH. Доведите объем до 1 литра с помощью очищенной воды. Пропустите через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Утилизируйте использованный раствор в конце каждого дня. Храните неиспользованный раствор при комнатной температуре до 6 месяцев.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ:

IVD ПРЕДНАЗНАЧЕНО ДЛЯ ДИАГНОСИКИ IN VITRO

1. Для диагностики in vitro.
2. Со всеми биологическими образцами следует обращаться как с потенциальными источниками инфекционных агентов. Контрольные препараты из этого набора изготовлены из клеточных линий человека, фиксированных в растворе Карнуа. *Часто невозможно убедиться в инфекционной безопасности образца, поэтому со всеми образцами человека и контрольными препаратами следует обращаться, соблюдая универсальные меры предосторожности. Руководство по обращению с такими образцами можно получить в Центрах контроля и профилактики заболеваний США.*
3. Условия гибридизации могут изменяться при использовании других реагентов, кроме реагентов, поставляемых Abbott Molecular Inc.
4. Несоблюдение всех процедур денатурации, гибридизации и детекции может привести к получению неприемлемых или неправильных результатов.
5. Флуорофоры быстро распадаются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Это относится и ко всем этапам работы с гибридизованными препаратами. Проводите все манипуляции, не требующие света (инкубация, промывка и т.д.), в темноте.
6. Набор содержит формамид, являющийся тератогеном. Не допускайте его контакта с кожей и слизистыми.
7. Измерение температуры растворов, водяных бань и инкубаторов следует проводить градуированными термометрами, т.к. температура является критической при выполнении анализа.
8. Все опасные материалы следует утилизировать в соответствии с местными и государственными правилами.

UroVysion смесь ДНК-зондов



Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.
Дезактивации и утилизации всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

UroVysion смесь ДНК-зондов



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид

H360D	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

NP-40





ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Определяющие опасность компоненты маркировки:

H302	Опасно при проглатывании
H318	Вызывает повреждения глаз
H412	Вызывает вредные воздействие для водных организмов с долгосрочными последствиями
P280	Надевайте защитные перчатки, защитную одежду, защиту для глаз
P264	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P273	Избегайте попадания в окружающую среду.
P305+	При попадании в глаза: Тщательно промойте водой в течении нескольких минут.
P351+	Снимите контактные линзы, если они есть и продолжайте промывать.
P338	
P301+P312	При проглатывании: Позвоните в центр токсикологии или врачу при плохом самочувствии
P501	Материалы или контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом.

ПАСПОРТА БЕЗОПАСНОСТИ: Важная информация по безопасности, хранению, транспортировке и утилизации содержится в Паспортах Безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (MSDS) для всех реагентов, представленных в комплекте, доступны по запросу от Службы Технической поддержки Abbott Molecular.

СБОР ОБРАЗЦОВ И ТРАНПОРТИРОВКА

UroVysion Kit предназначен для использования на образцах мочи. Выполните сбор мочи (≥33 мл) в кабинете врача. Смешайте мочу в отношении 2:1 с консервантом; Карбовакс (2% полиэтиленгликоль в 50% этаноле) или консерванты PreservCyt согласно рекомендациям. Перенесите в центрифужную пробирку(и) емкостью 50 мл или другой плотно закрытый пластиковый контейнер. Использование любого другого консерванта должно быть валидировано лабораторией. Если моча будет доставлена в лабораторию не сразу после сбора, поставьте ее в холодильник немедленно и отправьте в лабораторию в течение 24 часов.

Предпочтительные условия хранения и доставки на пакетах со льдом, но образцы могут храниться и доставляться при температуре до 25°C. Было показано, что моча, хранящаяся в Carbowax или PreservCyt стабильна в течение 1 недели; однако рекомендуется, что образцы должны быть обработаны до фиксированных клеточных гранул (см. обработка образцов, шаг 7) в течение 72 часов с момента сбора. Аналитические характеристики теста UroVysion при любых других условиях должны быть определены и подтверждены пользователем.

ПОДГОТОВКА И ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Обработка образцов

1. Отцентрифугируйте мочу в центрифужной пробирке 50 мл при 600 g в течение 10 минут при комнатной температуре (от 15 до 30°C).
2. Удалите супернатант, оставив примерно от 1 до 2 мл клеточного осадка, стараясь не зацепить осадок.
3. Ресуспензировать осадок в оставшихся 1-2 мл супернатанта и перенести содержимое в коническую центрифужную пробирку объемом 15 мл. Промыть в 50 мл пробирке с 10 мл 1XPBS и перенести содержимое в 15 мл пробирку.

Примечание: осадки образца одного и того же пациента могут быть объединены.

4. Центрифугировать образец (ы) при 600 г в течение 10 минут при комнатной температуре.
5. Удалите супернатант в пределах примерно от 0,5 мл от клеточного осадка.
6. Ресуспендируйте осадок в оставшихся 0,5 мл супернатанта. Медленно по каплям добавьте от 1 до 5 мл свежего фиксатора (3:1, метанол: уксусная кислота) слегка помешивая.
7. Оставьте фиксированные образцы при -20 ° C в течение минимум 30 минут.

Примечание: образцы могут храниться в течение ночи или дольше (до 10 дней) на этом этапе.

8. Центрифугировать образец(ы) при 600 г в течение 5 минут при комнатной температуре. Тщательно удалите супернатант.

Примечание: если осадок не виден или едва виден, дальнейшая промывка осадка не рекомендуется во избежание потери клеток. Вместо этого перейдите к шагу 11. если образец

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

был сохранен в течение ночи или дольше, ресуспензируют в свежем фиксаторе до подготовки слайдов.

9. Промойте осадок путем ресуспензирования в 1-5 мл фиксатора.
10. Центрифугируйте образец(ы) при 600 g в течение 5 минут при комнатной температуре.
Повторите шаги 8 и 9 дважды.
11. После центрифугирования зафиксируйте суспензии клеток в фиксаторе:
• Если клеточного осадка очень мало и он плохо виден, ОСТОРОЖНО удалите как можно больше фиксатора, оставив примерно 100 мкл раствора.
• Если клеточный осадок хорошо виден, удалите как можно больше фиксатора и добавьте 0,5-1 мл свежего фиксатора к клеточному осадку.
12. Немедленно продолжите процедуру подготовки слайдов.

Подготовка слайдов

Используйте 12-луночные слайды.
1. Ресуспензируйте клеточный осадок и нанесите 3 мкл, 10 мкл и 30 мкл суспензии клеток по кругу на 3 слайда (круг № 1, 2 и 3).
2. Дайте образцам высохнуть.
3. Оцените предметные стекла под фазово-контрастным микроскопом, используя 20X увеличение.
4. Выберите область гибридизации (обведите круг № 1, 2 или 3), в котором от ~100 до 200 клеток видны в поле зрения. Круг, который лучше всего соответствует рекомендуемой плотности клеток (т.е. от 100 до 200 клеток на поле) следует использовать для гибридизации с зондом UroVysion.
• Если плотность клеток слишком низкая, даже в круге № 3, нанесите 30 мкл клеточной суспензии на круге № 3. Высушите образец и рассмотрите под фазово-контрастным микроскопом, повторить если необходимо.
• Если плотность клеток слишком высокая, даже в круге № 1, разбавьте образец с фиксатором и повторите шаги с 1 по 4.

Примечание: если присутствует чрезмерное количество дебриса, следуйте процедуре предварительной обработки, а затем выберите область гибридизации.

5. Подготовьте как минимум 1 дополнительный резервный слайд, следуя шагам с 1 по 4, описанным выше. Хранить дополнительные слайды при температуре -20°C в коробке с увлажнителем.

Примечание: Фиксированные предметные стекла стабильны при -20°C до 12 месяцев.

Хранение любой оставшейся клеточной суспензии при -20°C до 1 месяца в случае подготовки дополнительных слайдов при необходимости.

Предварительная обработка слайдов

Слайды должны быть предварительно обработаны и зафиксированы перед анализом с помощью UroVysion набора. Вкладыши внутри упаковки для набора по предварительной обработке FISH (номер партии 32-801270 /Каталожный номер № 02J03-032) содержит подробные инструкции.

Ручной анализ предподготовки	**Оптимально автоматизированный анализ предподготовки**
• Оставьте высыхать слайды при комнатной температуре	• Слайды должны полностью высохнуть при комнатной температуре
• Погрузите слайд(ы) в 2X SSC на 2 минуты (от 2 до 2,5 мин) при 73±1°C.	• Погрузите слайды в 2X SSC на 2 минуты (от 2 до 2,5 мин.) при 73±1°C
• Погрузите слайды в раствор протеазы на 10 минут (±1 минута) при температуре 37±1°C	• Погрузите слайды в раствор протеазы на 10 мин. (±1 мин.) при 37±1°C
• Промойте слайды в 1×PBS в течении 5 минут (±1 минута) при комнатной температуре	• Промойте слайды в 1X PBS в течении 5 минут (±1 мин.) при комнатной температуре
• Зафиксируйте слайды в 1% формальдегиде в течении 5 мин. (±1 мин.) при комнатной температуре	• Зафиксируйте слайды в 1% формальдегиде в течении 5 мин. (±1 мин.) при комнатной температуре
• Промойте слайды в 1X PBS в течении 5 мин. (±1 мин.) при комнатной температуре	• Промойте слайды в 1X PBS в течении 5 мин. (±1 мин.) при комнатной температуре
• Проведите дегидратацию слайдов путем помещения слайдов в 70% этанол при комнатной температуре. Слайды должны побыть в растворе этанола по крайней мере в течении 1 минуты. Повторите тоже самое, опустив слайды в 70% этанол и затем в 100% этанол.	• Проведите дегидратацию слайдов путем помещения слайдов в 70% этанол при комнатной температуре. Слайды должны побыть в растворе этанола по крайней мере в течении 1 минуты. Повторите тоже самое, опустив слайды в 70% этанол и затем в 100% этанол.
• Слайды должны полностью высохнуть	• Высушите слайды при 25°C в течении 3 минут или пока слайды полностью не высохнут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Продолжить работу с протоколом анализа для теста UroVysion	• Продолжить работу с протоколом анализа для теста UroVysion

ПРОЦЕДУРА FISH-АНАЛИЗА
UroVysion-тест
Для ручного анализа (Для опционально автоматизированного (HYBrite или ThermoBrite) анализа коденатурации, см. информацию ниже).
ПРИМЕЧАНИЕ: Время для приготовления раствора зонда (см. Подготовка зонда, шаги 1-3) должны быть тщательно скоординированы с денатурацией ДНК-образца (шаг 1-7), поэтому эти два шага должны быть выполнены в одно и тоже время.
Денатурация ДНК-образца:
1. Предварительно прогреть увлажненную гибридизационную камеру (герметичный контейнер с влажной промокательной бумагой или бумажным полотенцем приблизительно 1 дюйм ×3 дюйма (приклеенный к боковой стороне контейнера) до 37±1°C путем помещения в инкубатор при 37±1°C до подготовки слайдов. Увлажнить промокательную бумагу или бумажное полотенце водой перед каждым использованием в гибридизационной камере.
2. Добавьте денатурирующий раствор в сосуд Коплина и поместите в воду с температурой 73±1°C не менее чем на 30 минут или пока температура раствора не достигнет 73±1°C. Проверьте температуру раствора перед использованием.
ПРИМЕЧАНИЕ: Если раствор хранится при температуре от 2 до 8°C, дайте раствору в сосуде Коплина достигнуть комнатной температуры перед помещением в водяную баню.
3. Денатурировать ДНК образца путем погружения подготовленных слайдов в денатурирующий раствор при 73±1°C (4 предметных стекла на сосуд) в течение 5 минут (±1 мин). Не денатурируйте более 4 слайдов за один раз в сосуде Коплина; если денатурируете менее 4 слайдов, заполните пустое место дополнительным слайдом.
Примечание: Проверьте температуру раствора внутри сосуда Коплина перед каждым использованием.
4. Используя пинцет, удалите слайд(ы) из денатурирующего раствора и сразу же поместите в моющий раствор 70% этанола при комнатной температуре. Перемешайте слайд, чтобы удалить формамид. Слайд(ы) должны побыть в этаноле в течение 1 минуты.
5. Извлеките слайд(ы) из 70% этанола. Повторите шаг 4 с 85% этанолом, затем со 100% этанолом.
6. Удалите излишки этанола со слайда, коснувшись нижнего края слайда промокательной бумагой и вытрите нижнюю сторону слайда насухо лабораторной салфеткой.
7. Высушите предметное стекло (-а) на нагревателе для предметного стекла от 45 до 50 ° С в течение не более 2 минут.

Подготовка зонда
1. Извлеките ДНК-зонд UroVysion из холодильника на -20°C и дайте нагреться до комнатной температуры. Перемешайте на Vortexe. Отцентрифугируйте флаконы аккуратно на микроцентрифуге от 1 до 3 секунд) в, чтобы содержимое пробирки осталось на дне. Снова перемешайте на вортексе.
2. Прогрейте раствор ДНК-зонда UroVysion в течение 5 минут при температуре 73±1°C на водяной бане.
3. Поместите раствор зонда на нагреватель для предметного стекла от 45 до 50°C.
Гибридизация
1. Нанесите 3 мкл раствора зонда на выбранную целевую область предметного стекла. Сразу же, поместите 12 мм стеклянное покровное стекло поверх зонда. Осторожно прижмите покровное стекло, чтобы позволить раствору зонду равномерно распределиться под покровным стеклом. Пузырьки воздуха будут мешать гибридизации и поэтому их следует избегать. Оставшийся раствор зонда должен быть немедленно возвращен на хранение при -20°C после использования.
2. Заклейте покровное стекло с помощью резинового клея следующим образом: наберите клей в 5 мл шприц. Нанести небольшое количество резинового клея вокруг периферии покровного стекла, накрывающей покровное стекло и слайд, образуя печать вокруг покровного стекла.
3. Поместите слайды в предварительно нагретую увлажненную камеру гибридизации. Накройте камеру плотной крышкой и инкубируйте при 37 ±1°C в течение ночи (примерно 16 часов).
4. Перейдите к Промывки после гибридизации.
Опциональная автоматизированная (HYBrite или ThermoBrite) процедура коденатурации.

Подготовка и применение зонда
1. Извлеките пробу UroVysion из морозильника на -20° С и дайте
Прогреться при комнатной температуре (от 15 до 30°C). Перемешайте на вортексе. Отцентрифугируйте осторожно на центрифуге (от 1 до 3 секунд) в микроцентрифуге для того, чтобы содержимое флакона переместилось на дно. Аккуратно отвортексируйте снова.
2. Нанесите 3 мкл раствора зонда на выбранную целевую область предметного стекла. Сразу же, поместите 12 мм круглое стеклянное покровное стекло поверх зонда.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Осторожно прижмите покровное стекло, чтобы позволить раствору зонда равномерно распределиться под покровным стеклом. Пузырьки воздуха будут мешать гибридизации и их следует избегать. Раствор зонда должен быть немедленно возвращен на хранение при -20°C после использования.
3. Запечатайте покровное стекло резиновым клеем следующим образом: наберите клей в 5 мл шприц. Нанести небольшое количество резинового клея вокруг периферии покровного стекла, накрывающей покровное стекло и слайд, образуя печать вокруг покровного стекла.

Денатурация ДНК образца и гибридизация в системе HYBrite:

1. Смочите бумажное полотенце водой и поместите полотенце в каналы вдоль поверхности нагрева.
2. Включите инструмент HYBrite.
3. Установите программу для температуры плавления 73°C и времени плавления 2 минуты (денатурация) и температура гибридизации 39°C и время гибридизации от 4 до 16 часов.
4. При появлении запроса поместите предметные стекла на нагревательную поверхность прибора. Дополните пустыми стеклянными предметными стеклами по мере необходимости. Убедитесь, что слайды лежат на нагревательной поверхности.
5. Закройте крышку HYBrite и запустите программу.

Денатурация ДНК образца и гибридизация на Системе ThermoBrite:

1. Вставьте 2 карты влажности в слоты на крышке устройства. Увлажните каждую карту 8-10 мл дистиллированной или деионизированной водой. *Обратитесь к Руководству по эксплуатации ThermoBrite для повторного использования карт влажности при последующих прогонах.*
2. Включите устройство ThermoBrite.
3. Установите программы температуры денатурации 76°C и время денатурации 3 минуты.
(денатурация) и температуры гибридизации 39°C и время гибридизации от 14 до 18 часов (гибридизация).
4. При появлении запроса поместите предметные стекла на нагревательную поверхность прибора.
Убедитесь, что слайды лежат ровно и упираются в отмеченные места, предназначенные для слайдов.
5. Закройте крышку ThermoBrite и запустите программу.

Постгибридизационные промывки (Ручная т автоматическая программы)

1. За тридцать минут до отмывки заполните сосуд Коплина 0,4X SSC/0,3% NP-40 и поместите в водяную баню при температуре 73±1°C. Используя откалиброванный термометр, проверьте температуру раствора внутри сосуда перед добавлением слайдов для процедуры отмывки. Температура растворов должна составлять 73±1°C.
2. Заполните второй сосуд 2X SSC/ 0,1% NP-40 и поместите при комнатной температуре. Утилизируйте оба моющих раствора после 1 дня использования.
3. Удалите резиновый клей и покровное стекло с предметных стекол.

Примечание: Удалите резиновый клей и покровное стекло с 1 предметного стекла на время и поместите сразу в сосуд Коплина с 0,4X SSC/0,3% NP-40.

4. Поместите стекла в 0,4X SSC/0,3% NP-40 сразу после снятие покровного стекла. Когда все слайды находятся в сосуде (максимум из 4) инкубировать в течение 2 минут при 73±1°C. Не промывайте больше, чем 4 слайда одновременно в одном сосуде; дополните пустым стеклом при необходимости.

Примечание: размещение отдельного слайда в сосуде не должно превышать нескольких секунд; если это так, то убедитесь, что слайд не находится в промывочном буфере более 2 минут. После удаление слайдов, необходимо, чтобы температура вернулась к 73±1°C, прежде чем начать промывать больше слайдов.

5. Через 2 минуты удалите стекло (а) из промывочного раствора и поместите стекло (а) в сосуд Коплина, содержащий 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре. Инкубировать от 5 секунд до 1 минуты.
6. Достаньте стекла с промывочного раствора и поместите вертикально в темное место (например, ящик) на бумажное полотенце, чтобы они полностью высохли.
7. Нанесите 10 мкл DAPI II на целевую область и поместите покровное стекло (рекомендуется 18 мм) над раствором DAPI II, избегая образования пузырьков воздуха. Храните слайды в темноте до подсчета сигналов.

Хранение слайдов

Хранить гибридизированные стекла (с покровными стеклами) при -20°C в темноте. После удаление из -20°C, дайте стеклу(ам) достичь комнатной температуры до просмотра с помощью флуоресцентного микроскопа.

Интерпретация результатов

Сигналы зонда UroVysion и конткрасителя DAPI следует просматривать с использованием следующих фильтров:

- DAPI одиночный
- Аква одиночный (хромосома 17)
- Желтый (Золотой) одиночный (локус 9p21)
- Красный/Зеленый двойной (хромосомы 3 и 7)

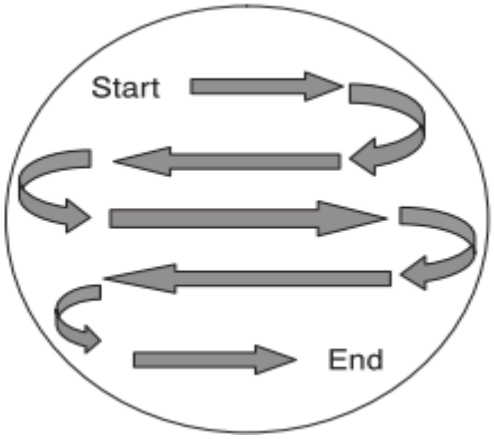
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Настоятельно рекомендуется использовать эпифлуоресцентный микроскоп, оснащенный 100-ваттной ртутной лампой. Использование контркрасителя DAPI вызывает окрашивание ядер и флуоресценцию ярко-синего цвета.

Анализ образцов слайдов

1. Используйте предписанные фильтры (см. выше) и увеличение 400X для сканирования (от 600X до 1000X для анализа, см. шаг 5 ниже).
2. Отрегулируйте глубину фокуса и ознакомьтесь с размером и формой целевых сигналов и шумов (дебрис).
3. Начните анализ в верхнем левом квадранте целевой области. Сканирование поля слева направо и сверху вниз, без повторного сканирования той же области (см. диаграмму ниже).

Примечание: На слайде имеется примерно от 70 до 80 полей обзора.



4. Используйте следующие критерии (см. Рисунок 1), чтобы выбрать подозрительные клетки злокачественных новообразований (морфологически аномальных):

а. большой размер ядра

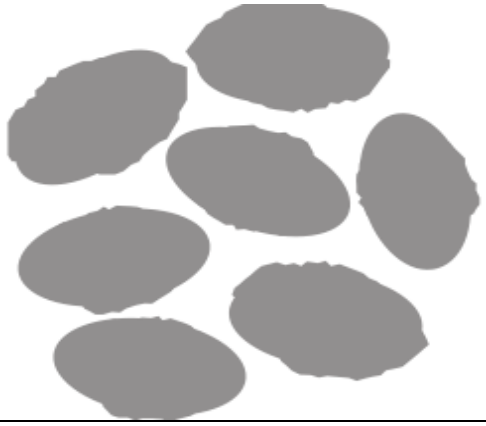
б. неправильная ядерная форма

с. «пятнистое» окрашивание DAPI

д. кластеры клеток (не считайте перекрывающиеся клетки в кластерах)

Примечание: начните с тех клеток, которые появляются морфологически аномальными. Если присутствует несколько морфологически аномальных клеток, выберите самые большие клетки или те, где самые большие ядра. Если морфологически аномальные клетки не легко выявить, весь образец должен быть отсканирован и ядра в большинстве морфологически аномальных клетках должны быть засчитаны первыми.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Норма: не считать	Одиночная клетка 
	 2 перекрывающиеся клетки
Подозрение на злокачественность: Подсчитывать	Атипичная ядерная морфология (a, в, c) 
	Кластеры клеток (d) 

5. Поменяйте увеличение от 600X до 1000X. Перемещайте фокус вверх и вниз, чтобы найти все сигналы, присутствующие в ядре.

6. Определите количество сигналов для всех 4 проб в 25 морфологически атипичных клетках *# используя фильтры, перечисленные выше (см. рисунки 2, 3 и 4).

7. Запишите хромосомный паттерн, только если:

• имеется усиление (т. е. 3 или более сигналов) от 2 или более хромосом 3 (красный), 7 (зеленый) или 17 (аква), или

• есть потеря обеих копий LSI 9p21.

Если хромосомы 3, 7 или 17 показывают потерю обеих хромосом, считается, что клетка не может быть интерпретирована из-за сбоя гибридизации.

Примечание: если окружающие клетки показывают аномальные паттерны хромосом, как описано выше, эти клетки должны быть записаны, даже если они не являются морфологически ненормальными.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

 *Только для Иллюстрации, не для масштабного показа*		Морфологически «нормальные» клетки **Не подсчитывать**. Смотрите примечание в шаге 7 вышеизложенных исключений
		Морфологически ненормальные клетки с диплоидным набором хромосом. **Считать общее число анализируемых клеток, но не учитывать хромосомные паттерны.**
		Морфологически абнормальные клетки с абнормальным числом хромосом. **Записать число хромосом**.

*# Если морфологически аномальные клетки не всегда видны, весь образец должен быть отсканирован и ядра, представляющие большинство морфологически аномальных клеток следует оценивать в первую очередь.

8. Запишите общее количество просмотренных морфологически аномальных клеток (диплоидный и аномальный).

Примечание: хотя количество отдельных сигналов не записывается, клетки с не диплоидным числом, имеющим как минимум 1 сигнал для каждой из 4-х проб, но не соответствующим указанным критериям, в шаге 7 должны быть включены наряду с диплоидными клетками, в общем количестве морфологически аномальных просмотренных клеток.

8. Если среди 25 морфологически аномальных клеток был проведен анализ, *и встретился один из следующих критериев, остановите анализ:

≥ 4 из 25 клеток показывают увеличение для 2 или более хромосом (3, 7 или 17) в одной и той же клетке, или ≥ 12 из 25 клеток имеют нулевые 9p21сигналы.

В противном случае продолжайте анализ до тех пор, пока:

4 клетки с усилением для нескольких хромосом были обнаружены, или 12 клеток с нулевыми сигналами 9p21 были обнаружены, или пока весь образец не будет проанализирован.

#Если морфологически аномальные клетки не всегда видны, весь образец должен быть отсканирован и ядра, представляющие большинство морфологически аномальных клеток следует оценивать в первую очередь.

Анализ слайдов контроля качества

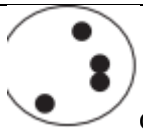
Для подсчета сигналов стекол контроля качества выполните шаги с 1 по 6, описанные выше.

Подсчитайте 25 идущих подряд клеток и запишите результаты. не выбирайте только морфологически аномальные клетки или прекратите подсчет после обнаружения 4 или 12 клеток, как описано выше.

Рисунок 2. Руководство по подсчету одноцветных сигналов

1	 Не подсчитывайте, пропустите. Это может быть 2 клетки с одним сигналом в каждой или искаженные ядра.
2	 Подсчитывать как два сигнала: один сигнал очень компактный и второй сигнал диффузный
3	 Не подсчитывайте, пропустите. Пользователь не может определить, какая клетка содержит сигнал.
4	 Считать, как два сигнала. Один сигнал разделенный.
5	 Считать, как три сигнала.
6	 Считать как 4 сигнала.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

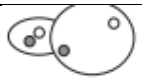
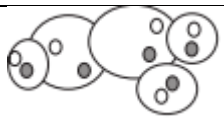
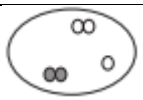
7	 Считать как три сигнала. Один сигнал разделенный.

*Считать диффузный сигнал как 1 сигнал, если диффузия сигнала в смежных и в приемлемых границах; 2 сигнала, соединенных видимой линией, считаются разделенным сигналом и должна подсчитываться как 1 сигнал. Расщепленный или диффузный сигнал может возникнуть в результате конденсации вариабельной ДНК внутри ядра, степень которой зависит от текущей стадия деления клеток; и не указывает на дополнительный набор хромосом в этой клетке.

Рисунок 3. Руководство по подсчету двухцветных сигналов

Ключ: ○ **= зеленая проба**

● **= красная проба**

1	 Не подсчитывать – ядра перекрываются и границы обоих ядер не видны.
2	 Считать как один красный и один зеленый сигнал. Красный сигнал диффузный.
3	 Не подсчитывать. Ядра расположены слишком близко друг к другу, чтобы можно было определить их границы.
4	 Считать как один красный сигнал и один зеленый. Красный сигнал разделенный.
5	 Считать как один красный сигнал и два зеленых сигнала. Один зеленый сигнал разделенный и красный сигнал тоже разделенный.
6	 Считать как два красных и один зеленый сигнал.
7	 Считать как три красных сигнала и один зеленый сигнал.
8	 Считать как четыре красных сигнала.

*Считать диффузный сигнал как 1 сигнал, если диффузия сигнала в смежных и в приемлемых границах; 2 сигнала, соединенных видимой линией, считаются разделенным сигналом и должна подсчитываться как 1 сигнал. Расщепленный или диффузный сигнал может возникнуть в результате конденсации вариабельной ДНК внутри ядра, степень которой зависит от текущей стадия деления клеток; и не указывает на дополнительный набор хромосом в этой клетке.

Рисунок 4. Примеры хромосом нормальных и абнормальных клеток.

Ключ: ○ =CEP 3 (красный) ● = CEP 17 (голубой)

⊗ =CEP 7 (зеленый) ● = LSI 9p21 (золотой)

1	 Хромосомно нормальная клетка
2	 Хромосомно-абнормальная клетка – увеличение по CEP 3 и CEP 17

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контрольные слайды должны быть запущены одновременно со стеклами пациента для мониторинга проведения анализа и оценки точности просмотра сигнала. Один контрольный слайд (1 положительная и 1 отрицательная цель на слайд) должен обрабатываться для каждого прогона образца и с каждым новым лотом. Контрольные предметные стекла должны быть гибридизованы со смесью зондов UroVysion вместе с образцами стекол для исследования.

Выполните подсчет сигнала в соответствии с инструкциями в анализе раздела контроля качества слайдов, описанных выше. Результаты подсчета сигналов должны быть внутри спецификаций в таблице данных, предоставленных с контрольными слайдами для приемлемого выполнения теста.

Если контрольные слайды не соответствуют критериям приемлемости слайдов, анализ не может быть выполнен надлежащим образом или реагенты для анализа UroVysion не были произведены надлежащим образом. Результаты теста ни в коем случае не должны учитываться, если контрольные слайды не сработали. Если контрольные слайды отвечают соответствующим критериям, но результаты теста находятся за пределами указанного диапазона, подсчет не может быть выполнен корректно, и независимо, повторение анализа одного того же слайда может быть уместно. В случае неудачи гибридизации, либо с образцом исследования, либо с контрольными слайдами, обратитесь к руководству по устранению неполадок, представленных в Таблице 1.

Для клинических образцов, когда интерпретация сигнала гибридизации представляет сложность, тест считается неинформативным. Если недостаточно клеток для анализа, тест также считается неинформативным.

Образцы пациентов должны контролироваться в соответствии со стандартными лабораторными требованиями. Качество гибридизации и подсчет должны быть задокументированы в соответствующей форме. Качество и эффективность гибридизации следует учитывать при оценке результатов.

Таблица 1 Устранение неполадок

Проблема	Возможные случаи	Пути решения
Сигнал слабый или отсутствует	• Неправильно подобраны фильтры для анализа слайдов	• Используйте правильные фильтры
	• Микроскоп неправильно работает	• Свяжитесь с техническим представителем фирмы-производителя микроскопа
	• Использованы несоответствующие лампы (ксеноновые или вольфрамовые)	• Используйте ртутные лампы (желательно на 100 Вт)
	• Старая ртутная лампа	• Замените новую лампу
	• Ртутная лампа смещена	• Откорректируйте лампу
	• Коллекторные линзы загрязнились или треснули	• Промойте или замените линзы
	• Зеркало в корпусе для лампы загрязнилось или разбито	• Промойте или замените зеркало
	• Ненадлежащие объективы	• Используйте рекомендуемые объективы
	• Не соблюдены условия гибридизации	• Проверьте температуру водяной бани 73±1°C
	• Неправильные условия промывки	• Проверьте температуру 37±2°C инкубатора
		• Проверьте температуру водяной бани 73±1°C
		• Проверьте состав водяной бани (pH, и т.д.)
	• Под покровное стекло попали пузырьки воздуха, которые затрудняют доступ для зондов	• Покровное стекло должно наноситься сначала путем прикосновения к поверхности гибридизационной смеси
	• Зонды хранились неправильно	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		• Хранить зонды при температуре -20°C (±5°C) в темноте
Низкая специфичность сигнала	• Не соблюдены условия гибридизации • Температура промывочного раствора низкая	• Проверьте температуру 37±2°C инкубатора • Установите температуру промывочного раствора на 73±1°C
Высокий фоновый сигнал	• Плохая промывка	• Проверьте pH и температуру гибридизации • Проверьте температуру 73±1°C водяной бани • Обеспечить интенсивное помешивание во время промывки
Чрезмерно яркий сигнал	• Концентрация зонда достаточно высокая для вашего микроскопа	• Попытайтесь блокировать некоторые сигналы путем помещения фильтра с нейтральной плотностью на пути возбуждающего луча
Клеточные структуры повреждены	• Образец был чрезмерно ферментирован	• Уменьшите действие протеазы

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируется минимум 25 морфологически аномальных клеток. Регистрируется распределение сигналов для морфологически аномальных клеток, показывающих либо увеличение некоторых хромосом (т.е. 3 или более сигналов) для более чем 1 из следующих (CEP 3 красный, CEP 7 зеленый или CEP 17 голубой) зондов или гомозиготная потеря 9p21 (т.е. нет сигналов для LSI 9p21 желтого цвета).

Анализ продолжается до тех пор, пока ≥4 клеток с увеличенным числом хромосом не будет обнаружено или ≥12 клеток с гомозиготной потерей 9p21 не будет выявлено, или пока весь образец не будет проанализирован. Определяют Общее количество хромосомно-аномальных клеток, т. е. клеток с увеличенным числом хромосом или гомозиготную потерю 9p21; результаты сообщаются как положительный или как отрицательный. Наше клиническое исследование показало, что образцы от пациентов с рецидивом рака мочевого пузыря достоверно обнаружили ≥4 клетки с увеличенным количеством хромосом или ≥12 клеток с потерей обеих копий 9p21.

Результаты в точке отсечения или около нее (4 клетки с увеченным количеством хромосом или 12 клеток с гомозиготной потерей 9p21) должны интерпретировать с осторожностью. Образцы слайдов стекол следует пересчитать другому пользователю, чтобы удостовериться в правильности результатов. Если Вы все еще сомневаетесь в правильности анализа, его необходимо повторить на новом стекле. Если результаты теста не согласуются с клиническими данными, консультации между патологом и лечащим врачом оправданы.

ПРИЧИНЫ ДЛЯ ПОВТОРЕНИЯ ТЕСТА

Ниже приведены ситуации, требующие повторного анализа с новым образцом или существующими стеклами и соответствующими контрольными стекла. Обратитесь к руководству по поиску и устранению неисправностей (таблица 1) для возможных причин и необходимых действий для устранения конкретной проблемы.

1. Если одна или обе таргетные мишени контрольного слайда не соответствуют слайдам с критериями приемлемости, результаты слайдов образца не являются надежными, анализ должен быть повторен.
2. Если имеется менее 25 оцениваемых ядер, тест неинформативен и анализ должен быть повторен.
3. Если при оценке качества слайда какие-либо технические аспекты (интенсивность сигнала, фон или перекрестная гибридизация) являются неудовлетворительными, анализ должен быть повторен.

ОГРАНИЧЕНИЯ

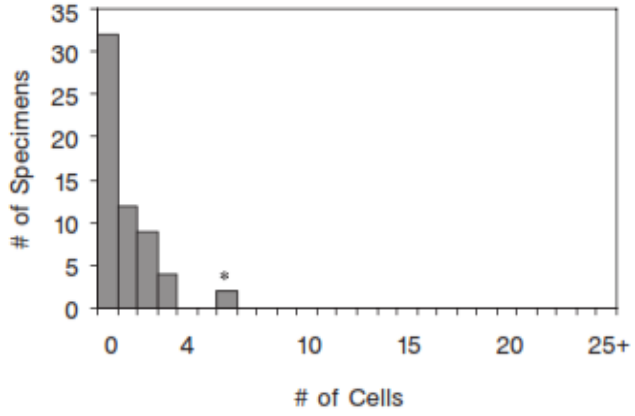
1. UroVysion Kit был оптимизирован для идентификации и количественного определения хромосом 3, 7 и 17 и локуса 9p21 в образцах мочи человека.
2. Производительность UroVysion Kit была подтверждена с использованием процедуры, указанной внутри упаковки. Модификации для этих процедур могут изменить производительность анализа.
3. Клиническая интерпретация результатов любого теста должна быть оценена в контексте истории болезни пациента и других результатов диагностических лабораторных исследований.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Результаты анализа UroVysion могут быть не информативными, если качество образца и/или подготовка предметного стекла выполнена неудовлетворительно, например, наличие избыточных гранулоцитов или массивной бактериурии.
5. Пользователи, выполняющие подсчет сигналов UroVysion, должны визуально различать красный и зеленый сигналы.
6. Положительный результаты UroVysion теста в отсутствие других симптомов или симптомов рецидива рака мочевого пузыря могут быть свидетельством других типов рака мочевыводящих путей, например, мочеточника, мочеиспускательного канала, почки и/или простаты у мужчин, и поэтому оправдано дальнейшее наблюдение за пациентом.
В исследовании, проведенном на пациентах с гематурией (см. Симптоматические пациенты: Производительность в сравнении со стандартным уходом для уточнения деталей в этом клиническом исследовании) 3 пациента, у которых первоначальная цистоскопия мочевого пузыря была отрицательной, были впоследствии диагностированы с раком почки в течение 6 месяцев от начала проведения этих исследований. Все 3 из этих случаев были положительными по тесту UroVysion.
7. Если результаты UroVysion отрицательные, но стандартные клинические или диагностические анализы (например, цитология, цистоскопия) положительные, стандартные процедуры имеют приоритет над тестом UroVysion. Хотя UroVysion Kit был разработан для обнаружения генетических изменений, связанных со случаями рака мочевого пузыря, будут некоторые виды рака мочевого пузыря, чьи генетические изменения не могут быть обнаружены с помощью теста UroVysion.
8. На стадии одиночных опухолей, размером менее 5 мм не могли быть обнаружены UroVysion FISH. Результаты UroVysion FISH зависят от количество опухолевых клеток, которые помещаются на слайде.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ
Анализ FISH с помощью набора UroVysion был выполнен на образцах мочи от 59 здоровых доноров (50 некурящих и 9 курильщиков), а также часть исследования на специфичность анализа (см. также раздел «Специфичность» ниже). Все 59 образцов здоровых доноров были отрицательными по UroVysion тесту. На рисунке 5. показано распределение хромосомно-аномальных клеток в этой популяции. Обратите внимание, что было 2 образца с ≥4 аномальными клетками (обозначено* на рисунке 5), однако в обоих случаях все 6 образцов аномальных клеток показали гомозиготную потерю только 9p21. Точка отсечения для потери гомозиготности 9p21 это ≥12 клеток, таким образом, эти 2 образца считаются отрицательными.

Рисунок 5. Распределение хромосомно-аномальных клеток среди здоровых доноров



Значения среди пациентов с раком мочевого пузыря

В проспективном исследовании пациенты с раком мочевого пузыря в анамнезе, 62 пациента с рецидивом заболевания в течение 17 месяцев, было выявлено с помощью цистоскопии/гистологии (см. Клинические исследования; Рецидив рака мочевого пузыря: эффективность в сравнении со стандартом медицинской помощи для деталей относительно этого клинического исследования). Распределение хромосомно-аномальных клеток среди этих 62 пациентов показаны на **Рисунке 6**. Распределение хромосомно-аномальных клеток среди 114 пациентов без рецидива на основе стандартных клинических исследований (цистоскопия / гистология) показаны на **Рисунке 7**.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 6. Распределение хромосомно-аномальных клеток среди пациентов с рецидивом рака мочевого пузыря по данным цистоскопии/гистологии

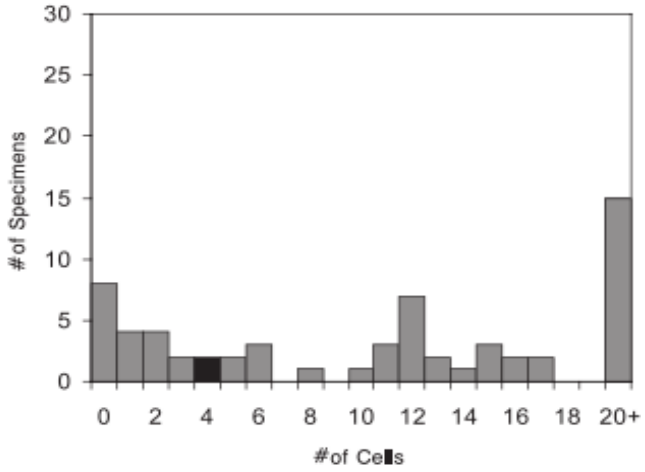
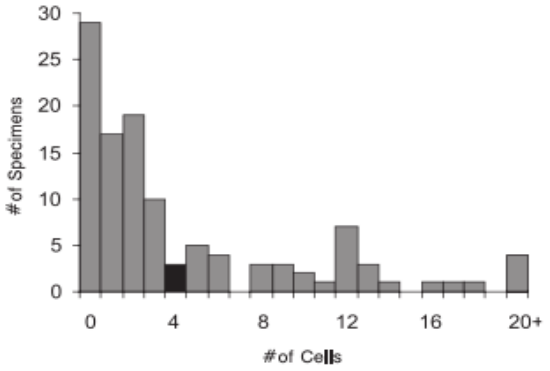


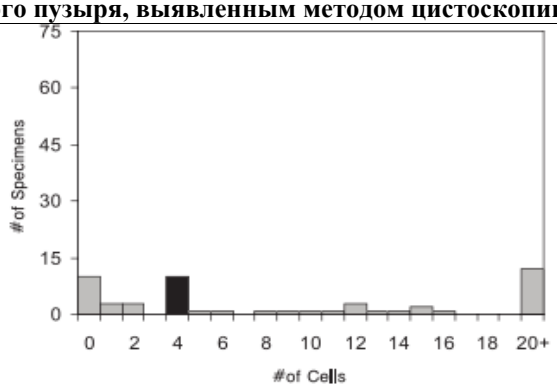
Рисунок 7. Распределение хромосомно-аномальных клеток среди пациентов без рецидива рака мочевого пузыря, выявленного цистоскопией/гистологией



Значения среди пациентов с гематурией, не имеющих в анамнезе рака мочевого пузыря

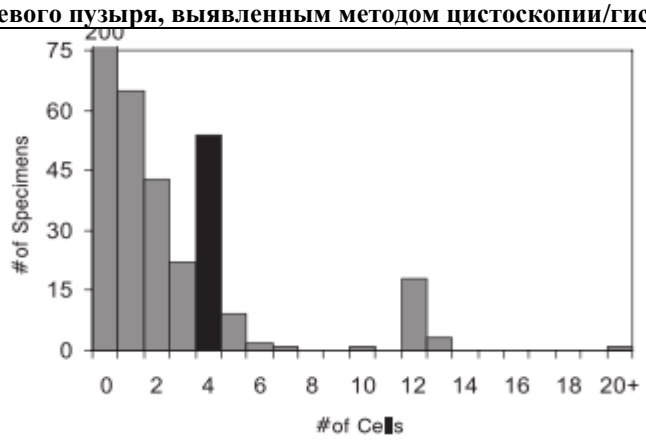
В проспективном исследовании пациентов с симптомами рака мочевого пузыря у 50 пациентов был диагностирован рак мочевого пузыря цистоскопией/гистологически, и у 1 пациента был диагностирован рак мочеточника (см. Клинические исследования; Симптоматические пациенты: эффективность в сравнении со стандартом медицинской помощи для деталей относительно этого клинического исследования).
Распределение хромосомно-аномальных клеток среди 51 пациента показано на **Рисунке 8**. Распределение хромосомно аномальных клеток среди 419 пациентов, у которых в анамнезе не был диагностирован рак мочевого пузыря, на основании стандартных клинических мероприятий (цистоскопия/гистология) показаны на **Рисунке 9.**

Рисунок 8. Распределение хромосомно-аномальных клеток среди симптоматических пациентов, положительных по раку мочевого пузыря, выявленным методом цистоскопии/гистологии



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 9. Распределение хромосомно-аномальных клеток среди симптоматических пациентов, положительных по раку мочевого пузыря, выявленным методом цистоскопии/гистологии



РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Неклинические

Эффективность гибридизации/Информативные результаты против неинформативных результатов

Слайды контроля качества ProbeChek, разработанные совместно с клиническими испытаниями, 1,2% (4/328) (95% Cl: 0,3%, 3,1%) на целевых регионах не сработали из-за отсутствия гибридизации. Эти слайды приготовлены из культивируемых клеточных линий рака мочевого пузыря человека (положительный контроль) и нормальных лимфобластов (отрицательный контроль), и наиболее подходят для эффективности гибридизации. Таким образом, в этих условиях эффективность гибридизации составила 98,8% (324/328) (95% Cl:96,9%, 99,7%), с <2% клеток, не имеющих сигнала от каких-либо других проб. В подгруппе из 6 контрольных слайдов, проанализированных с использованием автоматизированной станции предварительной обработки (VP 2000 Процессор) и автоматизированные процедуры анализа UroVysion (HYBrite), эффективность гибридизации составила 100% (6/6) (95% Cl: 54,1%, 100%).

В исследовании воспроизводимости, проведенном с использованием ручной предварительной обработки и ручной процедуры анализа UroVysion на подготовленных образцах из клеточных линий рака мочевого пузыря человека, 76 из 80 образцов с первой попытки дали информативные результаты. Из 4 неинформативных 3 образца были неинформативными из-за отсутствия гибридизации. Следовательно, эффективность гибридизации составила 96,2% (76/79) (95% Cl: 89,3%, 99,2%), исходя из следующего определения:

% Эффективности гибридизации=
100-[ошибки гибридизации/(информативные результаты +ошибки гибридизации)]×100

В исследовании на специфичность, проведенном с использованием ручной предварительной обработки и ручной процедуры анализа UroVysion на образцах мочи от пациентов без диагноза рак мочевого пузыря в анамнезе, 230 из 309 образцов дали информативные результаты с первой попытки и 18 неинформативных результаты были обусловлены отсутствием гибридизации, что привело к эффективности гибридизации 93% (230/248) (95% Cl: 88,8%, 95,6%), исходя из определения выше. Остальные неинформативные анализы были результатом низкого качества образца (например, недостаточное количество клеток) или технической ошибка (например, масло под покровным стеклом). Повторные анализы были проведены на 67 образцах; 12 из 79 образцов с неинформативными первоначальными результатами имели недостаточный объем, поэтому пришлось еще раз повторить анализ. Из 67 повторных анализов 45 дали информативные результаты, оставшиеся 34 экземпляра были классифицированы как «неинформативные» (включая 12 случаев с недостаточным объемом для повторного анализа). Таким образом, 89% (275/309) (95% Cl: 85,0%, 92,3%) случаев дали информативный результат с первой или второй попытки.

Аналогично, в клиническом исследовании, проводимом с использованием ручной предварительной обработки и ручной процедуры анализа UroVysion на образцах мочи у пациентов с раком мочевого пузыря, в анамнезе у 175 из 251 образцов информативные результаты были получены с первой попытки и 26 из 76 неинформативных результатов были получены из-за отсутствия гибридизации. Эффективность гибридизации среди этих образцов составила 87,1% (175/201) (95%CI: 81,6%, 91,4%), на основании приведенного выше определения. Остальные неинформативные анализы были результатом низкого качества образцов (например, недостаточное количество клеток) или техническая ошибка (например, разбитый слайд).

Повторные анализы проводились вручную на 70 образцах; 6 из 76 образцов имели недостаточный объем, чтобы повторить анализ. Из 70 повторных анализов 59 дали информативные результаты, оставив 17 образцов, классифицированных как «неинформативные» (включая 6 случаев с недостаточным объемом для повторного анализа). В итоге 93,2% (234/251) (95% Cl: 89,4%, 96,0%) случаев дали информативный результат с первая или вторая попытка.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В клиническом исследовании, проведенном с использованием автоматизированного анализа UroVysion на образцах мочи у симптоматических пациентов с раком мочевого пузыря, 521 из 570 образцов (497 допущенных пациентов плюс 73 уже наблюдаемых) дали информативный результат с первой попытки и 5 из 49 дали неинформативный результат из-за отсутствия гибридизации. Эффективность гибридизации среди этих образцов составила 99,0% (521/526) (95% Cl: 97,8%, 99,7%), исходя из определения, описанного выше. Оставшиеся неинформативные исследования были результатом недостаточного количества образца (например, недостаточное количество клеток) или техническая ошибка (например, разбитый слайд или QC не сработали слайды [Контроля Качества].
В подгруппе из 44 образцов для который использовалась процедура автоматизированной предварительной обработки, эффективность гибридизации составила 96,7% (29/30) (95% Cl: 82,8%, 99,9%).
Повторные анализы были проведены на 43 образцах; 6 из 49 экземпляров имели недостаточный объем, чтобы повторить анализ. Из 43 повторных анализов, 26 анализов дали информативные результаты, 23 экземпляра были классифицированы как «неинформативный» (включая 6 случаев с недостаточным объемом для повторения анализа). Таким образом, 96,0% (547/570) (95% Cl: 94,0%, 97 случаев дали информативный результат с первой или второй попытки.
Подводя итог, при всех этих условиях, которые моделируются в обычной клинической практике, эффективность гибридизации оказалась≥87%. Исследования показали также, что эффективность гибридизации между образцами, которые обрабатываются с использованием ручных и автоматизированных процедур были эквивалентны.

Аналитическая специфичность
Исследования специфичности локуса проводились с метафазными пластинками в соответствии со стандартными протоколами Abbott Molecular QC. В общей сложности были исследованы 42 метафазные пластинки последовательно путем связывания с DAPI для идентификации хромосом 3, 7 и 17 и локуса 9p21, затем с UroVysion. Не наблюдалось перекрестной гибридизации с другими локусами хромосом в любой из 42 исследованных клеток; гибридизация была ограничена в направлении к таргетным регионам 4 проб.

Интерференция
Три порции мочи (1 мужская, 1 женская, 1 смешанный мужская/женская) от здоровых доноров были оценены на вещества, перечисленные в **Таблица 2** и проанализирована с помощью UroVysion Kit для проверки на возможный токсикологический анализ. Повторные образцы для каждого пула мочи были оценены на каждое вещество (т.е. 6 образцов на каждое испытуемое вещество); 25 последовательных
клеток были подсчитаны для каждого образца. Не были обнаружены никакие вмешательства от любого из протестированных веществ; Результаты от всех образцов были отрицательными (т.е. <4 аномальных клетки, как определено в инструкции). Самые высокие концентрации, протестированные для каждого вещества, приведены в **Таблице 2.** Обратите внимание, что проведение этого исследования на образцах мочи у пациентов с раком мочевого пузыря не было возможно из-за объема, необходимого для получения достаточного количества клеток для репликации образца при определенных условиях. Отсюда и воздействие на образцы, содержащие морфологически аномальные клетки не было оценено.

Таблица 2.

Вещество	**Наибольшая тестируемая концентрация**
Возможные составляющие мочи	
Альбумин	1,0 г/дЛ
Аскорбиновая кислота	5 г/дЛ
Билирубин (несвязанный)	2 мг/мл
Гемоглобин	100 мг/мл
Иммуноглобулин G	10 мг/ дЛ
Красные клетки крови	1×10^6 клеток/мл
Белые клетки крови	1×10^6 клеток/мл
Хлорид натрия	730 мг/дЛ
Мочевая кислота	250 мг/дЛ
Кофеин	117 мг/дЛ
Этанол	1%
Никотин	28 мг/дЛ
Возможная контаминация микроорганизмами	
Candida albicans	$2,5\times10^{10}$ КОЕ/мл
Escherichia coli	$2,5\times10^{10}$ КОЕ/мл
Pseudomonas aerugenosa	$2,5\times10^{12}$ КОЕ/мл
Терапевтические агенты	
Ацетоминофен	5,2 г/дЛ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ацетилсалициловая кислота	5,2 г/дЛ
Ампициллин	600 мг/дЛ
БСЖ	20 мг/дЛ
Доксорубицин-HCl	10 мг/дЛ
Митомицин-HCl	10 мг/дЛ
Нитрофурантоин	50 мг/дЛ
Феназопиридин-HCl	200 мг/дЛ
Тиотепа	10 мг/дЛ
Триметоприн	50 мг/дЛ
Консерванты	
Карбовакс	2% Карбовакс/50% раствор этанола (33 мл мочи с 17 мл консерванта)
UroCor, Inc. фиксатор	50/50 с мочой
CytoRichRed (Autocyte)	50/50 с мочой
Saccamono's раствор	50/50 с мочой
PreservCyt раствор (Cytyc)	50/50 с мочой
100% Этанол	50/50 с мочой

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Воспроизводимость образцов пациентов

Проведение исследований воспроизводимости образцов мочи у пациентов с раком мочевого пузыря были невозможны; т.к. клеточный осадок от одного пациента не содержит достаточное количество клеток, необходимое для повторения исследования между разными наблюдателями. Поэтому не оценивалась воспроизводимость результатов по морфологически аномальным клеткам. Отсутствуют сравнения мер воспроизводимости, объемы результатов вариации, представленных образцом, не известны ошибки манипуляции, окрашивания и подсчета. Статистика для небольшого количества событий подразумевает существенный коэффициент вариации для образцов с аномальным количеством клеток, близким к 4-клеточным и 12-клеточным точкам отсечения, описанным в **Интерпретации Результатов.**

Воспроизводимость образцов клеточной культуры рака мочевого пузыря

Чтобы оценки воспроизводимость теста UroVysion, анализировалось распределение сигналов для CEP 3, CEP 7, CEP 17 и LSI 9p21 и оценивалось на предмет воспроизводимости между участками (4) на слайдах, подготовленных из 4 различных клеточных линии рака мочевого пузыря. Четыре образца подготовлены из линий клеток карциномы мочевого пузыря человека с нормальным (1 образец) и абнормальным (3 образца) распределением сигналов и оценены для CEP 3, CEP 7, CEP 17 и LSI 9p21 в соответствии с инструкциями для анализа контроля качества слайдов внутри упаковки (см. Интерпретация результатов: анализ слайдов контроля качества). Каждый участок одного и того же образца был проанализирован 4 раза в каждый из 4 дней исследования (каждый день разные образцы), используя одну пробную партию для всех образцов. В каждый день анализа добавляли дополнительный образец «подстановочный знак» для устранения смещения и не включали его в анализ данных. Каждый образец оценивал 1 наблюдатель на каждом участке. Информативные результаты были получены в 95,0% (76/80) образцов с первой попытки. Гибридизация всех сменных слайдов прошла успешно.

Среднее значение, стандартное отклонение и процент CV от среднего числа сигналов для 4 зондов приведены в **Таблице 3**. Как показано в этой таблице, среднее количество сигналов для каждого зонда варьируется в узком диапазоне. Отсутствие сигналов LSI 9p21 в образце 2 вызывает большой % CV для этой пробы, но образец легко классифицируется как имеющий потерю локус 9p21; в 95% наблюдений на этом образце (19/20) среднее количество сигналов LSI 9p21 было <0,2. В данном исследовании на образцах клеточных линий карциномы рака мочевого пузыря не было выявлено ложно отрицательных результатов; все обследованные образцы (48/48) 2, 3 и 4 (16 каждый) были бы классифицированы как положительные по определению≥4 клеток с увеличенным количеством хромосом (3 или более сигналов для 2 или более CEP 3, CEP 7 или CEP 17) или ≥12 клеток с потерей гомозиготности 9p21 (0 сигналов LSI 9p21). Из 16 обследованных нормальных образцов, 1 был классифицирован как положительный, используя вышеуказанное определение; этот случай показал 6 клеток с увеличением количества хромосом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 3. Воспроизводимость между сайтами					
		Номер сигнала			
Образец	**Статистика**	**CEP 3**	**CEP 7**	**CEP 17**	**LSI 9p21**
1.	Значение	2.21	2.12	2.14	2.19
	S.D.	0.15	0.12	0.12	0.21
	C.V. (%)	6.79%	5.52%	5.66%	9.66%
	Диапазон	2.08-2.68	1.92-2.40	1.96-2.52	2.00-2.92
	n	16	16	16	16
2.	Значение	3.95	4.31	3.42	0.03
	S.D.	0.10	0.25	0.16	0.07
	C.V. (%)	2.49%	5.76%	4.76%	220.44%
	Диапазон	3.84-4.16	3.76-4.84	3.16-3.72	0.00-0.24
	n	16	16	16	16
3.	Значение	4.28	3.55	3.42	3.86
	S.D.	0.32	0.34	0.25	0.47
	C.V. (%)	7.58%	9.47%	7.21%	12.14%
	Диапазон	3.88-5.04	3.12-4.24	3.04-3.96	3.16-4.72
	n	16	16	16	16
4.	Значение	3.18	3.88	3.84	3.85
	S.D.	0.15	0.10	0.10	0.15
	C.V. (%)	4.63%	2.45%	2.70%	3.90%
	Диапазон	2.96-3.52	3.64-4.04	3.64-4.12	3.56-4.24
	n	16	16	16	16

Клинические исследования

Рецидив рака мочевого пузыря: эффективность в сравнении со стандартом лечения

Обзор исследования

Многоцентровое проспективное исследование было проведено в 21 месте в течении 17 месяцев для дальнейшего определения характеристик производительности набора UroVysion относительно цистоскопии с последующей гистологией, стандартной медицинской помощью для мониторинга рецидива заболевания у пациентов, у которых ранее был диагностирован рак мочевого пузыря. Сравнительный анализ, используемый для всех расчетов это цистоскопия с гистологическим подтверждением для положительных или подозрительных цистоскопий. Если у пациента была положительная цистоскопия, но гистология отсутствовала (например, очаг поражения), тогда образец считался положительным по раку мочевого пузыря. Если после теста была подозрительная цистоскопия, но гистология отсутствовала, в последующем случай исключался из анализа. В общем, 309 пациентам было проведено исследование в 21 сайте, что привело к 251 служебному визиту в лабораторию. В 58 нежелательных визитов включено 17, которые не соответствовали критериям приемлемости, 16 с недостаточным объемом мочи, 10 с подозрительной цистоскопией, но без гистологии, а в 15 случаях моча не была отправлена в испытательные лаборатории.

Все образцы были законсервированы в Carbowax. Обработка мочи и анализ проводился в 1 лаборатории централизованного тестирования. Руководство для процедуры предварительной обработки и ручного анализа UroVysion были использованы для всех образцов. Анализ на UroVysion и анализ на 251 участвующих в исследовании при посещении лаборатории, привели к 234 информативным результатам, представленными 176 уникальными пациентами. Для пациентов, у которых был выявлен рецидив во время исследований (как было выявлено цистоскопией/гистологией), был использован первый положительное визит (т.е. визит, при котором был установлен диагноз рецидива). Для безрецидивных пациентов, последний отрицательный визит был использован для пациентов с более чем 1 посещением. Демография для 176 уникальных пациентов представлена в **Таблице 4.**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 4. Демографическое исследование пациентов с рецидивом рака мочевого пузыря	
Пол	
Мужской	132
Женский	44
Раса	
Кавказцы	153
Афроамериканцы	3
Латиноамериканцы	3
Другие	13
Неизвестные	4
Возраст	
Диапазон	36-98
Средний возраст	71 год

Производительность против Стандарта обслуживания

Из отвечающих критериям пациентов с информативными результатами UroVysion 62 образца были положительными при проведении цистоскопии/гистологии. Распределение количества опухолей по стадии и оценкам приведены в **Таблице 5.**

Таблица 5. Номер опухоли, стадия Grade у пациентов с рецидивом рака мочевого пузыря						
Степень распространенности опухолевого процесса						
Стадия опухолевого процесса	**ND**	**1**	**2**	**3**	**Неизвестно**	**Общее количество**
ND	11	0	0	0	0	11
T_a	0	20	6	6	0	32
T_1	0	0	2	3	1	6
T_2	0	0	0	2	1	3
T_{is}	0	0	0	7	0	7
Неизвестно	0	2	1	0	0	3
Общее количество	11	22	9	18	2	62

ND= не установлено или не было биопсии

Таблица 6 показывает производительность теста UroVysion, относительно цистоскопии/гистологии, в зависимости от стадии и степени опухолевого процесса для всех случаев с доступной информацией по биопсии. Набор UroVysion показал наибольшую клиническую чувствительность (100%) среди самых серьезных опухолей (T2 и Tis), когда его сравнили с цистоскопией/гистологией.

Таблица 6. Сравнение теста UroVysion против цистоскопии/гистологии для выявления рецидива рака мочевого пузыря на стадии опухолевого процесса	
Клиническая чувствительность (%)	
Стадия	
Все	**36/48 (75%)**
Ta, Grade 1	**11/20 (55%)**
Ta, Grade	
2,3	10/12 (83.3%)
T_1	5/6 (83.3%)
T_2	3/3 (100%)
T_{is}	7/7 (100%)
Степень распространённости опухолевого процесса	
Все	36/49 (73.5%)
1	12/22 (54.5%)
2	7/9 (77.8%)
3	17/18 (94.4%)

[a] Биопсия не была выполнена в 11 случаях. Кроме того, ни одного этапа не было назначено в 3 случаях и не оценивался Grade в 2 случаях.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 7 Таблица 7 показывает сравнение производительности к UroVysion относительно цистоскопии с последующей гистологией. В целом, анализ FISH с набором UroVysion продемонстрировал клиническую чувствительность 71,0% и клиническая специфичность 65,8% по сравнению с результатами цистоскопии, с последующей гистологией в случаях положительной или подозрительной цистоскопии
Примечание: Положительная цистоскопия без биопсии считалась положительный в этом анализе.

Таблица 7. Сравнение теста UroVysion с цистоскопией/гистологией для выявления рецидива рака мочевого пузыря				
		Цитология/Гистология		
UroVysion		+	-	Общее
	+	44	39	83
	-	18	75	93
	Общее кол-во	62	114	176

Клиническая чувствительность = 71.0% (44/62) (95% Cl =58.1%-81.8%)
Клиническая специфичность = 65.8% (75/114) (95% Cl = 56.3% - 74.4%)
Точность = 67.6% (119/176) (95% Cl=60.2% - 74.5%)
(+) Прогнозное значение = 53,0% (44/83) (95% ДИ = 41,7% - 64,1%)
(-) Прогнозное значение = 80,6% (75/93) (95% ДИ = 71,1% - 88,1%)
Распространенность = 35,2% (62/176) (95% ДИ = 28,2% - 42,8%
Положительные и отрицательные прогностические значения теста UroVysion могут быть определенным для показателей распространенности 10%, 20% и 30%; эти значения представлены в таблице 8. Эта экстраполяция предполагала клиническую чувствительность 71,0% и клиническую специфичность 65,8% **(Таблица 7).**

Таблица 8. Гипотетический Позитивные Предсказательные и Негативные Предсказательные значения теста UroVysion		
Распространённость рецидива рака мочевого пузыря	**PPV**	**NPV**
10%	18.7%	95.3%
20%	34.2%	90.1%
30%	47.1%	84.1%

Таблица 9 показывает сравнение производительности теста UroVysion относительно цистоскопии/гистологии у пациентов, которые получали свое последниее лечение внутрипузырной БЦЖ в течение 3 месяцев после проведение теста на UroVysion. Средняя продолжительность лечения БЦЖ составила 1,3 месяца (диапазон 0,4 до 3,4 месяца). Среднее время между последним лечением БЦЖ и тестированием на UroVysion среди этих пациентов составило 1,3 месяца; диапазон был 0 (лечение продолжается во время тестирования UroVysion) до 3 месяцев. Три из 12 истинно положительных случаев были Tis, 3 были стадией Ta степени 1, 3- 3-я ступень Ta, 2-3-я ступень T1, 1-я ступень T2 класс 3 (мышечно-инвазивный); 1 ложноотрицательный случай был этапом Ta класс 1.

Таблица 9 Сравнение теста UroVysion против цистоскопии/гистологии для выявления рецидива рака мочевого пузыря у пациентов, получающих терапию БСЖ в течении трех месяцев				
		Цитология/Гистология		
UroVysion		+	-	Общее
	+	12	10	22
	-	1	16	17
	Общее кол-во	13	26	39

Клиническая чувствительность = 92,3% (95% ДИ = 64,0%-99,8%)
Клиническая специфичность = 61,5% (95% ДИ = 40,6%-79,8%)
Точность=71,8% (95% ДИ=55,1%-85,0%)
(+) Прогнозное значение = 54,5% (95% ДИ=32,2%-75,6%)
(-) Прогнозное значение=94,1% (95% ДИ=71,3%- 99,9%)
Распространенность=33,3% (95% ДИ=19,1% - 50,2%

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Длительные исследования

В качестве продолжения проспективного исследования описанного выше, информация о посещении центра (без тестирования UroVysion или BTAstat) была впоследствии собрана для пациентов без рецидива заболевания (т.е. цистоскопия/гистология отрицательная) в течение периода приблизительно 1 года с их последнего визита во время основного этапа медицинских исследований. Из 114 имеющих право Пациенты, информация о посещении центра была собрана у 105. Всего сообщалось о 335 посещениях пациентов, в результате чего было получено 299 посещений в центре, представляющих 104 уникальных пациентов.

Из 36 непригодных для визита посещений вошли 21, которые не соответствовали критериям приемлемости и 15 с подозрительными цитоскопиями, но без гистологии. Для пациентов с рецидивом заболевания (как определено цитоскопией/гистологией) был использован первый положительный визит. Для пациентов без рецидива, был использован последний отрицательный визит для тех, которые посещали центр более одного раза.

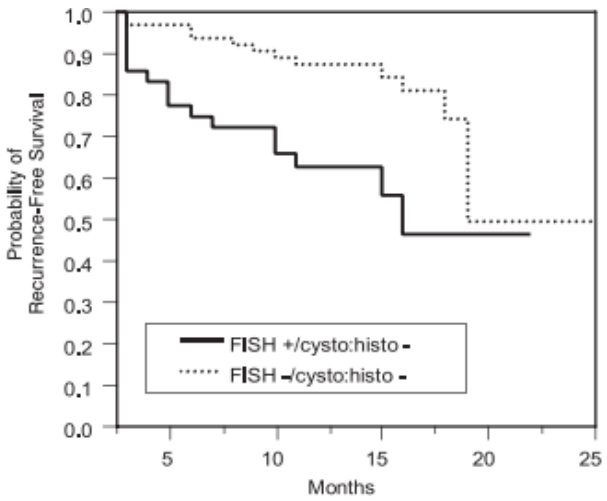
Результаты показали рецидив у большого процента пациентов с положительным тестом UroVysion, отрицательные по цистоскопии/гистологии, с отрицательным тестом Urovysion, отрицательная группа по цистоскопии/гистологии. Результаты представлены в **Таблице 10.**

Таблица 10. Результаты многолетних исследований

	UroVysion- /цито:гисто-	UroVysion+ /цито:гисто-
% Рецидивов	19.12% (13/68)	41.67% (15/36)
Время наблюдения (месяцы)		
Без рецидива	14.3±3.9	13.5±3.4
Рецидив заболевания	11.0±5.8	6.9±4.4
Детали рецидива заболевания[a] **Стадия**		
T_a G1	5	3
T_a G2,3	0	1
T_1	2	0
T_{is}	0	1
Степень распространённости опухолевого процесса		
1	5	5
2	1	1
3	1	1

[a]Биопсия не была выполнена в 8 случаях (4 UroVysion+/цито: гисто-,4 UroVysion-/цито:гисто-). Слайды не были предоставлены в местах сбора для оценки главным патологом в 6 случаях (4 UroVysion + /цито: гисто-, 2 уроВизион-/цито: гисто-). Никакой этап не был назначен в 2 случаях UroVysion + /cysto:гисто-.

Таблица 10. Безрецидивная выживаемость для пациентов с UroVysion-/cysto: histo - против UroVysion +/цито: гисто – Группы



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Специфичность

Резюме исследования

В дополнение к тесту UroVysion установлены клинические особенности 65,8% в исследовании рецидива рака мочевого пузыря и 77,7% установлены в результате исследование гематурии, проспективное исследование было проведено для того, чтобы установить специфичность теста UroVysion у здоровых людей и урологических пациентов без предшествующего анамнеза или клинических признаков рака мочевого пузыря. В общей сложности 315 визитов пациентов было проведено в связи с этими пробными исследованиями, в результате которых было 309 визитов в лабораторию, 6 непригодных визитов включали 1, что не соответствовало критериям приемлемости исследования, 4 с недостаточным объемом мочи, а в 1 случае моча не была отправлена в испытательную лабораторию. Все образцы были сохранены в Carbowax. Ручная предварительная обработка и ручные процедуры анализа UroVysion были использованы для всех образцов.

Поскольку состояние здоровья нескольких пациентов попало в несколько категорий, 275 образцов от пациентов, дающих информативные результаты, представляли 357 частных значения. Популяция пациентов суммирована по категориям и представлена в **Таблице 11.**

Таблица 11. Популяция пациентов	
Условия	**№ Номер пациента**
Здоровые доноры	59
Некурящие	50
Курящие	9
Доброкачественные заболевания	48
Non-GU Рак	3
GU Заболевания	184
Доброкачественная гиперплазия предстательной железы	58
Микрогематурия	
Интерстициальный цистит	11
Воспаление/Инфекция: Другие	17
STD	2
Другие	81
GU Рак (не мочевого пузыря)	61
Рак предстательной железы	58
Рак почки	3
GU Травма	2
Общее число**:**	**357**

Специфичность

Общая специфичность теста UroVysion у здоровых людей и урологических пациентов без предшествующего анамнеза или клинических проявлений рака мочевого пузыря составила 93,0% (332/357). Краткое изложение общей специфики и специфичность по категориям показана в **Таблице 12.** Для ликвидации потенциального отклонения, включающего несколько данных для любого конкретного пациента, специфичность была также рассчитана как «уникальные случаи», где каждый пациент был подсчитан только один раз, независимо от количества присутствующих медицинских условий. Специфичность среди уникальных случаев составила 94,5% (260/275, **Таблица 12**).

Таблица 12. Резюме: Специфичность теста Urovysion	
Общая Специфичность	93.0% (332/357)
Особые пациенты	94.5% (260/275)
Здоровые Больные	
Здоровые	100% (59/59)
Больные	94.7% (234/247)
Курящие Некурящие	
Курящие	95.2%
Некурящие	94.7% (234/247)
Индивидуальные категории[b]	
Здоровые доноры	100% (59/59)
Здоровые некурящие	100% (50/50)
Здоровые курящие	100% (9/9)
Доброкачественные заболевания	91.7% (44/48)
Non-GU Рак[c]	66.7% (2/3)
GU Заболевания	91.9% (169/184)
Доброкачественная гиперплазия предстательной железы	91.4% (53/58)
Микрогематурия	86.7% (13/15)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Интерстициальный цистит	90.7% (10/11)
Воспаление/Инфекция: Другие	100% (17/17)
STD	100% (2/2)
Другие	91.4% (74/81)
GU Рак (не мочевого пузыря)	91.8% (56/61)
Проста	91.4% (53/58)
Рак почки	100% (3/3)
GU Травма	100% (2/2)

[a] Статус курения был не известен у одного пациента

[b] У некоторых нездоровых пациентов было несколько категорий заболеваний, в результате общее количество> 275 для отдельных категории болезней.

[c] Non-GU рак включает рак молочной железы (1), рак кишечника (1), и лейкимия (1).

Основываясь на популяции пациентов в этом исследовании, и проведение теста UroVysion для них, когда используем ручную предварительную обработку и ручной анализ для теста UroVysion, продемонстрирована общую специфичность 93,0% (332/357), со 100% специфичностью (59/59) среди здоровых субъектов. Специфичность среди уникальных случаев была 94,5% (260/275). Ложноположительные результаты выявлены у 15 пациентов, представлены следующие категории (обратите внимание, что у некоторых пациентов были проблемы со здоровьем, попадающие в несколько категорий заболеваний); не мочеполовые (ГУ) доброкачественные заболевания (4), рак без ГУ (1), заболевания ГУ (15) и рак ГУ (5). Эти результаты показывают, что тест очень специфичен для этой группы пациентов и что зонды UroVysion связываются только с предполагаемыми хромосомами.

Симптоматические пациенты: Эффективность в сравнении со стандартами ухода.

Резюме исследования

Многоцентровое проспективное исследование было проведено, чтобы определить характеристики производительности теста UroVysion относительно цистоскопии с последующей гистологией, стандартом лечения, диагностикой рака мочевого пузыря у пациентов с гематурией. Для всех расчетов использовалась сравнительная справка: цистоскопия с гистологическим подтверждением положительных или подозрительных цистоскопий. Всего 629 посещений пациентов были согласованы в 23 местах исследования, в результате чего было отобрано 497 подходящих пациентов. Среди 132 неподходящих пациентов: 74, которые не соответствовали критериям приемлемости; 12 с недостаточным объемом мочи; 14, у которых моча была неправильно отправлена в испытательные лаборатории; 12 кто изначально согласился, но затем отказался приезжать для предоставления образцов мочи; 18 чьи образцы были собраны после окончания исследования, или чья моча не была отправлена в испытательную лабораторию; и 2, которые сообщили, что согласие на процедуру не было должным образом задокументировано. Обработка и анализ мочи были проведены в 3 централизованных испытательных лабораториях. Все образцы были сохранены в PreservCyt. Две из 3 лабораторий использовали ручной метод предварительной обработки; 1 лаборатория использовала автоматизированную процедуру предварительной обработки. Все анализы UroVysion были проведены с использованием автоматизированной (HYBrite) процедуры. Демография 497 подходящих пациентов сведены в **Таблицу 13.**

Таблица 13. Демография пациентов
Изучение симптоматических пациентов

Пол	
Мужской	298
Женский	199
Раса	
Кавказцы	440
Афроамериканцы	26
Испанцы	15
Азиаты	4
Другие/Не установлены	12
Возраст	
Диапазон	63.1 года
Средний возраст	40-97 лет

Производительность против Качества обслуживания

Тест UroVysion и анализ на 497 пациентах привели к 479 информативным результатам. Из 479 первоначальных исследований с информативными результатами; 6 пациентов имели неинформативные результаты цитологии и, согласно протоколу, не были включены в анализ, оставив 473 пациента в основном наборе данных. Из 473 подходящих пациентов в основном наборе данных, 50 были с положительным результатом на рак мочевого пузыря по данным цистоскопии/гистологии и 1 с раком мочеточника. Разбивка количества опухолей по стадиям и классам показана в **Таблице 14.**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 14. Номер опухоли, стадия опухолевого процесса Grade у симптоматических пациентов					
	Степень распространенности опухолевого процесса				
Стадия опухолевого процесса	**1**	**2**	**3**	**Неизвестно**	**Общее количество**
T_a	21	6	4	0	31
T_1	0	3	3	1[c]	7
T_2	0	1	8	1[c]	10
T_{is}	0	0	1[a]	0	1
Неизвестно	0	0	1	1[b]	2
Общее количество	21	10	17	3	51

[a]**ПРИМЕЧАНИЕ: Противоречивый анализ как местного патолога и альтернативного патолога из центральной лаборатории показал отсутствие рака.**

[b]Один случай, чье первоначальное цистоскопическое исследование было отрицательным, но который был впоследствии диагностирован как рак мочеточника в течение 6 месяцев от первоначального визита.

[c]Аденокарциномы

Таблица 15 Показывает производительность теста UroVysion, относительно цистоскопии/гистологии, по стадии и степени распространённости опухолевого процесса для всех положительных случаев.

Таблица 15. Сравнение теста UroVysion против цистоскопии/гистологии для выявления рецидива рака мочевого пузыря по стадии и распространённости опухолевого процесса		
	UroVysion	**Цитология**
Стадия		
TaG1	48% (10/21)	24% (5/21)
TaG2	83% (5/6)	50% (3/6)
TaG3	100% (4/4)	50% (2/4)
T_1	86% (6/7)	43% (3/7)
T_2	90% (9/10)	60% (6/10)
T_{is}	0% (0/1)[b]	0% (0/1)[b]
Неизвестно[a]	50% (1/2)	50% (1/2)
Степень распространённости		
1	48% (10/21)	24% (5/21)
2	70% (7/10)	30% (3/10)
3	88% (15/17)	53% (9/17)
Неизвестно[a,c]	100% (3/3)	100% (3/3)

[a] 1 случай с неизвестной стадией (G 3); 1 случай–рак мочеточника с неизвестной стадией и степенью распространённости опухолевого процесса

[b] Примечание: Противоречивый анализ как местного патолога и альтернативного патолога из центральной лаборатории показал отсутствие рака.

[c] Включено две аденокарциномы (1 стадия T1, 1 стадия T2) с неизвестной стадией.

Таблица 16 Показывает сравнение производительности теста UroVysion относительно цистоскопии с последующей гистологией. В целом, анализ FISH набором UroVysion продемонстрировал клиническую чувствительность 68,6% и клиническую специфичность 77,7% по сравнению с результатами цистоскопии, с последующей гистологией в случае положительной или подозрительной цистоскопии.

Таблица 16 Сравнение теста UroVysion против цистоскопии/гистологии для выявления рака мочевого пузыря: включены случаи аденокарциномы				
		Цитология/Гистология		
UroVysion		+	-	Общее
	+	35	94[b]	129
	-	16	328	344
	Общее кол-во	51[a]	422	473

[a] включает один случай рака мочеточника

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

[b] Включает 3 пациентов с диагнозом опухоль мочевого тракта в течении 6 месяцев от их визита
Клиническая чувствительность = 68,6% (35/51) (95% ДИ = 54,1%-80,9%)
Клиническая специфичность = 77,7% (328/422) (95% ДИ = 73,4%-81,6%)
Точность = 76,7% (363/473) (95% ДИ=72,7%-80,5%)
(+) Прогнозное значение = 27,1% (35/129) (95% ДИ=19,7%-35,7%)
(-) Прогнозное значение = 95,3% (328/344) (95% ДИ=92,6%-97,3%)
Распространенность = 10,8% (51/473) (95% ДИ=8,1%-13,9%

Таким образом, отрицательный результат не исключает всех случаев рака мочевого пузыря. Также отрицательный результат UroVysion не означает, что человек никогда не заболеет раком мочевого пузыря.

Кроме того, у 3 пациентов, у которых начальная цистоскопия мочевого пузыря была отрицательной, впоследствии были диагностированы опухоли мочевыводящих путей (pTaG3 переходно-клеточный рак почечной лоханки; G3 инвазивный папиллярный уротелиальный рак мочеточника плюс Tis мочеточника; аденокарцинома левой почки) в течение 6 месяцев после первоначального ознакомительного визита. Все 3 случая были положительными по UroVysion; 1 из 3 был положительным по цитологии.

Положительный UroVysion приводит к отсутствию других признаков или симптомов рецидива рака мочевого пузыря и может быть свидетельством раковых заболеваний мочевыводящих путей, связанные, например, с раком мочеточника, мочеиспускательного канала, почки и/или простаты у мужчин, и дальнейшее наблюдение за пациентом оправдано.

Положительные и отрицательные прогностические значения теста UroVysion могут быть определены для показателей распространенности 1%, 3% и 10,5%; эти значения представлены в **Таблице 17**. Эта экстраполяция предполагала клиническую чувствительность 68,6% и клиническую специфичность 77,7% (**Таблица 16**).

Таблица 17. Гипотетический Позитивные Предсказательные и Негативные Предсказательные значения теста UroVysion

Распространённость рака мочевого пузыря	**PPV**	**NPV**
1.0%	3.1%	99.6%
3.0%	8.9%	98.9%
10.5%	27.0%	95.5%

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

1. National Comprehensive Cancer Network, Inc. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Bladder Cancer. Version 2.2011. 2011. NCCN Web site. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/bladder.pdf. Accessed April 4, 2011.
2. Gibas Z, Gibas L. Cytogenetics of bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997; 95:108-115.
3. Raghavan D, Shipley WU, Garnick MB, et al. Biology and management of bladder cancer. *N Engl J Med*. 1990; 322(16):11291138.
4. Fair WR, Fuks ZY, Scher HI. Cancer: Principles & Practice of Oncology, 4th ed. (ed. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA). J.B. Lippincott Co., Philadelphia, PA. 1993:1052-1072.
5. Grossfeld GD, Wolf JS, Litwin MS, et al. Asymptomatic Microscopic Hematuria in Adults: summary of AUA best practice policy recommendations. *Am Fam Phys*. 2001; 63(6):1145-1154.
6. Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, et al. Molecular detection of primary cancer by microsatellite analysis. *Science*. 1996; 271:659-662.
7. Sarosdy MF, deVere White RW, Soloway MS, et al. Results of a multicenter trial using BTA Test to monitor for and diagnose recurrent bladder cancer. *J Urol*. 1995; 154:379-384.
8. Waldman FM, Carroll PR, Kerschmann R, et al. Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer. *Cancer Res*. 1991;51: 3807-3813.
9. Smeets AWGB, Schapers R, Hompan AHN, et al. Concordance between karyotyping and in situ hybridization procedures in the detection of monosomy 9 bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993; 71:97-99.
10. Sauter G, Moch H, Wagner U, et al. Y chromosome loss detected by FISH in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995; 82:163-169.
11. Matsuyama H, Bergerheim USR, Nilsson I, et al. Nonrandom numerical aberrations of chromosomes 7, 9, and 10 in DNA-diploid bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 1994; 77:118-124.
12. Hopman AHN, Moesker O, Smeets AWGB, et al. Numerical chromosome 1, 7, 9, and 11 aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization. *Cancer Res*. 1991 ;51:644-651.
13. Cajulis RS, Haines GK, Frias-Hidvegi D, et al. Cytology, flow cytometry, image analysis and interphase cytogenetics by fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of transitional cell carcinoma in bladder washes: a comparative study. *Diagnostic Cytopathology*. 1995; 13(3):214-224.
14. Meloni AM, Peier AM, Haddad FS, et al. A new approach in the diagnosis and follow-up of bladder cancer: FISH analysis of urine, bladder washings, and tumors. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993; 71:105-118.
15. Meloni AM, Peier AM, Kingsley KL, et al. FISH studies of urinary cells of patients with bladder cancer. *Urol Oncol*. 1995;1:234-239.
16. Wheeless LL, Reeder JE, Han R, et al. Bladder irrigation specimens assayed by fluorescence in situ hybridization to interphase nuclei. *Cytometry*. 1994; 17:319-326.
17. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, et al. The development of a multitarget multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn*. 2000;2(3):116-123.
18. Halling KC, King W, Sokolova IA, et al. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J Urol*. 2000;164: 1768-1775.
19. Halling KC, King W, Sokolova IA, et al. A comparison of BTAstat, hemoglobin dipstick, telomerase and Vysis UroVysion assays for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Urol*. 2002; 167(5):20012006.
20. Sarosdy, MF, Schellhammer P. Bokinsky G, et al. Clinical Evaluation of a Multi-Target Fluorescent In situ Hybridization Assay for detection of Bladder Cancer. *J Urol*. 2002; 168:1950-1954.
21. Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, et al. Multitarget Fluorescence In situ Hybridization Assay Detects Transitional Cell Carcinoma in the Majority of Patients with Bladder Cancer and Atypical or Negative Urine Cytology. *J. Urol*. 2003; 169:2101-2105.
22. U.S. Centers for Disease Control. Morbidity and Mortality Weekly Review. 1987; 36(suppl. 2S):2S-18S.
23. Riesz, P., G. Lotz, et al. (2007). "Detection of bladder cancer from the urine using fluorescence in situ hybridization technique." *Pathol Oncol Res.* 13(3):187-94.
24. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
25. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
26. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3 (ISBN1-56238-567-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
27. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефонам (1-800-553-7042) (в США) +49-6122-580 (другие регионы) или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

UroVysion и другие ДНК-пробы защищены патентом США. Патенты 5,663,319, 6,376,188, 7,232,655 и 5, 491,224. Vysis LSI, CEP WCP меченые флуорохромами ДНК-пробы защищены патентом США. Патенты RE40, 494, 6,596,479, 7,115,709, 5, 756,696 и 6,475,720 и 6, 607, 877 даны исключительно на продукцию Abbott Molecular Inc Калифорнийским Университетом. Неинвазивные методы скрининга рака мочевого пузыря защищены патентом США 6,573,042.

UroVysion, CEP, LSI, SpectrumRed, SpectrumGreen, SpectrumAqua, SpectrumGold, HYBrite, ProbeChek, VP 2000 и Vysis – торговые марки группы компании Abbott в различных юрисдикциях.
ThinPrep PreservCyt – торговые марки Cytyc Corporation. ThermoBrite – торговая марка Iris Sample Processing, Inc. Все остальные торговые марки собственность их соответствующих владельцев.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines. IL 60018 USA

EC REP
Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2006, 2011, 2012 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

Май, 2016
30-608385/R7

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis RUNX1/RUNX1T1 DF FISH Probe Kit

en

REF 08L70-020

30-608480/R2

Vysis RUNX1/RUNX1T1 DF
FISH Probe Kit
REF 08L70-020
30-608480/R2

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурный режим
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

Назначение

Проба, предназначенная для проведения флуоресцентной гибридизации in situ, зонд **Vysis** RUNX1/RUNX1T1 используется для детекции t(8;21)(q21.3;q22) рицепрокной транслокации, включающей регионы RUNX1/RUNX1T1 генов.

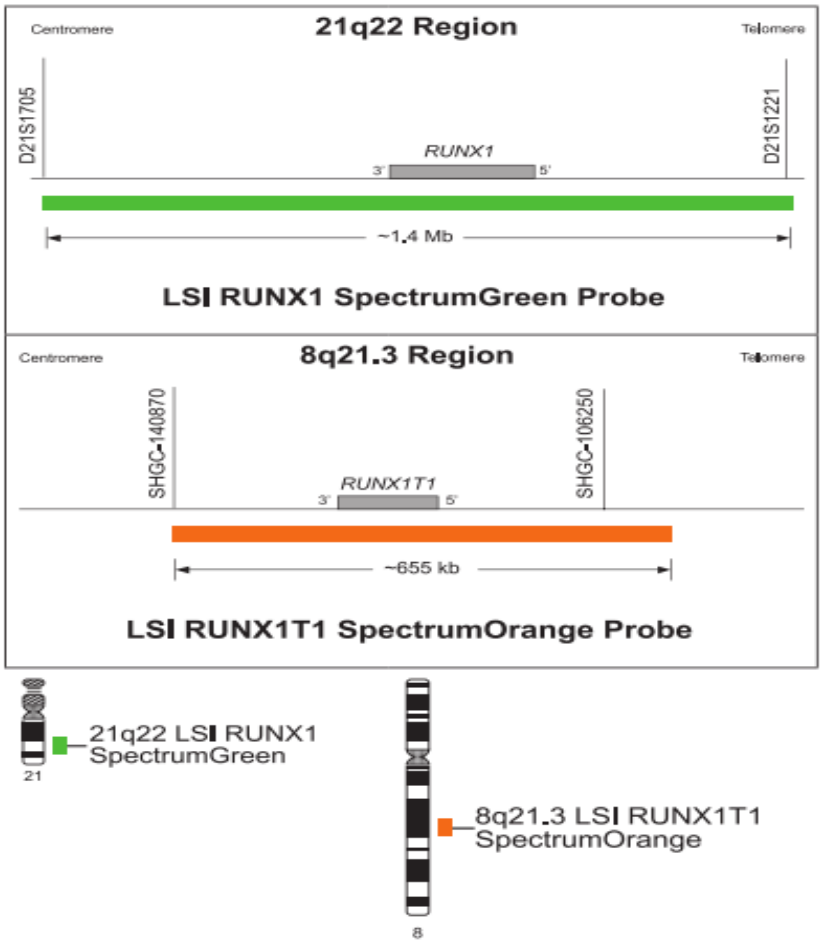
Краткое содержание и назначение теста

Транслокация между хромосомами 8 и 21, (8;21) (q21.3;q22), наблюдается примерно у 8% взрослых пациентов и у 12% детей с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). Пациенты только с транслокацией t (8,21) имеют большую степень риска, чем пациенты с нормальным кариотипом или с другими многочисленными молекулярными изменениями. Vysis LSI RUNX1/RUNX1T1 Dual Color Dual Fusion пробы были использованы в ряде исследований для обнаружения транслокации t (8;21).

Описание зонда

SpectrumGreen проба размером 1.4 Mb охватывает ген RUNX1 (chr21:34452353-35813329; март 2006 года, UCSC Геномный браузер). SpectrumOrange проба охватывает ген RUNX1T1 (chr8:928227265-93482325; Март 2006, UCSC Геномный браузер).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



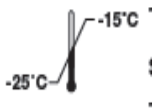
Реагенты

1. Vysis LSI RUNX1/RUNX1T1 двухцветный зонд Dual Fusion (№ 30-191006).

(1 пробирка, 20 мкл на пробирку). 800 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА (Tris-EDTA).

2. Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30-804826) (1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC (pH 7,0).

Хранение



Vysis LSI RUNX1/RUNX1T1 двухцветный зонд должен хранится при температуре -20°C (±5°C), в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Vysis LSI RUNX1/RUNX1T1 двухцветный зонд транспортируется на сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD Медицинские реагенты для диагностики in vitro

Предназначен только для диагностики in vitro.

Vysis LSI RUNX1/RUNX1T1 двухцветный зонд

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Эти реагенты или образцы от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.
Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, не надевайте контактные линзы там, где работаете с этими материалами.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорит натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.
• Обеззараживать и утилизировать все потенциально инфекционные материалы в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP, согласно директивам ЕС, является: токсичным (T) и раздражающим (Xi) веществом. Ниже приведены характеристики риска (R) и безопасности (S):



ОПАСНОСТЬ

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

Паспорта безопасности: важная информация о безопасности, транспортировке и утилизации этих продуктов содержится в паспортах безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (MSDS) для всех предоставленных наборах реагентов доступны по запросу в отделе технического обслуживания Abbott Molecular.

Подготовка реагентов:

ПРИМЕЧАНИЕ: Там, где это необходимо, измерьте pH растворов при комнатной температуре. Используйте pH–метр со стеклянным электродом, если другое не предусмотрено.

20X SSC раствор

Смешайте 132 г 20X SSC и 400 мл очищенной воды. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCl, если это необходимо. Добавьте очищенную воду и доведите объем до 500 мл. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с размером пор 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

2X SSC/0.1% NP-40 Wash Solution
Смешайте 100 мл 20X SSC (pH 5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид/2X SSC)

Смешайте интенсивно 49 мл формамида, 7 мл 20X SSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной воды в сосудах Коплина. Померяйте pH, используя индикаторные полоски, убедитесь, что pH от 7 до 8. Между использованиями, храните от 2°C до 8°C. Утилизируйте по истечении 7 дней.

Растворы этанола (70%, 85%, 100%)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовьте разведения 100% этанола, используя очищенную воду. Между использованиями храните при комнатной температуре. Утилизируйте стоковые растворы по истечению 6 месяцев.

0.4X SSC/0.3% NP-40 Промывочный раствор для быстрой процедуры отмывки
Смешайте интенсивно 20 мл 20X SSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Перемешивайте интенсивно, пока NP-40 полностью не растворится. Померяйте pH и доведите pH до 7.0 до 7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную воду и доведите финальный объем до 1 л. Перемешайте и пропустите через фильтр с объемом пор 0,45 мкм. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте стоковый раствор спустя 6 месяцев после использования или раньше при его помутнении или загрязнении.

Хранение LSI ДНК-зонда. LSI ДНК-зонд должен храниться при температуре -20ºC (±5°C) в защищенном от света месте.

Деградация: Флуорохромы легко распадаются при воздействии света. Для ограничения распада работайте с растворами и слайдами, содержащими флуорохромы в защищенном от света месте. Выполняйте все шаги, во избежания попадания света, такие как отмывка, инкубация, в темноте.
Примечания по выполнению процедуры: Перед использованием, доведите все реагенты до комнатной температуры, отцентрифугируйте каждый флакон с реагентом в течении 2-3 секунд, используя стандартную микроцентрифугу.

Сбор образцов и пробоподготовка для анализа:
Клетки костного мозга культивируются, собираются, фиксируются и помещаются на слайды согласно стандартным цитогенетическим методикам.

Процедура
Необходимые материалы

- Vysis LSI RUNX1/RUNX1T1 двухцветный зонд
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не поставляемые материалы
Лабораторные реагенты:
- 12 N HCl (для регулирования pH рабочих растворов)
- 1 N NaOH (для регулирования pH рабочих растворов)
- Сосуды Коплина
- Калибровочные термометры
- Пинцет
- Градуированные цилиндры (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Наконечники для пипетора (от 1 до 10 мкл)
- Пипетор (от 1 до 10 мкл)
- pH метр
- Чистые предметные стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вортекс
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- Инкубатор на 37°C
- 20X (SSC)
- NP-40
- Формамид, высокоочищенный
- Контркраситель DAPI II
- Горячие слайды

Подготовьте три сосуда Коплина: Налейте 70 мл 100% этанола в первый сосуд; 70 мл 85% этанола в другой, и 70 мл 70% этанола с третий сосуд. Использовать при комнатной температуре. Утилизировать по истечении 7 дней или в случае, если произошло чрезмерное разведение или испарение.
Для получения хороших результатов, убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, описанной в инструкции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Измерьте температуру растворов внутри сосудов Коплина. Используйте калибровочные термометры, которые рекомендованы. При выполнении гибридизации, объединяющей одновременно зонды CEP и LSI, придерживайтесь общей методики LSI для проверки качества реагента.

Подготовка целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Достаньте сосуды Коплина, содержащие растворы для денатурации, в комнатную температуру. Поместите сосуды на водяную баню при температуре 73±1°C приблизительно на 30 минут перед использованием для достижения нужной температуры растворов.

Убедитесь, что температура растворов для денатурации 73±1°C. Для поддержания нужной температуры денатурирующего раствора, погрузите 4 слайда одновременно. Если у Вас менее 4 слайдов, добавьте пустые слайды, температура которых должна соответствовать температуре окружающей среды, чтобы довести общее количество до 4.

1. Погрузите слайды в растворы для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Погрузите не более четырех слайдов в сосуды Коплина одновременно.

2. Дегидратируйте слайды в течении 1 минуты в 70% этаноле, затем 1 минуту в 85% этаноле, и 1 минуту в 100% этаноле.

ПРИМЕЧАНИЕ: Держите слайды в 100% этаноле до тех пор, пока все слайды полностью не высохнут и нанесите смесь зондов.

Подготовка смеси зондов

1. Добавьте следующие компоненты для каждой исследуемой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:

7 мкл LSI/WCP Гибридизационный буфер
1 мкл пробы
2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации более чем трех проб, каждая из которых мечена разными флуорохромами, добавьте 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести общий объем пробы и воды до 3 мкл.

2. Центрифугируйте пробирку в течении 3 секунд.
3. Отвортексируйте и отцентрифугируйте снова.
4. Поместите пробирки на водяную баню при 73±1°C на 5 минут.
5. Извлеките пробирку с водяной бани.
6. Поместите пробирки на нагреватель для стекол при температуре от 45 до 50°C пока они не будут готовы для нанесения пробы комплементарной таргентной ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если слайды уже готовы**,** когда проба денатурировала, вы можете нанести пробу незамедлительно к таргентной ДНК.

Гибридизация зонда к таргентному образцу.

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте влажную коробку, поместив влажное полотенце, смоченное в воде, на сторону герметичного контейнера. Поместите в инкубатор при температуре 37°C.

1. Переместите слайды из 100% этанола.
2. Высушите слайды, коснувшись нижнего края слайдов путем промокания и вытирая нижнюю часть слайдов насухо бумажным полотенцем.
3. Поместите слайды на нагреватель для стекол от 45°C до 50°C для испарения остаточного этанола.
4. Нанесите 10 мкл смеси проб к одной таргентной области и незамедлительно накройте покровным стеклом.
5. Заклейте покровное стекло с помощью резинового клея.
6. Опустите слайды в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите в инкубатор при 37°C от 6 до 16 часов.

Для выполнения анализа с видимым хорошим сигналом, начните гибридизацию от 12 до 16 часов для большинства локусспецифических проб.

Промывка слайдов

Примечание: для образцов, выделенных из парафиновых блоков, замените 2X SSC/0.3% NP-40 промывочный раствор на 0.4XSSC/0.3% NP-40 промывочный раствор.

Подготовка промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0.4XSSC/0.3% NP-40 в сосуды Коплина. Поместите сосуды на водяную баню 73±1°C не менее чем на 30 минут перед использованием. Использовать в течении одного дня, затем утилизируйте.
- Налейте 70 мл 2XSSC/0.1% NP-40 в сосуды Коплина. Используйте при комнатной температуре. Использовать в течении одного дня, затем утилизируйте.

Примечание: для поддержания необходимой температуры в 0.4XSSC/0.3% NP-40, проводите отмывку 4 слайдов одновременно. Если у Вас меньше 4 слайдов, добавьте пустые слайды, находящиеся при комнатной температуре, чтобы общее количество слайдов составляло не менее 4.

Начните отсчет времени, когда все четыре слайда будут погружены.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Удалите покровное стекло с одного слайда и незамедлительно погрузите слайды в 2X SSC/0.1 % NP-40. Агитируйте слайды от 1 до 3 секунд. Повторите с другими слайдами.
2. Достаньте слайды по прошествии 2 минут.

Примечание: Убедитесь, что температура промывочного раствора 73±1°C перед промывкой других четырех слайдов.

3. Погрузите слайды в 2XSSC/0.1% NP-40. Агитируйте слайды от 1 до 3 секунд. Достаньте слайды по истечении от 5 секунд до 1 минуты

Визуализация гибридизации

1. Высушите слайды в темноте.
2. Нанесите 10 мкл контркрасителя DAPI II на исследуемую область и накройте покровным стеклом.

Просмотрите слайды, используя оптимальный набор фильтров для флуоресцентного микроскопа. Для визуализации флуорохромов при гибридизации используется следующий набор фильтров.

Использование фильтров Vysis	**Одновременное возбуждение и эмиссия**
DAPI/Оранжевый	DAPI и SpectrumOrange флуорохромы
DAPI/Зеленый	DAPI и SpectrumGreen флуорохромы
Тройной – Аква, Зеленый, Оранжевый	SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорохромы
Тройной – DAPI, Оранжевый, Зеленый	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорохромы
Четверной – DAPI, Аква, Зеленый, Оранжевый	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen, SpectrumOrange флуорохромы

Хранение: слайды хранятся при -20°C (±5°C) в защищенном от света месте по крайней мере в течении 3 недель после гибридизации**.**

Использование коденатурации: Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепарата с образцами, зондами и покровными стеклами помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2–10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite. Однако в зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги
добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: **для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.**

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд.
3. Отвортексируйте и отцентифугируйте снова.
4. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
5. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite. Обратитесь пожалуйста к руководству пользователя HYBrite для получения дополнительной информации. Так же может быть использована система денатурации/гибридизации ThermoBrite, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится под строгим контролем (±1°C), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73°C, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73°C и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37°C, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Контроль качества
В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.
Ограничение в использовании
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных.
Ожидаемые результаты
Предполагается, что гибридизация нормальных ядер с помощью зонда LSI RUNX1/RUNX1 приведет к образованию двух сигналов – два оранжевых и два зеленых сигнала. Ожидаемая абнормальная картина для пробы Vysis LSI RUNX1/RUNX1T1 это один оранжевый, один зеленый и два слитных сигнала. Могут также встречаться и другие абнормальные картины и анализ метафаз очень полезен для таких картин.
Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации
Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.
Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	Решение
Перекрестная Гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одни из следующих советов:
	•Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2°C
	При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.
	• Уменьшите температуру размораживания на 2°C.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Увеличьте продолжительность гибридизации. • Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. • Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3% NP40 при температуре 70-73°C.
Диффузный сигнал (образование «спеклструктур»)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2°C. • Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Промойте раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76°C.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: • Уменьшите температуру размораживания на 2°C. • Уменьшите продолжительность размораживания. ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. • Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. • При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Советы и устранение неполадок

При анализе результатов количественного определения FISH, убедитесь, что ваш микроскоп правильно настроен и оптимально функционирует. В следующей таблице приведены некоторые результаты, которые вы можете получить в процессе выполнения проб LSI. Возможные причины и предложения по улучшению качества процесса приведены ниже.

Проблема	Вероятная причина	Решение
«Искаженная» морфология хромосомы»	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.
	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1°C; уменьшите температуру до 72°C. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45-50°C) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
	Промывочные растворы использовались после	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4°C. Срок

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	хранения –7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов –1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0–8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Сигнал слабый или отсутствует	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1°C. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74°C. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45-50°C) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
	Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
	Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера:1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
	Зонд денатурирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1°C.
	ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Сигнал слабый или отсутствует	Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100% этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1°C) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50°C). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
	Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.
	Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
	Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20°C и беречь от света. Высушенные негибридизованные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20°C (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизованные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20°C в течение 3 недель.
Сигнал слабый или отсутствует	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флюорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. **ПРИМЕЧАНИЕ:** чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список №06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: Концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20°C и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

Библиография

1. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into MRC AML 10 trial. *Blood.* 1998;92:2322-33.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Raimondi SC, Chang MN, Ravindranath Y, et al. Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study: POG 8821. *Blood.* 1999;94: 3707-16.
3. NCCN AML Guidelines V.I. 2010.
4. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Blood. 2002; 100:4325-36.
5. Vance GH, Kim H, Hicks GA, et al. Utility of interphase FISH to stratify patients into cytogenetic risk categories at diagnosis of AML in an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) clinical trial (E1900). *Leuk Res.* 2007;31:605-09.
6. Cox MC, Panetta P, Venditti A, et al. Comparison between conventional banding analysis and FISH screening with an AML-specific set of probes in 260 patients. *Hematol J.* 2003; 4:263-270.
7. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;12(6):996-1006.
8. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med*. 2006;8(1):16-23.
9. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
10. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: *Bloodborne Pathogens.*
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3 (ISBN 1-56238-567-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
12. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая поддержка

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в техническую службу компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) по телефону +496122-580 или заходите на http:\\www.abbottmolecular.com.

CEP, LSI, WCP, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold, and ThermoBrite являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт Молекуляр Инк. в различных юрисдикциях.

Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany

© 2010, 2012 Abbott Laboratories

www.abbottmolecular.com
November 2012
30-608480/R2

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit

en

REF 06N38

30-608916/R4

Vysis ALK Break Apart
FISH Probe Kit

REF 06N38
30-608916/R4

ПРИМЕЧАНИЕ: Изменения выделены

Используемые символы

GTIN	Глобальный номер товара
	Официальный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер лота
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
Σ	Количество достаточно для <n> тестов
	Температурный режим
!	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	Использовать до (срок годности)
i	См. инструкцию по применению
	Биологический риск
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
CONTROL -	Отрицательный контроль
CONTROL +	Положительный контроль
EC REP	Авторизованный представитель в Европейском сообществе

VYSIS ALK BREAK APART FISH PROBE KIT

№ 06N38-023 (20 исследований) /№ 06N38-050 (50 исследований)

СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ: 1-800-553-7042
МЕЖДУНАРОДНАЯ СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ:
ПОЗВОНИТЕ ВАШЕМУ РЕГИОНАЛЬНОМУ ПРЕДСТАВИТЕЛЮ

Этот вкладыш необходимо внимательно прочитать перед использованием. Необходимо следовать инструкции, находящейся внутри. Достоверность результатов анализа не может быть гарантирована, если есть какие-либо отклонения от инструкций.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор VYSIS ALK BREAK APART FISH PROBE KIT предназначен для выявления реаранжировок с вовлечением гена ALK в процессе флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) в зафиксированных в формалине и залитых парафином (FFPE) тканях немелкоклеточного рака легких (НМРЛ).

ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ ТЕСТА

В тесте Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit для выявления реаранжировок хромосомы 2p23 используется технология флуоресцентной гибридизации in situ. Реаранжировка локуса ALK на 2p23 наблюдаются при развитии НМРЛ[1-3], лимфомы и нейробластомы. В норме ген ALK кодирует трансмембранный гликопротеин с тирозинкиназной активностью интрацеллюлярного домена. Рамочные реаранжировки с известными партнерами слияния приводят к тому, что киназный домен ALK попадает под контроль промотера другого гена. В результате этого синтеза образуется рекомбинантный белок с конститутивной тирозинкиназной активностью, который может играть ключевую роль в контроле клеточной пролиферации.

При НМРЛ реаранжировка гена ALK была впервые сопряжена с геном белка иглокожих, ассоциированным с микротрубочками, тип 4 (EML4)[1]. Слияние в препарате генов EML4-ALK, идентифицированных к настоящему времени, включают варианты, содержащие точечные разрывы гена EML4, случающихся в экзонах 2,6,13,14,15,18 и 20[1-2,5,7-9], и все варианты, начиная с участка гена ALK, кодированного экзоном 20. Было доказано, что кроме гена EML4 в НМРЛ ген ALK образует слияние с генами TFG и KIF5B.[4,7]

В некоторых публикациях сообщалось, что с использованием Vysis Break Apart FISH Probe были выявлены различные типы реаранжировок с вовлечением гена ALK. При НМРЛ доминирующим ALK-положительным рисунком FISH, выявленным с использованием наборов фильтров с единичной интерференцией [зеленый (FITC), красный (техасский красный) и синий (4',6-диамидин-2-фенилиндол), а также двойной (красный/зеленый) и тройной (синий, красный, зеленый) полосно-пропускающие фильтры], было слияние и разделение оранжевого и зеленого сигналов (62%), вторым наиболее часто встречающимся рисунком было слияние и одиночный оранжевый (31%) и последний рисунок – одиночный оранжевый и одиночный зеленый сигналы (7%). Рисунки цитогенетической реаранжировки, наблюдаемые при ALK-положительных опухолях, выявляют возможность активирования хромосомных делеций (одиночный оранжевый) и слияние/отсекание, или увеличение числа копийных генов в добавление к классическому сигналу деления, происходящее при реаранжировке ALK с другим-геном партнером[10]. В другом исследовании была протестирована подгруппа из тридцати одного пациента с ALK-положительными рисунками FISH реаранжировок также с использованием методик PCR и RT-PCR, которые не смогли выявить всех известных ALK-партнеров[11]. В настоящее время в вывлении EML-4 ALK НМРЛ не существует стандартных методик, альтернативных тесту Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. В соответствии с Инструкциями NCCN (National Comprehensive Cancer Network, Национальная сеть многопрофильных онкологических учреждений) (версия 3.2011) «Немелкоклеточный рак легкого» большим преимуществом методики FISH является то, что доступные на рынке зонды могут быть использованы для выявления ALK-реаранжировок при аденокарциномах легких. Иммуногистохимические (IHC) анализы, использовавшиеся в клинических лабораториях всего мира для выявления ALK-реаранжировок, не способны выявлять большинство аденокарцином[12] легких с ALK-реаранжировками.

В настоящее время нет альтернативных стандартных методов набору Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit для выявления ALK-реаранжировок при аденокарциномах легких. Согласно NCCN Guidelines (версия 2.2013) при немелкоклеточном раке легкого, большое преимущество FISH в том, что коммерчески доступный набор зондов применим для обнаружения ALK-реаранжировки при аденокарциномах легких.
Иммуногистохимические тесты (IHC), используемые для выявления ALK-перестройки в клинических лабораториях по всему миру неадекватны для выявления большинства АЛК-реаранжировок легких.
Немелкоклеточный рак легкого является основной причиной смертности от рака во всем мире[13,14].
Принимая во внимание 5-летний уровень смертности на уровне 85 до 95%, существует необходимость в улучшении выявляемости пациентов, которые вероятнее всего ответят на проводимое лечение[14].
Было показано, что ингибиторы тирозинкиназы снижают пролиферацию пролиферации клеток рака легкого, приводящие к супрессии роста опухоли. [9,15-17]
Терапевтическая эффективность ингибирования ALK в опухолях, которые были отобраны как ALK-положительные с использованием FISH, продемонстрировали на ранней стадии клинических испытаний низкомолекулярные ALK ингибитора тирозинкиназы.
Кроме того, исследование показало, что 63 из 82 пациентов все еще получали терапию во время отсечения данных с оценочной вероятностью выживаемости без прогрессирования 72%.[11]
В Фазе 3 открытого исследования, сравнивающее кризотиниб с химиотерапией, хромосомные перестройки ALK были ассоциированы с выраженным клиническим ответом на крезотиниб, нацеливание на ингибитор тирозинкиназы кризотиниба ALK. Пациенты имели право на включение в это исследование, если они имели

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

локально прогрессирующий или метастатический НМРЛ, который был определен как ALK-положительный с помощью теста Vysis ALK Break Apart FISH Probe.[18]

Биологические принципы процедуры

Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) – технология, позволяющая визуализировать специфические хромосомные последовательности нуклеиновой кислоты в клеточной популяции. Например, в технологии FISH, используется процедура гибридизации одноцепочечной молекулы флуоресцентно-меченого ДНК-зонда с ДНК-мишенью. Гибридизация зонда клетками ДНК видима при прямом выявлении, использующем флуоресцентную микроскопию.

Зафиксированные в формалине и залитые парафином ткани помещаются на предметные стекла. ДНК денатурирует до одноцепочечной формы и затем гибридизуется с ДНК-зондом. После гибридизации несвязанный зонд удаляется в результате серии промывок, а ядра контр-окрашивают ДАПИ (4,6-Диамидино-2-фенилиндолом), специфическим красителем ДНК, флуоресценирующим синим цветом. Гибридизация зонда ALK исследуется с помощью флуоресцентного микроскопа с соответствующими возбуждающим и эмиссионным фильтрами, позволяющими визуализировать оранжевый и зеленый флуоресцентные сигналы.

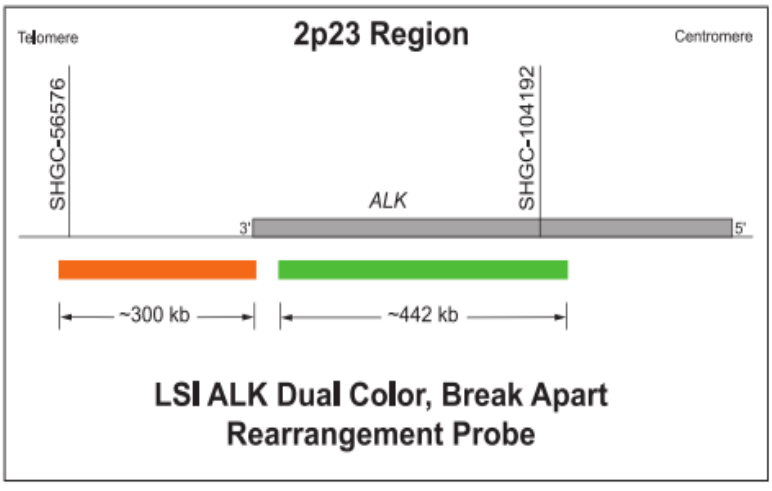
После гибридизации Vysis ALK Break Apart FISH Probes участок ALK 2p23 в своем нативном состоянии виден как два непосредственно примыкающих или наслоившихся (частично совпадающих) оранжевых/зеленых (желтый) сигнала. Однако, если происходит хромосомная реаранжировка в точечном разрыве 2p23 ALK, будут видны один оранжевый и один зеленый сигналы, разделенные диаметрами по крайней мере двух сигналов. И наоборот, кроме наслоившегося или разорванного сигналов может быть виден одиночный оранжевый сигнал (делеция зеленого сигнала).

Описание зонда

Зонд Vysis ALK Break Apart FISH Probe состоит из двух флуоресценто-меченых ДНК-зондов в буфере для гибридизации, содержащем сульфат декстрана, формамид и SSC (раствор хлорида и цитрата натрия) с блокирующей ДНК:

- Vysis LSI 3′-ALK SpectrumOrange (SO)
- Vysis LSI 5′-ALK SpectrumGreen (SGn)

Мишени гибридизации этих зондов находятся на противоположных сторонах точечного разрыва гена ALK. Зонд 3′-ALK, гибридизующий теломерно в точечном разрыве, составляет приблизительно 300 т.н. и мечен флуорофором SpectrumOrange. Зонд 5′-ALK, гибридизующий центромерно в точечном разрыве, составляет приблизительно 442 т.н. и мечен флуорофором SpectrumGreen.





РЕАГЕНТЫ

Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit

Набор содержит достаточное количество реагентов для проведения 20 или 50 исследований, зависит от заказанного продукта. Анализ определяется как один 22 мм x 22 мм целевой области.

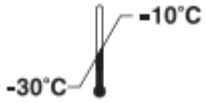
- **Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart FISH Probe**

(набор на 20 тестов, 1 флакон, 200 мкл)
(набор на 50 тестов, 1 флакон 500 мкл)
SpectrumOrange (50 нг/10 мкл) и SpectrumGreen (200 нг/10 мкл) меченой флуорохромом ДНК-пробы в гибридизационном буфере, содержащем сульфат декстарана, формамид и SSC с блокирующей ДНК.

- **DAPI I Counterstain**

(набор на 20 тестов, 1 флакон 300 мкл на флакон)
(набор на 50 тестов, 1 флакон 1000 мкл на флакон)
1 мкг/мл, DAPI (4', 6-фенилиндол˙2HCl) в фенилендиамин дигидрохлориде, глицерине и забуференном фосфатом физиологическом растворе.

ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ



Храните Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit от -30°C до -10°C в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортируйте Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit на сухом льду. Если вы получили реагенты в виде, не соответствующем рекомендациям этикетки, или в поврежденной упаковке, обратитесь в службу технической поддержки Abbott Molecular Technical Services.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD In Vitro диагностическое медицинское устройство
Для диагностики In Vitro.

- Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit предназначен только для использования на зафиксированных в 10% нейтральном формалине и залитых парафином тканях НМРЛ.

Заявление о биологической безопасности для комплекта компонентов

- Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit

ВНИМАНИЕ: данный препарат содержит полученные от человека и/или потенциально инфекционные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может гарантировать, что продукты, полученные от человека, или инактивированные микроорганизмы не инфицированы. Поэтому все биоматериалы человека должны рассматриваться как потенциально инфекционные. Рекомендуется обращаться с этими реагентами и биоматериалами человека в соответствии со стандартом для гемоконтактных патогенов Управления США по охране труда и промышленной гигиене (OSHA Standard on Bloodborne Pathogens).[20] При работе с материалами, содержащими инфекционные агенты, следует соблюдать правила биобезопасности, уровень 2, или другие соответствующие правила биобезопасности.[19,21,22]
Эти меры включают, но не ограничиваются следующим:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите, не пользуйтесь косметикой и не дотрагивайтесь до контактных линз в помещениях, где производятся работы с этими материалами.
- Вытирайте и дезинфицируйте все места, куда попадают капли образцов, туберкулецидным дезинфецирующим средством, например, 1,0% натрия гипохлорита, или другим соответствующим дезинфецирующим средством.[23,24]
- Деконтаминируйте и утилизируйте все потенциально все потенциально инфекционные материалы в соответствии с местными и государственными законами.[25,26]
- Обратитесь к информации по технике безопасности для VP 2000, системы BioView Duet/ Solo и инструмента ThermoBrite.
- Используйте Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash буферный набор (№ 01N31-005) для ручного анализа. Используйте VP 2000 набор предварительной обработки (№ 08N16-001) для автоматизированного (VP 2000) анализа. Не меняйте местами ручной и автоматический протоколы анализа.
- Избегайте контакта этих образцов с кислотами и сильными щелочами или воздействия высоких температур. Известно, что эти условия разрушают ДНК и могут вести к неправильным результатам теста FISH.
- Для определения мишеней необходимо проводить окрашивание ГЭ (H&E) на каждом 10-ом препарате одного и того же тканевого блока.
- Для обеспечения пригодности компонентов набора в течении указанного на этикетке срока годности необходимо их правильно хранить.
- Если в каком-либо из рабочих реагентов появляется осадок, или он становится мутным, такой реагент необходимо утилизировать и приготовить новые растворы.
- Флуорофоры легко подвергаются фотоотбеливанию при попадании на них света. Чтобы минимизировать такую деградацию, работайте со всеми растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, при ограниченном свете.
- Для измерения температур растворов, водных бань и инкубаторов требуются откалиброванные термометры.
- Перед каждым использованием обязательно измеряйте температуру раствора предварительной обработки и водных буферов в сосуде коплина откалиброванным термометром.
- Утилизируйте все опасные материалы в соответствии с официальными инструкциями по утилизации опасных веществ.
- Не используйте наборы или реагенты после истечения срока годности.
- Невыполнение всех процедур денатурации препарата, гибридизации и определению может вести к получению неприемлемых или ошибочных результатов.
- На условия гибридизации может сказаться использование реагентов, не соответствующее инструкциям Abbott Molecular.

Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид

H360	Может причинить вред плоду ребенка в утробе матери
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

ПАСПОРТА БЕЗОПАСНОСТИ: Важная информация по безопасности, хранению, транспортировке и утилизации содержится в Паспортах Безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (MSDS) для всех реагентов, представленных в комплекте, доступны по запросу от Службы Технической поддержки Abbott Molecular.

МАТЕРИАЛЫ

Поставляемые материалы

• Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

(Кат. номер 06N38-023 [20 тестов в наборе] или Кат. номер 06N38-050 [50 тестов в наборе]

Необходимые, но не поставляемые материалы
- ProbeChek ALK Negative Control Slides II (Кат. Номер 06N38-006)
- ProbeChek ALK Positive Control Slides (Кат. Номер 06N38-010)

Лабораторные реагенты
- Гемо-Де (или равноценный заменитель, например d-лимонен)
- Красители Гематоксилин и Эозин (H&E)
- Иммерсионное масло для флуоресцентной микроскопии
- Этанол (100%). Хранить при комнатной температуре.
- Дистиллированная вода.
- Каучуковый клей.

Лабораторные материалы
- Положительно заряженные предметные стекла для микроскопа
- Покровные стекла 22 мм × 22 мм
- Микролитровые наконечники для пипеток на 1-10 мкл (стерильные)
- Микролитровый пипеттор на 1-10 мкл
- Таймер
- Микротом
- Микроцентрифуга
- Мерные цилиндры
- Водяные бани (от 37°C до 42°C)
- Армированный скрайбер
- Устойчивый к растворителям маркер (опционно)
- Щипцы
- Сосуды Коплина (12×50 мл). Предлагаемый тип: вертикальный сосуд для окрашивания.
- Откалиброванный термометр
- Вортекс
- Инкубатор/печь (опционно)
- Коробки с крышками для слайдов/ или картонные папки для хранения микроскопических препаратов
- ThermoBrite® (регистрационный номер 07J91-010 [110/120V] или 07J91-020 [200/240V])
- Полоски влажности для ThermoBrite (регистрационный номер 7J68-001)

Дополнительные реагенты (Лабораторные материалы/Лабораторные материалы для ручного протокола)
- Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer Kit (Кат. Номер 01N31-005)
- Водяные бани статичные или с циркуляцией (37°C)
- Водяные бани с циркуляцией (74°C и 80°C)

ПРИМЕЧАНИЕ: Статические водяные бани не обеспечивают контроль за более высокой температурой.
Дополнительные реагенты (Лабораторные материалы/Лабораторные материалы (для автоматизированного протокола (VP 2000)
- VP 2000 Реагент для пробоподготовки (Кат. номер 08N16-001)
- VP 2000 Процессор (Кат. номер 02J11)

Лабораторные материалы для ручной оценки слайдов
- Флуоресцентный микроскоп с рекомендованными фильтрами **(Обратитесь к разделу Оборудование для микроскопа и аксессуары** для ручного протокола)

Лабораторные материалы для обработки слайдов на системе BioView
- Система BioView Duet/Solo (Duet-3), программное обеспечение, версия 3.4.0.16 или выше (Обратитесь к разделу **Оборудование для микроскопа и аксессуары для анализа слайдов на системе BioView)**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Микроскопическое оборудование и аксессуары для анализа слайдов

Микроскоп Для того, чтобы увидеть результаты гибридизации, необходим эпи-осветительный флуоресцентный микроскоп. Необходимо проверить микроскоп, чтобы убедиться в том, что он правильно работает, и обеспечить оптимальное изучение образцов теста FISH. Микроскоп, использующий такие общие красители ДНК как DAPI, пропидиум иодид и хинкарин, может работать недостаточно точно в тестах FISH. Рекомендуется проводить текущую очистку микроскопа и регулярное техобслуживание техническим представителем производителя, особенно настройку ртутной лампы.

Источник возбуждающего света В качестве источника возбуждающего света рекомендуется ртутная лампа на 100 ватт. Фиксируйте число часов использования лампочки и заменяйте ее до истечения расчетного времени ее функционирования. Убедитесь, что лампа правильно настроена.

Объективы Используйте масляные иммерсионные флуоресцентные объективы с числовой апертурой ≥ 0,75 при использовании микроскопа с ртутной лампой в 100 ватт. Объектив 10X на 25X, вместе с 10X окуляром, годен для сканирования образца, чтобы выбрать участки для суммирования сигналов. Чтобы суммировать сигналы FISH, удовлетворительные результаты могут быть получены с использованием объектива 60X на 100X масляного иммерсионного иммерсионного ахроматического типа.

Иммерсионное масло Иммерсионное масло, используемое в масляных иммерсионных объективах, должно быть пригодным для низкой аутофлуоресценции и, особенно, для использования в флуоресцентной микроскопии.

Фильтры Гибридизация зондов ALK с их мишенями-участками ДНК характеризуется оранжевой и зеленой флуоресценцией. Цвет флуоресценции всех остальных имеющих ДНК в результате контрастного окрашивания ДАПИ I будет синим. Фильтры с одиночной и двойной полосами пропускания, оптимизированные для использования с ДНК-зондами, доступны в Abbott Molecular для большинства моделей микроскопов.

С Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit рекомендуется использовать Vysis Dual Band (V2) – Green, Orange Filter Vysis Single Band DAPI filter, Vysis Single Band Orange Filter и Vysis Single Band Green Filter.

Микроскопическое оборудование и аксессуары для обработки слайдов на системе BioView

Программное обеспечение для системы BioView Duet/Solo версия 3.4.0.16 или лучше. Обратитесь к руководству BioView Duet для получения информации по микроскопу, источнику возбуждающего света, объективам, и иммерсионному маслу. Фильтры, рекомендуемые к использованию с Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit Vysis Dual Band (V2) Green, Orange Filter, Vysis Single Band DAPI filter, Vysis Single Band Orange Filter, Vysis Single Band Green Filter.

ПРОТОКОЛ ТЕСТА

До подготовки образцов см. раздел данной инструкции «Предупреждение и меры предосторожности».

Сбор образца и его обработка

Следующая процедура была оптимизирована для использования образцов ткани FFPE рака легкого. Избегайте контакта этих образцов с кислотами, напр. декальценирующими средствами, с сильными щелочами, а также воздействия высоких температур на образцы. Известно, что эти условия разрушают ДНК и могут вести к неправильным результатам теста FISH.

Используйте зафиксированные в формалине (буфер формалиновый 10% нейтральный) хорошо обработанный и качественные образцы ткани рака легкого. Рекомендуется фиксировать образцы ткани в течении 6-48 часов.

Подготовка препаратов образцов ткани FFPE НМЛР

Примечание: Начинайте обработку образцов, для которых на шаге 5 доступны только препараты, а не блок образцов.

1. С помощью микротома сделайте два или более серийных парафиновых среза толщиной 5±1 мкм.
2. Опустите срезы в дистиллированную воду в бане при температуре от 37 до 50°C на 30 минут.
3. Приготовьте препараты срезов на положительно заряженных предметных стеклах для исследования.
4. Дайте препарату высохнуть на воздухе.
5. Проводите окрашивание ГЭ (H & E) одного препарата образца.

Примечание: Препарат образца, использованный в процедуре исследования, должен состоять из 10 серийных срезов образца, окрашенного по методу H & E.

Примечание: Шаг 6 проводится патоморфологом.

6. Исследуйте и отметьте устойчивым к растворителям маркером или армированным скрайбером для стекла наибольшую область опухоли на препарате H&E, исключая некротические области, области in situ карциномы и области мелкоклеточного рака.
7. Скрайбером для стекла перенесите отметку с препарата, окрашенного H&E, на соответствующие области неокрашенного препарата, пометив препарат напротив среза ткани.
8. Храните препараты при комнатной температуре до термической обработки перед процедурой депарафинизации препарата.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Примечание: Включите 1 ProbeChek отрицательный контрольный слайд и 1 ProbeChek положительный контрольный слайд в шаге 9.

9.До запуска протокола ручного анализа или автоматического (VP 2000) протокола анализа, подержать неокрашенный образец и контрольные слайды от 2 до 24 часов при 60 °C на приборе ThermoBrite или в инкубаторе/микроволновке.

Анализ ALK Break Apart FISH может проводиться как ручным анализом так и автоматическим анализом. Обратитесь к инструкциям ниже.

ПРОТОКОЛ РУЧНОГО АНАЛИЗА

Подготовка рабочего реагента для ручного анализа

Примечание: Используйте Vysis Paraffin Pretreatment IV и пост-гибридизационный Wash Buffer Kit (№ 01N31-005) для ручного анализа. Использование комплекта для предварительной обработки VP 2000 (№ 08N16-001) для автоматического анализа (VP 2000). Не меняйте местами протоколы ручного и автоматического анализа.

10. **Подготовка Hemo-De –** наполните 3 сосуда Коплина 50 мл Hemo-De. Если сосуд не используется, он должен быть закрыт. Храните при комнатной температуре и утилизируйте после семи дней.
11. **Подготовка раствора Предварительной обработки –** наполните один сосуд Коплина 50 мл раствора предварительной обработки. До депарафинизации препаратов поместите сосуд Коплина в водяную баню с циркуляцией при комнатной температуре и доведите температуру водяной бани до 81±2°C (немного выше требуемой температуры внутри сосуда Коплина). До использования температура раствора должна достигать 80±2°C. Через день утилизируйте раствор.
12. **Подготовка раствора Протеазы –** добавьте одну пробирку Vysis Protease IV к одному флакону буфера Vysis Protease IV Buffer. Промойте пробирку небольшим количеством буфера Vysis Protease IV Buffer и вылейте буфер Vysis Protease IV Buffer обратно во флакон. Закройте флакон крышкой и аккуратно переверните несколько раз, чтобы перемешать содержимое. Поместите раствор протеазы в сосуд Коплина, а сосуд поместите в водяную баню с температурой 37°C. После перемешивания подождите минимум час, чтобы перед использованием протеаза растворилась в растворе, а температура буфера составила 37°C±1°C. Через день утилизируйте раствор.
13. **Подготовка дистиллированной воды –** наполните один сосуд коплина 50 мл дистиллированной воды. При использовании температура должна быть комнатной. Заменяйте воду после каждого использования.
14. **Подготовка растворов этанолов (70%, 85% и 100%) –** приготовьте разведения об/об 70% и 85%, используя 100% этанол и дистиллированную воду. Если не используется, хранить при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Растворы можно использовать в течении одной недели, если раствор не испаряется и не разжижается или замутняется из-за чрезмерного использования.

Процедура депарафинизации препарата

15. Погрузите препараты в первый сосуд коплина с Hemo-De на 5 минут при комнатной температуре.
16. Повторите шаг 15 дважды, каждый раз используя свежий Hemo-De.
17. Дегидрируйте препараты в 100% этаноле в течении 1 минуты при комнатной температуре. Повторите во втором сосуде коплина с 100% этанолом.
18. Просушите препараты в течении 2-5 минут (опционно).

Предварительная обработка препарата

19. Погрузите до восьми препаратов на 12±3 минут в предварительно нагретый до 80±2°C раствор Vysis Prepreatment Solution.

Примечание: При необходимости два препарата могут быть размещены «спина к спине» в каждом отделении сосуда коплина, при этом один препарат помещается в каждом крайнем отделении. Стороны препаратов со срезами ткани в крайних отделениях сосуда должны быть обращены к центру. В одном сосуде коплина может быть одновременно максимум восемь препаратов.

20. Погрузите препараты в дистиллированную воду на 3 минуты.

Предварительная обработка протеазой.

21. Достаньте препараты из дистилированной воды.
22. Удалите лишнюю воду, промокнув края препарата бумажным полотенцем.
23. Погрузите препараты в предварительно нагретый до 37°C ±1°C раствор протеазы на 20 ±2 минуты.
24. Погрузите препараты в дистиллированную воду на 3 минуты.

Процедура гибридизации

ThermoBrite используется для денатурации и гибридизации. Инструкции по использованию устройства см. в Руководстве по использованию ThermoBrite.

25. Погрузите препараты в 70% этанол на одну минуту.
26. Погрузите препараты в 85% этанол на одну минуту.
27. Погрузите препараты в 100% этанол на одну минуту.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

28. Просушите препараты в течении 2-5 минут.
29. Смочите карточку-индикатор влажности водой и поместите в отверстие для карточек ThermoBrite. Поверхность ThermoBrite должна быть чистой без твердых частиц.
30. Установите температуру денатурации (Melt Temp) на 73°C, а время денатурации (Mel Time) – на три минуты. Установите температуру гибридизации (Hyb Temp) на 37°C, а время гибридизации (Hyb Time) – на 14-24 часа.
31. Оттаивают смесь зонда при температуре окружающей среды, затем перемешивают с помощью вортекса и центрифугируют с использованием микроцентрифуги в течение 2-3 секунд.
32. Запечатайте покровное стекло каучуковым клеем.
33. Поместите препараты в ThermoBrite и запустите программу гибридизации. Сразу гибридизуйте препараты в течении 14-24 часов.

По окончании периода гибридизации переходите к **процедуре промывки препарата.**

ПРИМЕЧАНИЕ: Оставьте препараты в системе ThermoBrite до начала процедуры.

Процедура промывки препарата

Примечание: Гибридизованные препараты должны быть промыты в день проведения гибридизации.

34. Налейте 50 мл промывочного буфера I в сосуд коплина. При использовании температура должна быть комнатной. После одного дня использования утилизируйте.
35. Налейте 50 мл промывочного буфера II в сосуд коплина. Поместите сосуд коплина в водяную баню при комнатной температуре до нагрева, чтобы сосуд не лопнул. До использования нагревайте сосуд до 74°±1°C в течение по крайней мере 30 минут. После одного дня использования утилизируйте.
36. Удалите каучуковый клей с одного препарата, при этом стараясь минимально сдвинуть покровное стекло, и погрузите препарат в промывочный буфер I комнатной температуры. Повторите процедуру на других препаратах и оставьте их на 2-5 минут, чтобы покровные стекла отмокли от них.

Примечание: Для поддержания требуемой температуры промывочного буфера II промывайте одновременно только четыре препарата. Если у вас менее четырех препаратов, добавьте пустые препараты до общего количества. Начинайте отсчет времени с момента погружения четвертого препарата.

37. Немедленно погрузите препарат в промывочный буфер II с температурой 74°±1°C. Аккуратно взболтайте в течении 1-3 секунд. Повторите на других препаратах.
38. Удалите препараты из буфера после двух минут.

Примечание: До промывки следующих четырех препаратов убедитесь, что температура промывочного буфера II снова 74°±1°C.

Процедура контрастного окрашивания

39. При комнатной температуре просушите воздухом препарат (ы), защищенный (ые) от света месте.
40. Разморозьте ДАПИ при комнатной температуре, затем размешайте, используя вортекс и от центрифугируйте, используя микроцентрифугу в течении 2-3 секунд. Нанесите 10 мкл контрастного красителя ДАПИ на область-мишень препарата, наложите покровное стекло и храните в защищенном от света месте.
41. Выполните ручную оценку слайдов или с помощью BioView в течение 24 часов или хранить при –20°C (±10°C).

Процедура архивирования (опционно)

Храните гибридизованные препараты при –20°C(±10°C) защищенными от света. При этих условиях препараты могут храниться до одной недели после контрастного окрашивания ДАПИ I Counterstain, при этом интенсивность флуоресцентного сигнала не снижается значительно.

Примечание: Перед просмотром дайте препаратам нагреться до комнатной температуры.

Исследование препарата

42. Просматривайте препараты с помощью отвечающего требованиям фильтра, установленного на проведение оптимального флуоресцентного микроскопирования (см. раздел данного вкладыша **Микроскопическое оборудование и аксессуары–Фильтры)** или с помощью BioView Duet системы анализа изображений (см. раздел данного вкладыша **Микроскопическое оборудование и аксессуары для системы анализа изображений BioView).**

ПРОТОКОЛ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО АНАЛИЗА (VP 2000)

Примечание: Используйте Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-hybridization Wash буфер (кат. номер № 01N31-005) для ручного анализа. Используйте VP комплект предварительной обработки 2000 (кат. номер № 08N16-001) для автоматизированных (VP 2000) протоколов. Не меняйте местами руководство для ручного анализа и протоколы автоматического анализа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Примечание: Минимум 3 и максимум 48 образцов или контрольных слайдов может быть обработано за каждый прогон на протоколе автоматизированного анализа при автоматизации (VP 2000). Протокол анализа используется.

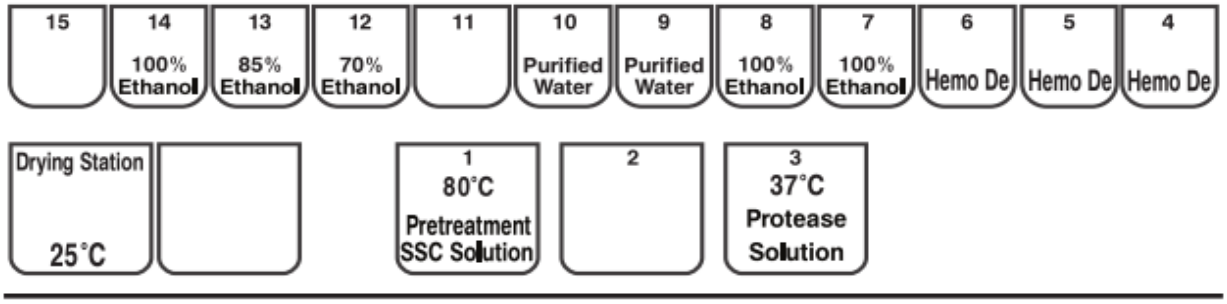
43. VP 2000 протокол для предобработки

Введите и/или подтвердите протокол предварительной обработки VP 2000 (Таблица 1) в окне редактора протокола. Обратитесь к процессору Abbott VP 2000 руководству по эксплуатации для получения дополнительной информации, связанной с использованием прибора. Откройте протокол предварительной обработки VP 2000 перед использованием.

Таблица 1. VP 2000 протокол для предобработки

Шаг	Описание	Емкость	Реагент	Время	Температура
1	Hemo-De	4	Hemo-De	5 минут	Комнатная
2	Hemo-De	5	Hemo-De	5 минут	Комнатная
3	Hemo-De	6	Hemo-De	5 минут	Комнатная
4	100% этанол	7	100% этанол	1 минута	Комнатная
5	100% этанол	8	100% этанол	1 минута	Комнатная
6	Проподготовка раствор SSC	1	Проподготовка раствор SSC	25±10 минут	80 °C
7	Очищенная вода	9	Очищенная вода	3 минуты	Комнатная
8	Раствор Протеазы	3	Раствор Протеазы	15±5 минут	37 °C
9	Очищенная вода	10	Очищенная вода	3 минуты	Комнатная
10	70% этанол	12	70% этанол	1 минута	Комнатная
11	85% этанол	13	85% этанол	1 минута	Комнатная
12	100% этанол	14	100% этанол	1 минута	Комнатная
13	Сухой воздух	Сушильная станция	----------	----------	Комнатная

Подготовка рабочего реагента для автоматизации (VP 2000)
Протокол анализа
Примечание: Обратитесь к рисунку реагентов (Рисунок 1) для определения местоположения емкостей с реагентами.
Рисунок 1 Карта реагентов (Пример)



44. Подготовка Hemo-De–заполните емкости 4,5,6 каждая 500 мл Hemo-De. Накройте, если не будете использовать. Утилизируйте по истечении 7 дней.
45. **Подготовка раствора SSC** – добавьте 500 мл (два флакона по 250 мл) Vysis Претритмент SSC раствор (бутылочка с голубой полосой) в емкость. Убедитесь, что на рабочем экране установлена и достигнута температура 80°C до предварительной обработки слайдов. Утилизируйте после одного дня использования (максимум после 2 прогонов).

46. **Подготовка раствора Протеазы** - Добавьте 1 флакон Vysis Protease IV Buffer (250 мл) и один флакон Vysis Protease IV (750 мг) в емкость 3. Добавьте остаточный объем из со второй бутылки Vysis Protease IV Buffer в емкость 3. Верните емкость в обозначенное место на станции VP 2000. Подождите минимум один час, перемешивая 2-3 раза до начала анализа. Визуально убедитесь, что протеаза находится в растворе и убедитесь, что температура на сенсорном мониторе установлена и достигла 37°C. Удалите раствор после одного дня использования (максимум после 2 прогонов).
47. **Подготовка очищенной воды –** заполните емкости 9 и 10, каждый 500 мл очищенной воды. Заменяйте воду после каждого использования.
48. **Подготовка растворов этанола (70%, 85%, и 100%) -** Подготовьте v/v (объем/объем) разведения 70% и 85% этанола, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в контейнере с плотно закрытой крышкой, если не используете.

- Заполните емкость 7, 8 и 14 500 мл 100% этанола

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Заполните емкость 12 500 мл 70% этанола
- Заполните емкость 13 500 мл 85% этанола

Раствор этанола может быть использован в течении 1 недели пока, если раствор не испаряется и не разжижается или замутняется из-за чрезмерного использования.

ПОДГОТОВКА СЛАЙДОВ

49. Загрузите образцы и/или контрольные предметные стекла в корзину для предметных стекол VP 2000 и прикрепите к роботизированной руке VP 2000. Когда раствор для предварительной обработки SSC достиг 80 ° C, начните предварительную обработку на VP 2000 протоколе (шаг 43, таблица 1). Когда VP 2000 протокол предварительной обработки завершен, удалите корзину со слайдами из VP 2000 и удалите слайды из корзины.

Процедура гибридизации

Инструмент ThermoBrite должен использоваться для денатурации и этапов гибридизации. Обратитесь к Руководству по эксплуатации ThermoBrite для получения инструкция по применению прибора.

50. Намочите карты влажности водой и вставьте отверстия инструмента ThermoBrite. Убедитесь, что поверхность инструмента ThermoBrite чистая и без мусора.
51. Установите температуру денатурации (Melt Temp) на уровне 73°C и время денатурации (Melt Time) 3 минуты. Установите температуру гибридизации (Hyb Temp) 37°C и время гибридизации (Hyb Time) от 14 до 24 часов.
52. Доведите пробу до комнатной температуры, затем перемешайте, используя вортекс, и отцентрифугируйте, используя микроцентрифугу в течении 2-3 секунд. Нанесите 10 мкл пробы на каждый препарат и незамедлительно накройте покровным стеклом. Убедитесь, что отсутствуют пузырьки воздуха перед нанесением покровного стекла.
53. Заклейте покровное стекло клеем.
54. Поместите слайды в прибор ThermoBrite и начните программу гибридизации. Гибридизация слайдов длится на протяжении от 14 до 24 часов.

В конце периода гибридизации, перейдите к **процедуре промывки слайдов на станции VP 2000.**

Примечание: Оставьте слайды на приборе ThermoBrite до начала процедуры.

VP 2000 процедура отмывки

Примечание: Слайды после гибридизации должны быть промыты в тот же день, когда закончена гибридизация.

55. VP 2000 протокол промывки слайдов

Введите протокол промывки слайдов VP 2000 (Таблица 2) в протоколе «Окно Редактора». Обратитесь к разделу «Процессор Abbott VP 2000». Руководство для получения дополнительной информации, связанной с использованием инструмента. Откройте VP 2000 протокол промывки слайдов перед использованием.

Таблица 2. VP 2000 протокол промывки слайдов

Шаг	Описание	Емкость	Реагент	Время	Температура
1	Промывочный буфер II	2	Промывочный буфер II	2 минуты	74°C
2	Сухой воздух	Сушильная станция	----------	30 секунд	Комнатная

56. Добавьте 500 мл (2 флакона по 250 мл) Буфера для Промывки II (флакон с зеленой полоской) в емкость 2 (нагретая). Убедитесь, что температура на экране достигла 74°C перед процедурой промывки слайдов. Утилизируйте раствор после одного дня использования (максимум после двух прогонов).
57. Основываясь на количестве гибридизованных слайдов, налейте 50 мл Промывочного Буфера I (флакон с оранжевой полоской) в каждую серию сосудов Коплина, допускающих только 8 слайдов на каждый сосуд Коплина. Использовать при комнатной температуре. Утилизировать раствор после одного дня использования.
58. Когда температура промывочного буфера II достигнет 74°C, удалите клей со слайдов, стараясь по минимуму затрагивать покровное стекло и погрузите слайды в Промывочный Буфер I при комнатной температуре. Оставьте слайды по крайней мере на 2 минуты, чтобы покровное стекло отклеилось от слайда. Проверьте и убедитесь, что все покровные стекла сняты и удалите покровные стекла осторожно в случае необходимости. Как только все покровные стекла сняты и удалены, незамедлительно приступайте к следующему шагу.
59. Загрузите образцы и/или контрольные предметные стекла в держатель для предметных стекол VP 2000. Незамедлительно прикрепите держатель к роботизированной руке VP2000 и начните протокол отмывки слайдов VP 2000 (шаг 55, **Таблица 2**), перемещая и погружая корзину для слайдов в промывочный буфер II при 74 ° C на 2 минуты, с последующей 30-секундной стадией сушки при температуре окружающей среды.
60. Когда процедура промывки слайдов на VP2000 по протоколу Промывки слайдов полностью завершена, удалите корзину со слайдами со станции VP2000 и извлеките сами слайды из корзины.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ СЛАЙДОВ

61. Высушите слайды в защищенном от света месте при комнатной температуре.
62. Разморозьте ДАПИ при комнатной температуре, затем перемешайте, используя вортекс и отцентрифугируйте, используя микроцентрифугу в течении 2-3 секунд. Нанесите 10 мкл контркрасителя DAPI I на нужную область на слайде, заклейте покровным стеклом и уберите от света минимум на 5 минут.
63. Выполните ручную оценку слайдов или с помощью системы изображений BioView в течение 24 часов или хранить при –20°C (±10°C).

Процедура архивирования (опционно)

Храните гибридизованные препараты при –20°C(±10°C) защищенными от света. При этих условиях препараты могут храниться до одной недели после контрастного окрашивания ДАПИ I Counterstain, при этом интенсивность флуоресцентного сигнала не снижается значительно.

Примечание: Перед просмотром дайте препаратам нагреться до комнатной температуры.

Оценка слайдов

64. Просматривайте слайды, используя подходящий набор фильтров для оптимального функционирования флуоресцентного микроскопа (см. Оборудование микроскопа и Аксессуары для ручной оценки слайдов-раздел Фильтры) или система визуализации BioView Duet (см. Микроскоп Оборудование и аксессуары для BioView Imaging см. Раздел оценки слайдов для данного вкладыш).

ИНТЕПРИТАЦИЯ И ОТЧЕТ О РЕЗУЛЬТАТАХ – РУКОВОДСТВО ПО ОЦЕНКЕ СЛАЙДОВ

Контроль качества

65. Оценить адекватность гибридизации контрольных слайдов, используя следующие критерии

Оценка адекватности гибридизации препарата

- **Морфология ядерных структур:** Границы ядер в опухоли, выявляемых при ДАПИ, обычно должны быть различимы, а ядра целостными.
- **Фон:** Фон не должен содержать никаких частиц, мешающих суммированию сигналов.

Примечание: За пределами ядер могут наблюдаться флуоресцентные дымка или свечение, но если эти флуоресцентные дымка/свечение не закрывают ядро и не препятствуют суммированию сигналов, они приемлемы.

- **Интенсивность сигнала зонда:** Сигналы должны быть яркими, ясными и легко поддающимися оценке. Избегайте поверхностных диффузных сигналов.
- Большинство рассматриваемых областей-мишеней должны отвечать этим критериям.
- Область-мишень должна содержать по крайней мере 50 клеток, поддающихся оценке.

66. Если при оценке адекватности гибридизация препарата контроля отвечает критериям гибридизации, повторите процедуру оценки адекватности гибридизации (шаг 65) для всех препаратов образцов. Если при оценке адекватности гибридизация препарата контроля не отвечает этим критериям, см. дополнительную информацию по использованию препаратов контроля в разделе **Контроль качества, использование препаратов контроля.**

Оценка слайдов

67. **Определение место рассмотрения области-мишени**

- До рассмотрения препаратов FISH, используйте препарат, окрашенный по технологии H&E, для подтверждения области-мишени.
- Используйте объектив 10X-25X и полосно-пропускающий фильтр ДАПИ для определения местоположения интересующей вас гибридизированной области.
- Избегайте некроза и те области, в которых границы ядер нечеткие. Не рассматривайте ядра с недостаточным для определения границ контрастным окрашиванием.

68. **Оценка области-мишени**

- Используйте объектив 60X-100X и рекомендованные фильтры для исследования качества сигналов ALK и качества морфологии ткани. Настройте фокус и ознакомьтесь с размером и формой сигналов мишени и помехами (инородные тела). Убедитесь, что фон темный и относительно слабо флуоресцирует, не затрудняя суммирования сигналов.
- Сканируйте всю(е) скрайбированную(ые) область(и). Следите за распределением сигналов клеток опухоли во время сканирования, чтобы выбрать репрезентативную область для суммирования.

69. **Выберите и суммируйте клетки области-мишени**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

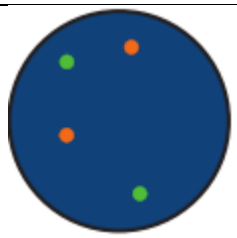
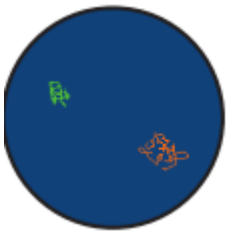
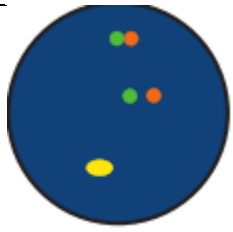
• Выберите область четкого распределения ядер (напр. область, в которой можно различить отдельные ядра), выбранные области для суммирования являются репрезентативными по наблюдаемому распределению сигналов.
• Используйте объектив 60X-100X и рекомендованные фильтры и начинайте анализ клеток, выбранных для суммирования, и зафиксируйте сигналы в каждой клетке.
• Переходите к следующей репрезентативной области для суммирования.
• Повторяйте шаги 2 и 3, пока 50 клеток не будут суммированы.
• Прекратите, когда суммированы 50 клеток, выбранных из репрезентативных областей.
Примечание: Диаметр диафрагмы осветителя микроскопа может быть сужен до диаметра интересующих вас клеток, чтобы облегчить суммирование.

70. **Правила суммирования сигналов**
• Регулируйте фокус так, чтобы найти все присутствующие в ядре сигналы. Суммируйте сигналы на границах ядра каждой выбранной интерфазной клетки опухоли в соответствии с инструкциями **Рисунка 2.**
• Клетки считаются отрицательными (не-перегруппированными), если:

- Оранжевый и зеленый сигналы непосредственно примыкают друг к другу или наслаиваются (желтый сигнал с фильтром Orange/Green V2). Если расстояние между оранжевым и зелеными сигналами менее двух диаметров сигналов, такие сигналы считаются одним наслоившимся сигналом **(Рисунок 2, панель 1)**.
- Присутствует один зеленый сигнал без соответствующего оранжевого сигнала **(Рисунок 3, панель 1).**

• Клетки считаются положительными (перегруппированными), если:

- Расстояние между оранжевыми и зелеными сигналами менее двух диаметров сигналов, такие сигналы считаются одним наслоившимся сигналом **(Рисунок 3, панель 2).**
- Присутствует один оранжевый сигнал без соответствующего зеленого сигнала в добавление к наслоившемся и/или разорванным сигналам **(Рисунок 3, панель 2).**

Рисунок 2. Инструкция по суммированию сигналов ALK	
Отдельный оранжевый сигнал	
Отдельный зеленый сигнал	
Непостредственно примыкающие или диффузные оранжевый и зеленые сигналы	
Панель 1: **Типичные рисунки сигналов**	**Инструкции:**
	A: Отдельные оранжевый или зеленый сигналы считаются одиночными сигналами.
	B: Диффузные сигналы могут быть размытыми или иметь вид вытянутого, волокнистого материала ДНК и должны считаться как одиночные сигналы
	C: Расстояние между непосредственно примыкающими оранжевым и зеленым сигналами менее двух диаметров сигналов или они частично совпадают – такие сигналы считаются как один наслоившийся сигнал. В одном ядре могут наблюдаться несколько наслоившихся и/или разорванных сигналов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

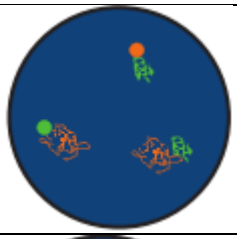
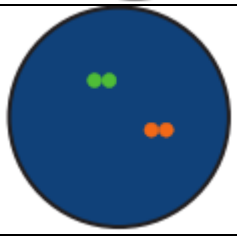
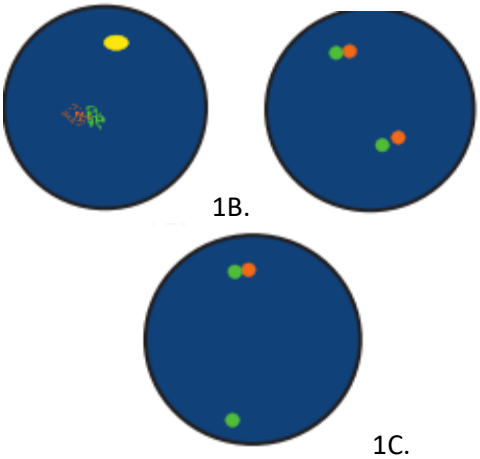
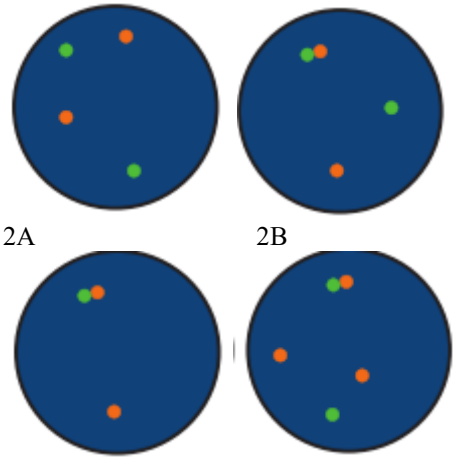
	D: Если диффузные сигналы непосредственно примыкают друг к другу или соединены волокнами, они должны считаться как один наслоившихся сигнал. В одном ядре могут наблюдаться несколько наслоившихся и/или разорванных сигналов.
	E: Два сигнала одного цвета, одного размера, и расстояние между которыми менее двух диаметров сигналов, должны считаться как один одиночный сигнал (это расщепленный сигнал).

Рисунок 3. Инструкция по суммированию сигналов ALK: Профиль сигналов	
Профиль сигналов: Отрицательный	
Панель 1: Непосредственно примыкающие или наслоившиеся оранжевый и зеленый сигналы	
 1A. 1B. 1C.	A. и B. В этих примерах наслоившиеся оранжевый и зеленый сигналы. Сигналы частично совпадают, непосредственно примыкают, или расстояние между ними менее двух диаметров сигналов. **Примечание: Сигналы, которые совпадают, считаются как оранжевый сигнал.** C. Одиночный зеленый сигнал без соответствующего оранжевого сигнала в добавлении к наслоившимся и/или разорванным сигналам указывает на удаление оранжевой части зонда ALK и считается отрицательным. Область-мишень лекарственного препарата расположена в границах области, на которую нацелен оранжевый зонд. **Примечание: Ядра с сигналами только одного цвета не должны суммироваться.**

Профиль сигналов: Положительный	
Панель 2: Разорванный или удаленный зеленый	
 2A 2B 2C 2D	Эти ядра содержат реаранжированные или «разорванные» сигналы, между ними расстояние в 2 или более диаметров сигналов. A. В ядре может быть более одной пары разорванных сигналов. B. В ядре могут быть наслоившиеся или разорванные сигналы. C. В ядре может быть одиночный оранжевый сигнал (зеленый сигнал удален) в добавление к наслоившемуся и/или разорванному сигналам. **Примечание: Ядра с сигналами только одного цвета не должны суммироваться.** D. В одном и том же ядре могут быть наслоившиеся сигналы, разорванные сигналы и удаленные сигналы.

Документирование суммирования сигналов

71. Зарегистрируйте рисунки сигналов на 50 ядер.

- Для каждого ядра фиксируйте число наслоившихся (примыкающих сигналов)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Для каждого ядра фиксируйте число одиночных оранжевых сигналов.
- Для каждого ядра фиксируйте число одиночных зеленых сигналов.
- Отдельная клетка считается только раз, независимо от числа имеющихся в ней реаранжировок и/или удалений.
- Не считайте ядра без сигналов или с сигналами только одного цвета (без наслоившихся и/или разорванных сигналов). Считайте только ядра с одним или более сигналами FISH каждого цвета.
- Не суммируйте ядро, если его сигналы слабые или поверхностно диффузные.

Документирование результатов для определения статуса ALK

72. Классифицируйте каждое ядро в соответствие с **Таблицей 3.**

Таблица 3. Классификация клеток, как положительная, так и отрицательная

Профиль сигнала	**Кол. примыкающих или наслоившихся сигналов**	**Кол. одиночных оранжевых сигналов**	**Кол. одиночных зеленых сигналов**	**Классификация клеток**
1A, 1B	≥1	0	0	Отрицат.
1C	≥1	0	≥1	Отрицат.
2A,2B,2D	≥0	≥1	≥1	Положит.
2C	≥1	≥1	0	Положит.

73. Определите число клеток, классифицированных как отрицательные.
74. Определите число клеток, классифицированных положительные.
75. Образец считается отрицательным, если <5 клеток из 50 (5/50 или <10%) являются положительными.
76. Образец считается положительным, если >25 клеток из 50 (25/50 или >50%) являются положительными.
77. Образец считается неопределенным, если 5-25 клеток (10-50%) являются положительными. Если образец неопределенный, препарат должен исследовать второй специалист.
    - Первое и второе считывания подсчета клеток складывается вместе и рассчитывается процент от 100 клеток (средний процент положительных клеток).
    - Если средний процент положительных клеток <15% (15/100), образец считается отрицательным.
    - Если средний процент положительных клеток составляет ≥15% (≥15/100), образец считается отрицательным.

Неинформативный результат (оценка слайдов)

Обозначьте результат как Неинформативный, если образец не соответствует критериям качества в соответствии с инструкциями раздела **Оценка адекватности гибридизации препарата. Адекватность гибридизации при интерпретации и результатах отчетности – Ручная оценка слайдов, Контроль качества.**

- Если в скрайбированной области образца содержится менее 50 опухолевых клеток, поддающихся суммированию, образец считается неинформативным.
- Для получения информативных образцов слайдов, повторите анализ с новыми слайдами.

Использование препаратов контроля (для ручной оценки слайдов).

- Препараты контроля должны исследоваться вместе с препаратами пациентов для контроля за рабочими характеристиками теста и для оценки точности суммирования сигналов. Препараты контроля должны обрабатываться вместе с препаратами образцов, начиная с Процедуры депарафинизации препарата (шаг 9).
- Препараты контроля необходимо исследовать каждый день проведения тестов FISH и с введением каждого нового лота набора.

- Установленный диапазон допустимых результатов исследований для контрольных слайдов ProbeChek ALK с ручной оценкой слайдов указан в **Таблице 4.**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 4. Установленный диапазон для контрольных слайдов ProbeChek ALK Контрольных слайдов	
Допустимый диапазон рабочих характеристик, установленный для ProbeChek ALK Отрицательных контрольных слайдов II	<15% (0-7 положительных клеток)
Допустимый диапазон рабочих характеристик, установленный для ProbeChek ALK Положительных Контрольных слайдов	20-62% (10-31 положительных

• Если контрольный слайд не соответствует ни одному из критериев приемлемости, анализ, возможно, не был выполнен должным образом или ALK Break Apart FISH Probe Kit - отдельные компоненты FISH Probe Kit могли сработать неадекватно. Ни в коем случае не следует выдавать результаты FISH, если какой-либо контрольный слайд не сработал. Необходимо выполнить повторный анализ с новыми контрольными слайдами и с клиническими слайд(ми) образца при необходимости.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ И ОТЧЕТ О РЕЗУЛЬТАТАХ -ОЦЕНКА Слайдов на системе BIOVIEW
ПРИМЕЧАНИЕ. Обратитесь к руководству пользователя BioView Duet для использования на системе Duet/Solo.

78. Добавьте одну-две капли специального иммерсионного масла на каждое покровное стекло образца слайда, убедитесь, что масло распределено над очерченной областью на слайде.
79. Загрузите максимально 25 слайдов в кассету номер один для слайдов. Если вы сканируете больше, чем 25 слайдов, используйте кассету номер два.
80. Загрузите кассету для слайдов в систему BioView.
81. Выберите вариант ALK и ALK в качестве имени задачи в поле «Сканировать»

Контроль качества

82. Оцените адекватность гибридизации контрольных слайдов визуально, используя следующие критерии:

Оценка адекватности гибридизованных слайдов

- **Морфология ядер:** Границы ядер опухолевых клеток, обследуемых с помощью DAPI, должны быть хорошо различимы, а ядра должны быть целостными.
- **Фон:** фон не должен содержать частицы, которые мешают подсчету.

Примечание: За пределами ядер могут наблюдаться флуоресцентные дымка или свечение, но если эти флуоресцентные дымка/свечение не закрывают ядро и не препятствуют суммированию сигналов, они приемлемы.

- **Интенсивность сигнала зонда:** Сигналы должны быть яркими, ясными и легко поддающимися оценке. Избегайте поверхностных диффузных сигналов.
- Большинство рассматриваемых областей-мишеней должны отвечать этим критериям.
- Область-мишень должна содержать по крайней мере 50 клеток, поддающихся оценке.

83. Если при оценке адекватности гибридизация препарата контроля отвечает критериям гибридизации, повторите процедуру оценки адекватности гибридизации (шаг 65) для всех препаратов образцов. Если при оценке адекватности гибридизация препарата контроля не отвечает этим критериям, см. дополнительную информацию по использованию препаратов контроля в разделе **Контроль качества, использование препаратов контроля.**

Оценка слайдов на системе BioView

84. **Определение место рассмотрения области-мишени**

- До рассмотрения препаратов FISH, используйте препарат, окрашенный по технологии H&E, для подтверждения области-мишени.
- Используйте объектив 10X-25X и полосно-пропускающий фильтр DAPI для определения местоположения интересующей вас гибридизированной области.
- Избегайте некроза и те области, в которых границы ядер нечеткие. Не рассматривайте ядра с недостаточным для определения границ контрастным окрашиванием.

85. **Оценка области-мишени**

• Используйте объектив от 10X до 20X и 60X-100X и рекомендованные фильтры для исследования качества сигналов ALK и качества морфологии ткани. Настройте фокус и ознакомьтесь с размером и формой сигналов мишени и помехами (инородные тела). Убедитесь, что фон темный и относительно слабо флуоресцирует, не затрудняя суммирования сигналов.

86. **Выбор поля зрения и сканирования слайдов**

• Используйте объектив 10x или 20x и фильтр DAPI, чтобы выбрать поля обзора (FOV) в целевых областях просмотра. При необходимости отрегулируйте экспозицию DAPI на экране, перемещая Ползунок «Скорость затвора» для достижения приемлемого уровня видимой интенсивность DAPI.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Выберите 20 подходящих полей зрения на каждом слайде, которые соответствуют критериям раздела **Оценка адекватности гибридизованных слайдов**. Подтвердите качество сигнала с использованием соответствующих полостных фильтров. Если слайд не имеет 20 полей зрения из-за небольшого размера ткани или если слайд не имеет 20 полей зрения приемлемого качества, выберите как можно больше полей зрения, чтобы получить достаточное количество опухолевых клеток (минимум 50 опухолевых клеток для контрольных слайдов; минимум 100 опухолевых клеток для образцов слайдов) которые будут доступны для ознакомления. Для опухолевой ткани рака легкого, заключенного в парафин, убедитесь, что FOVs выбран из области-мишени внутри отмеченных областей (т. е. если 3 выбранные области на слайд, попытайтесь равномерно распределить выбранные области среди этих трех областей).
- После завершения выбора «Поля зрения» нажмите «Готово».
- Повторите шаги с 84 по 86 пока выбор FOV не будет завершен для всех слайдов, загруженных в кассету (ы). Получение изображения начнется сразу же после того, как нажмете «Готово» для последнего слайда.

87. **Оценка поля зрения и отбор клеток (выполняется на системе BioView Solo)**

- Следуйте руководству пользователя BioView Duet при работе на системе Solo.
- Просмотрите изображения в полях зрения и убедитесь, что клетки классифицируются на основе различимых ядер, низкого фона и четких сигналов.
- Выбор клеток:
    - Для ProbeChek ALK положительных контрольных слайдов:

      Выберите 50 опухолевых клеток для анализа из полученных изображений.

      Выберите отдельные, не перекрывающиеся ядра с отдельными границами и убедитесь, что клетки являются репрезентативными при исследуемом распределении сигнала.
    - Для заключенных в парафин стекол немелкоклеточного рака легкого.

      Выберите 50 опухолевых клеток для анализа из по крайней мере 3 областей. Выберите отдельные, не перекрывающиеся ядра с отдельными границами и убедитесь, что клетки являются репрезентативными при исследуемом распределении сигнала. Обведите примерно 15-20 опухолевых клеток в поле зрения, начиная с ALK-положительных опухолевых клеток в поле зрения. Если 15-20 опухолевых клеток не доступны в выбранном поле зрения, продолжите отбор опухолевых клеток в дополнительных полях зрения, пока не будут выбраны 50 опухолевых клеток.

ПРИМЕЧАНИЕ: Контркраситель DAPI используется для верификации отдельных, не перекрывающихся ядер с четкими границами. Выбор клеток должен производиться с использованием комбинированных (двойной оранжевый/зеленый), Оранжевый (одиночный Оранжевый) и Зеленый (одиночный зеленый) цветов для оценки и чтобы убедиться, что в выбранных клетках наблюдается равномерное распределение сигнала.

- Выбранные клетки будут автоматически классифицироваться как Отрицательные и Положительные на основе моделей, описанных в **Таблице 3** «Классификация клеток как «Положительных так и Отрицательных» Клетки, которые не могут быть классифицированы по качеству сигнала, будут помечены как «некласифицированные». Положительные и отрицательные сигналы будут обозначены красным или зеленым контуром соответственно, в то время как некласифицированные клетки будут обозначены серым контуром. Используйте кнопку «Диаграмма» для отслеживания выбранных клеток.

88. Обзор клеток и Реклассификация

ПРИМЕЧАНИЕ: Этот шаг должен быть выполнен для всех автоматических классификаций положительных и отрицательных клеток до записи результатов статуса ALK (Шаг 89).

- Просмотрите присвоенную классификацию для каждой из выбранных клеток и реклассифицируйте клетки по мере необходимости. При подсчете сигналов следуйте правилам, перечисленным ниже:
    - Клетки считаются отрицательными (не организованными) когда:
    - Оранжевый и зеленый сигналы смежны или слиты (оранжевый сигнал возникает под Оранжевым/Зеленым V2 фильтрами). Оранжевый и зеленый сигналы, расстояние между которыми составляет менее 2 диаметров, рассматриваются как один слитый сигнал **(Рисунок 3, Панель 1).**
    - Есть один зеленый сигнал без соответствующего оранжевого сигнала (**Рисунок 3, Панель 1).**
    - Клетки считаются положительными (не организованными) когда:
    - По крайней мере один набор оранжевых или зеленых сигналов 2 или более диаметров сигнала (**Рисунок 3, Панель 2).**
    - Есть один оранжевый сигнал без соответствующего зеленого сигнала в дополнении к слитым и/или разделенным сигналам **(Рисунок 3, Панель 2).**
    - После того, как все таргетные области оценены, нажмите кнопку «Показать» для того, чтобы определить, были ли оценены 50 клеток, выберите дополнительные клетки, пока не будет проанализировано 50 клеток.

Запись результатов для статуса гена ALK

89. Система BioView Solo автоматически подсчитывает общее количество классифицируемых клеток, число позитивных клеток, процент позитивных клеток. Обратитесь к **Таблице 4** для установления диапазона ProbeChek ALK Контрольных слайдов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

90. Образец считается отрицательным, если <5 клеток из 50 (<5/50 или <10%) положительные.
91. Образец считается положительным, если >25 из 50 (>25/50 или >50%) положительные.
92. Образец считается сомнительным, если от 5 до 25 клеток (от 10 до 50%) положительные. Если образец сомнительный:

a. Оцените оставшиеся поля зрения и выберите 50 дополнительных клеток. Если 50 дополнительных клеток не доступны, слайд неинформативен – обратитесь к разделу **Неинформативный результат (Оценка слайдов на системе BioView).**

b. Просмотрите и реклассифицируйте дополнительные клетки в соответствии с FOV – Оценка и отбор клеток - для ткани рака легкого, заключенного в парафин.

c. Система BioView Solo автоматически подсчитывает процент положительных клеток из 100 клеток.

d. Если средний процент положительных клеток составляет <15% (<15/100), образец считается отрицательным.

e. Если средний процент положительных клеток составляет≥15% (≥15/100), образец считается положительным.

Неинформативные результаты (Оценка слайдов с помощью системы BioView)
Обозначить образец как Неинформативный, если образец не соответствует критериям качества, как описано в разделе **«Оценка слайдов» Адекватность гибридизации при интерпретации и результаты – Оценка слайдов с использованием системы анализа изображений BioView, Контроль качества.**

- Если в скрайбированной области меньше 50 опухолевых клеток, которые могут быть выбраны для слайда образца, образец слайда считается неинформативным.
- Если для сомнительного образца, 50 дополнительных опухолевых ядер не доступны для выбора, образец считается неинформативным.
- Для образцов неинформативных слайдов, отсканируйте слайд или повторите анализ с новыми слайдами.

Использование контрольных слайдов (Оценка слайдов с помощью системы BioView)

- Контрольные слайды должны быть запущены одновременно с образцами слайдов для мониторинга эффективности анализа и оценки эффективности подсчета сигналов. Контрольные слайды должны обрабатываться с образцами слайдов, начиная с этапа отжига слайдов (шаг 9).
- Контрольные слайды следует запускать каждый день, когда проводится FISH-тестирование и с каждым новым лотом набора.
- Установленный диапазон допустимых результатов тестирования для ProbeChek ALK Контрольных слайдов с помощью системы анализа слайдов и изображений BioView, указаны в **Таблице 4.**
- Если контрольный слайд не соответствует ни одному из критериев приемлемости, анализ, возможно, не был произведен должным образом или отдельные компоненты набора ALK Break Apart FISH Probe могли сработать неадекватно. Необходимо повторить анализ со свежими контрольными слайдами и клиническими образцами в случае необходимости.

Руководство и советы по устранению неполадок приведены **в Приложении А.**

ОГРАНИЧЕНИЯ

- **Предназначены только для диагностики in vitro**
- Для оптимального выполнения этого теста требуется соответствующая обработка образца, его подготовка и хранение, как описано в инструкции внутри упаковки.
- Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit был оптимизирован только для определения и количественного анализа реаранжировок гена ALK в зафиксированных в формалине и залитых парафином тканях НМРЛ человека. Тест должен проводиться только на зафиксированных в формалине (буфер формалиновый 10% нейтральный) образцах FFPE ткани рака легкого человека. Не используйте другие типы образцов или фиксаторы.
- Рабочие характеристики Vysis Break Apart FISH Probe Kit были определены только с помощью процедур, описанных в данном вкладыше. Изменения этих процедур могут привести к изменению рабочих характеристик теста.
- Клиническая интерпретация каких-либо результатов теста должна быть оценена в контексте истории болезни пациента и результатов других диагностических тестов.
- Результаты теста FISH могут быть неинформативны, если качество образца и/или препарата неадекватны.
- Лаборанты-технологи, проводящие суммирование сигналов FISH, должны быть в состоянии визуально различать оранжевые, зеленые и желтые сигналы.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Пороговое значение, норма
Нормальное пороговое значение определяется как максимальное число поддающихся подсчету интерфазных ядер со специфическим аномальным рисунком сигнала, при котором образец считается отрицательный для

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

данного рисунка сигналов. Нормальное пороговое значение выражается как процент или фактическое число нуклеарных рисунков FISH, положительных в отношении реаранжировки, от стандартного числа исследованных ядер. Нормальное пороговое значение было установлено на уровне 15% при использовании образцов FFPE ткани НМРЛ.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Локализация зонда на метафазных хромосомах

Место гибридизации Vysis ALK Break Apart FISH Probe было оценено на метафазных пластинках (всего восемь) препаратов культивируемых лимфоцитов с использованием технологии инвертированного DAPI-дифференциального окрашивания хромосом.

Было доказано, что зонды Vysis LSI 3'-ALK SpectrumOrange и Vysis LSI 5'-ALK SpectrumGreen FISH probes были оценены с помощью метафазных хромосом, взятых из 6 кариотипических нормальных образцов периферической крови пяти отдельных доноров (шести лотов препаратов).

В расчете чувствительности сигналы Vysis LSI 3'-ALK SO и Vysis LSI 5'-ALK SGn FISH probes суммировались для каждой метафазной пластинки (норма=2 сигнала). Всего по каждому зонду ожидалось 240 сигналов (2 сигнала на клетку ×20 метафазных пластинок на лот ×6 лотов препаратов). **См. Таблицу 5.**

В расчете специфичности суммировалось число метафазных пластинок с ожидаемым рисунком сигналов. Было рассмотрено всего 120 метафазных пластинок (20 метафазных пластинок × 6 лотов препаратов). **См. Таблицу 6.**

Для каждого зонда аналитическая чувствительность была рассчитана как 100,0% (240/240) (95% ДИ 98,5-100,0) и аналитическая специфичность – 100% (120/120) (95% ДИ 97,0-100,0).

Таблица 5. Аналитическая чувствительность

	Кол. сигналов метафазных хромосом	**Чувствительность**		
Зонд	**Всего истинно положительных**	**Всего, ожидаемый**	**Точечная оценка (%)**	**95% ДИ**
Vysis LSI 3'-ALK SO	240	240	100.0	(98.5, 100.0)
Vysis LSI 5'-ALK SGn	240	240	100.0	(98.5, 100.0)

Таблица 6. Аналитическая специфичность

	Кол. сигналов метафазных хромосом	**Специфичность**			
Зонд	**Всего ложнополож.**	**Всего истинно полож.**	**Всего, ожидаемый**	**Точечная оценка (%)**	**95% ДИ**
Vysis LSI 3'-ALK SO	0	120	120	100,0	(97.0, 100.0)
Vysis LSI 5'-ALK SGn	0	120	120	100,0	(97.0, 100.0)

Микробиологическая контаминация

Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit отвечает требованиям к неконтролируемому микробиологическому продукту в соответствии с «Инструкцией по производству реагентов In Vitro дигностики», 1/10/1994, так как ни в одном из реагентов не происходит рост селектированных микроорганизмов, и реагенты на самом деле убивают использованный инокулум микроорганизмов, о чем говорит отсутствие роста на субкультуре. Кроме того, при исследовании реагентов с использованием обычной процедуры контроля качества все реагенты работали удовлетворительно даже после трех дней инкубации с селектированными организмами при 35-37°C.

Воспроизводимость препарата контроля с использованием ручных методов

Воспроизводимость препарата контроля была исследована с использованием трех лотов как ProbeChek ALK Отрицательные контрольные слайды так и ProbeChek ALK Положительные контрольные слайды. Каждый лот тестировали 5 разных дней в течении 23-дневного периода, ее оценивали 3 специалиста всего по 90 точкам данных (3 лота × 5 серий тестов × 3 специалиста =45 оценок на каждый тип препарата контроля).

По каждому образцу рисунки сигналов 50 ядер были оценены методом подсчета наслоившихся сигналов, одиночных оранжевых сигналов и одиночных зеленых сигналов каждой мишени, выявленных каждым специалистом.

На уровне достоверности в 0,05 между 3 специалистами не было обнаружено статистических расхождений в классификации FISH в соответствии с тестом Fisher-Freeman-Halton (**См. Таблицу 7 и Таблицу 8**). Таким

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

образом, было продемонстрировано, что препараты контролей ProbeChek ALK Отрицательные контрольные слайды и ProbeChek ALK Положительные Контрольные Слайды должны быть классифицированы как воспроизводимые. Все препараты в этом исследовании были в рамках спецификаций.

Таблица 7. Воспроизводимость препаратов отрицательного контроля ProbeChek ALK Negative Control Slides

	Число результатов с процентом ALK реаранжировок		
Специалист	**В рамках спецификации (%)**	**Выходящий за рамки спецификации (%)**	**Всего**
1	15	0	15
2	15	0	15
3	15	0	15

Fisher-Freeman-Halton P value =1.00

Таблица 8. Воспроизводимость препаратов положительного контроля ProbeChek ALK Positive Control Slides

	Число результатов с процентом ALK реаранжировок		
Специалист	**В рамках спецификации (%)**	**Выходящий за рамки спецификации (%)**	**Всего**
1	15	0	15
2	15	0	15
3	15	0	15

Fisher-Freeman-Halton P value =1.00

Воспроизводимость ткани с использованием ручных методов

Воспроизводимость ткани оценивали с использованием срезов FFPE рака легкого. Это исследование проводилось на шести серийных срезах (5 мкм), приготовленных из двадцати блоков образцов FFPE НМРЛ. В панель входили три положительных образца с >50% клеток с ALK реаранжировками, три образца в диапазоне 10%-50% клеток с ALK реаранжировками и четырнадцать образцов с <10% клеток с ALK реаранжировками. Два препарата были приготовлены из каждого образца, каждый препарат оценивался двумя специалистами. Была оценена воспроизводимость между специалистами **(Таблица 9)** и между препаратами **(Таблица 10).**

Анализ данных между специалистами и между препаратами показал, что Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit репродуктивен, Fisher-Freeman-Halton P значение =1.00.

Таблица 9. Воспроизводимость между специалистами

	Число образцов панели		
Специалист	**Отрицательный**	**Положительный**	**Всего**
1	14	6	20
2	14	6	20
3	14	6	20

Fisher-Freeman-Halton P value =1.00

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 10. Воспроизводимость между препаратами

	Число образцов панели		
Препарат	**Отрицательный**	**Положительный**	**Всего**
1	14	6	20
2	15	5	20
3	14	6	20

Fisher-Freeman-Halton P value =1.00

Внешняя воспроизводимость с использованием ручных методов

Воспроизводимость Vysis Break Apart FISH Probe Kit оценивалась в трех внешних лабораториях методом тестирования кодированной, рандомизированной панели, 12 образцов (6 индивидуальных образцов, по 2 препарата на каждый), состоящей из четырех индивидуальных ALK-положительных образцов FFPE ткани НМРЛ с различными уровнями положительности (образцы панели 1,2,3, и 6) и двух индивидуальных ALK-отрицательных образцов FFPE ткани НМРЛ (образцы панели 4 и 5).

В оценке были использованы три лота реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Каждая серия теста состояла из одного повтора препарата отрицательного контроля ProbeChek Negative Control, препарата положительного контроля ProbeChek Positive Control и каждого образца панели. Каждая из трех клинических лабораторий исследовала воспроизводимость панели, используя два из трех клинических лота. Каждый из двух лаборантов-технологов в трех лабораториях суммировал раз в день 6 экспериментальных образцов и препараты контроля, каждый лот реагентов 5 разных дней, в течении 20-дневного периода. В каждой лаборатории было оценено 120 препаратов образцов, всего 360. В результате было получено 240 подсчетов в каждой лаборатории, минимум 720 подсчетов. В каждой лаборатории были исследованы 40 препаратов контролей (20 положительных и 20 отрицательных), всего 120. В результате было получено 80 подсчетов в каждой лаборатории, минимум 240 подсчетов. Два специалиста суммировали рисунки сигналов 50 ядер по каждому препарату образца панели и контроля.

Общий коэффициент каппа составлял 0,92 (95% ДИ 0,85-0,98). Z-показатель в 27,08, что больше 1,96, показал, что коэффициент значительно отличается от нуля на уровне значимости 0,05. Эти результаты представлены в **Таблице 11.** Общий процент согласованности (PA) между результатами всех специалистов был 97,64% (95% ДИ 96,25-98,52). Процент согласованности положительных результатов (PPA) – 96,46% (95% ДИ 94,40-97,78) и отрицательных (NPA) – 100,00% (95% ДИ 98,42-100,00). Результаты представлены в **Таблице 12**. Коэффициент каппа указывает на воспроизводимость для каждой лаборатории в диапазоне от 0,83 до 0,96, для каждого лота в диапазоне от 0,86 до 0,96. Результаты представлены в **Таблицах 13 и 14** соответственно.

Таблица 11. Общая воспроизводимость

	Количество препаратов по лабораториям/лотам/сериям		
Номер панели	**Отрицательный**	**Положительный**	**Всего**
1	1	59	60
2	0	60	60
3	2	58	60
4	60	0	60
5	60	0	60
6	4	56	60

Kappa-Statistic: 0.92 (95% Cl 0.85 до 0.98)

Таблица 12. Процент согласованности всеми специалистами с ожидаемыми результатами

	Ожидаемые результаты		
Результаты специалистов	**Положительный**	**Отрицательный**	**Всего**
Положительный	463	0	463
Отрицательный	17	240	257
Всего	480	240	720

PA: 97.64 (95% Cl 96.25 до 98.5
PPA: 96.46 (95% Cl 94.40 до 97.78)
NPA: 100.00 (95% Cl 98.42 до 100.00)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 13. Воспроизводимость по лаборатории

Количество препаратов по лотам/сериям/специалистам						Каппа анализ	
Лаб.	**Образец панели**	**Отрицательный**	**Положительный**	**Каппа**	**95% ДИ**	**Стандартная ошибка**	**Z-показатель**
1	1	0	20	0.96	(0.83, 1.00)	0.068	14.21
	2	0	20				
	3	0	20				
	4	20	0				
	5	20	0				
	6	1	19				
2	1	0	20	0.96	(0.83, 1.00)	0.068	14.21
	2	0	20				
	3	0	20				
	4	20	0				
	5	20	0				
	6	1	19				
3	1	1	19	0.83	(0.72, 0.94)	0.056	14.90
	2	0	20				
	3	2	18				
	4	20	0				
	5	20	0				
	6	2	18				

Таблица 13. Воспроизводимость по лоту

Количество препаратов по лотам/сериям/специалистам						Каппа анализ	
Лот	**Образец панели**	**Отрицательный**	**Положительный**	**Каппа**	**95% ДИ**	**Стандартная ошибка**	**Z-показатель**
1	1	0	20	0.86	(0.75, 0.98)	0.059	14.75
	2	0	20				
	3	0	18				
	4	20	0				
	5	20	0				
	6	2	18				
2	1	0	20	0.96	(0.83, 1.00)	0.068	14.21
	2	0	20				
	3	0	20				
	4	20	0				
	5	20	0				
	6	1	19				
3	1	1	19	0.93	(0.80, 1.00)	0.065	14.34
	2	0	20				
	3	0	20				
	4	20	0				
	5	20	0				
	6	1	19				

Информация о клинических испытаниях

Монотерапия препаратом XALKORI в лечении местно-распространенного или метастатического ALK-позитивного НМРЛ было проведено в 2 центрах, одиночные исследования (исследования A и B). Пациентам, зачисленным в эти исследованиях, ранее проводилась системная терапия, за исключением 15 пациентов в исследовании B, которым ранее не было проведено системное лечение местно-прогрессирующего или метастатического заболевания. Данные для исследования B не показаны, так как ALK-позитивность была идентифицирована с использованием ряда локальных анализов. В исследовании A ALK-положительный НМРЛ был идентифицирован с использованием Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Первичная конечная точка эффективности в обоих исследованиях была объективной частотой ответов (ОЧО) в соответствии с критериями оценки в твердых опухолях (RECIST). Ответ был оценен исследователем и независимой комиссией по радиологии. Была также оценена продолжительность ответа (ПО). Пациенты получили 250 мг XALKORI перорально два раза в день. Демографические характеристики и характеристики заболевания для исследования A приведены в **Таблице 15.**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 15. Демографические характеристики и характеристики заболевания исследования группы А		
Характеристики		**N=136**
Пол, число (%)		
	Мужской	64 (47)
	Женский	72 (53)
Возраст (года)		
	Медиана (диапазон)	52 (29-82)
Раса, число (%)		
	Белые	87 (64)
	Черные	5 (4)
	Азиаты	43 (32)
	Другие	1 (1)
Состояние эффективности ECOG на базовом уровне, n (%)		
	0	37 (27)
	1	74 (54)
	2-3[a]	25 (18)
Статус курильщика, n (%)		
	Некурящие	92 (68)
	Бывшие курильщики	39 (29)
	Курильщики	5 (4)
Стадия заболевания, n (%)		
	Местнораспространенное заболевание	9 (7)
	Метастазирование	127 (93)
Гистологическая классификация, n (%)		
	Аденокарцинома	130 (96)
	Крупноклеточный рак	1 (1)
	Плоскоклеточный рак	0
	Аденосквамозная карцинома	3 (2)
	Другие виды	2 (2)
Предварительная системная терапия местно-распространённого или метастатического заболевания – количество режимов, n (%)		
	1	13 (10)
	2	37 (27)
	3	37 (27)
	≥4	49 (36)

Сто тридцать шесть пациентов с местно-распространенным или метастатическим ALK-положительным НМРЛ из группы исследования А проанализировали во время отсечения данных. Средняя продолжительность лечения составила 22 недели. Основанные на оценке исследователей, выявлен 1 полный и 67 частичных ответов на ОРР 50% (95% ДИ от 42% до 59%). Семьдесят девять процентов объективных ответов опухоли были достигнуты в течение первых 8 недель лечения. Средняя продолжительность ответа составила 41,9 недели. Данные по эффективности исследования в группе А представлены в **Таблице 16**.

Таблица 16. Местно-распространённый или метастатический ALK-позитивный НМРЛ. Результаты эффективности исследования пациентов из группы А[a], с использованием ДНК-зонда Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit

Параметры эффективности	**N=136**
ORR (CR +PR)[b] (% [95% Cl])	50% (42%, 59%)
Количество респондентов	68
Продолжительность ответа[c] (медиана (диапазон) недели)	41.9 (6.1+, 42.1+)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Соответствие между Ручным и Автоматическими методами

Соответствие между ручным и автоматическим методами было оценено путем тестирования образцов FFPE НМРЛ как ручной, так и автоматизированной обработкой слайдов на системе VP 2000, а также ручными и автоматизированными методами оценки слайдов BioView (BioView) 4 различными тестовыми методами:

• Метод 1: Ручная обработка слайдов / ручная оценка слайдов
• Метод 2: ручная обработка слайдов / оценка слайдов на системе BioView
• Метод 3: обработка слайдов на станции VP 2000 / ручная оценка слайдов
• Метод 4: обработка слайдов на станции VP 2000 / оценка слайдов на системе BioView

Сорок девять образцов были использованы, в том числе 14 ALK-положительных и 35 ALK-отрицательные образцов. Тканевые блоки были разделены на секции 5-мкм и закрепленные на предметных стеклах микроскопа. Четыре слайда каждого образца были исследованы; 2 слайда были обработаны с использованием ручного метода, а два других с использованием станции VP 2000. После обработки оценивался каждый набор из 2 слайдов, используя ручной метод оценки слайдов (метод 1 и метод 3), а затем оценка производилась с использованием системы BioView (метод 2 и метод 4). Всего 98 результатов слайдов были включены в каждый из последующих анализов:

Анализ метода 1 (ссылка) против метода 2 показал PA 92,86% (91/98) (95% ДИ от 85,98 до 96,50), PPA 92,86% (26/28) (95% ДИ от 77,35 до 98,02) и NPA 92,86% (65/70) (95% ДИ 84,34 до 96,91). Результаты представлены в **Таблице 17**.

Анализ метода 1 (эталонной) и метода 3 показал PA 94,90% (93/98) (95% ДИ от 88,61 до 97,80), PPA 96,43% (27/28) (95% ДИ от 82,29 до 99,37) и НПА 94,29% (66/70) (95% ДИ от 86,21 до 97,76). Результаты представлены в **Таблице 18.**

Анализ метода 1 (ссылка) против метода 4 показал PA 94,90% (93/98) (95% ДИ от 88,61 до 97,80), PPA 92,86% (26/28) (95% ДИ от 77,35 до 98,02) и NPA 95,71% (67/70) (95% ДИ от 88,14 до 98,53). Результаты представлены в **Таблице 19.**

Таблица 17. Анализ для метода один (Ручной метод обработки слайдов/Оценки слайдов) против метода 2 (Ручной метод обработки слайдов/Анализ слайдов на системе BioView)

		Метод 1 (Ручной/Ручной)		
		Положительный	**Отрицательный**	**Всего**
Метод 2 (Ручной/BioView)	**Положительный**	**26**	**5**	**31**
	Отрицательный	**2**	**65**	**67**
	Всего	**28**	**70**	**98**

PA: 92.86 (95% Cl 85.98 до 96.50)
PPA: 92.86 (95% Cl 77.35 до 98.02)
NPA: 92.86 (95% Cl 84.34 до 96.91)

Таблица 18. Анализ соглашений для метода 1 (Ручной метод обработки слайдов/Оценки слайдов) против метода 3 (Обработка слайдов на станции VP2000/Ручной метод оценки слайдов)

		Метод 1 (Ручной/Ручной)		
		Положительный	**Отрицательный**	**Всего**
Метод 3 (VP2000/Ручной метод)	**Положительный**	**27**	**4**	**31**
	Отрицательный	**1**	**66**	**67**
	Всего	**28**	**70**	**98**

PA: 94.90 (95% Cl 86.61 до 97.80)
PPA: 96.43 (95% Cl 82.29 до 99.37)
NPA: 94.29 (95% Cl 86.21 до 97.76)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 19. Анализ соглашений для метода 1 (Ручной метод обработки слайдов/Оценки слайдов) против метода 4 (Обработка слайдов на станции VP2000/Анализ слайдов)

		Метод 1 (Ручной/Ручной)		
		Положительный	**Отрицательный**	**Всего**
Метод 4 (VP2000/BioView)	**Положительный**	**26**	**3**	**29**
	Отрицательный	**2**	**67**	**69**
	Всего	**28**	**70**	**98**

PA: 94.90 (95% Cl 88.61 до 97.80)
PPA: 92.86 (95% Cl 77.35 до 98.02)
NPA: 95.71 (95% Cl 88.14 до 98.53)

Воспроизводимость с использованием автоматизированных методов

Воспроизводимость комплекта VISH ALK Break Apart FISH Probe Kit была оценена в 3 внутренних лабораториях путем тестирования закодированной, рандомизированной 6-элементной панели образцов, состоящей из 3 уникальных ALK-позитивных образцов тканей НМРЛ с различными уровнями позитивности (участник панели 4, 5 и 6) и 3 уникальные ALK-негативные образцов ткани НМРЛ (участник панели 1, 2 и 3).
Прогон состоял из одной копии каждого участника панели. Каждая панель участника была обработана на системе VP 2000 и оценена один раз с помощью ручного метода оценки слайдов, затем оценивалась дважды (2 исследователя) с использованием метода оценки слайдов на системе BioView в каждой из 3 лаборатории, на 5 прогонов в течение 5 последовательных дней, в течение как минимум 20 дней. Каждая лаборатория оценила 30 образцов слайдов, которые дали 30 результатов оценки слайдов вручную и 60 оценок слайдов на системе BioView.
Результаты. В результате было получено 90 результатов оценки слайдов ручным методом и 180 результатов оценки слайдов на системе BioView для всех лабораторий.
Общий коэффициент каппа был 1,00 (95% ДИ от 0,92 до 1,00) с использованием обработки слайдов на системе VP 2000 и оценки слайдов ручным методом.
Оценка z составила 25,10, что больше на 1,96, показывая, что коэффициент Каппа значительно отличается от нуля на уровне 0,05 значимости. Результаты представлены в **Таблице 20**.
Общий коэффициент каппа был 1,00 (95% ДИ от 0,96 до 1,00) с использованием метода обработки слайдов на системе VP 2000 и оценки слайдов с использованием системы BioView.
Оценка z составила 51,09, что превышает на 1,96, показывая, что коэффициент Каппа значительно отличается от нуля на уровне 0,05 значимости. Результаты представлены в **Таблице 21**.
При обработке слайдов на системе VP 2000 и оценка слайдов ручным методом, ПА между всеми результатами исследователей был 100,00% (90/90) (95% ДИ от 95,91 до 100,00). PPA составил 100,00% (45/45) (95% ДИ от 92,13 до 100,00), а NPA составил 100,00% (45/45) (95% ДИ от 92,13 до 100,00). Результаты представлены в **Таблице 22**. При обработке слайдов на системе VP 2000 и оценки слайдов на системе BioView, ПА между всеми результатами читателя был 100,00% (180/180) (95% ДИ от 97,91 до 100,00). PPA составил 100,00% (90/90) (95% ДИ от 95,91 до 100,00), а NPA составил 100,00% (90/90) (95% ДИ 95,91–100,00). Результаты представлены в **Таблице 23.**

Таблица 20. **Общая воспроизводимость с использованием автоматизированной системы обработки слайдов VP 2000 и метод оценки слайдов**

	Количество слайдов в лабораториях/прогонах		
Номер панели	**Отрицательный**	**Положительный**	**Всего**
1	0	15	15
2	0	15	15
3	0	15	15
4	15	0	15
5	15	0	15
6	15	0	15

Kappa-Statistic: 1.00 (95% Cl 0.92 до 1.00)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 21. Общая воспроизводимость с использованием автоматизированной системы обработки слайдов VP 2000 и метод оценки слайдов на системе BioView

	Количество слайдов в лабораториях/прогонах/среди		
Номер панели	**Отрицательный**	**Положительный**	**Всего**
1	0	30	30
2	0	30	30
3	0	30	30
4	30	0	30
5	30	0	30
6	30	0	30

Kappa-Statistic: 1.00 (95% Cl 0.96 до 1.00)

Таблица 22. Процентное соотношение с ожидаемыми результатами с использованием станции для обработки слайдов VP 2000 и ручным методом оценки слайдов

	Ожидаемые результаты		
Результаты исследователей	**Отрицательный**	**Положительный**	**Всего**
Положительный	45	0	45
Отрицательный	0	45	45
Всего	45	45	90

PA: 100.00 (95% Cl 95.91 до 100.00)
PPA: 100.00 (95% Cl 92.13 до 100.00)
NPA: 100.00 (95% Cl 88.14 до 98.53)

Таблица 23. Процентное соотношение с ожидаемыми результатами с использованием станции для обработки слайдов VP 2000 и методом оценки слайдов с использованием системы BioView

	Ожидаемые результаты		
Результаты исследователей	**Отрицательный**	**Положительный**	**Всего**
Положительный	90	0	90
Отрицательный	0	90	90
Всего	90	90	180

PA: 100.00 (95% Cl 97.91 до 100.00)
PPA: 100.00 (95% Cl 96.91 до 100.00)
NPA: 100.00 (95% Cl 95.91 до 100.00)

Воспроизводимость набора для предподготовки на станции VP2000

Была проведена оценка воспроизводимости партий для набора предварительной обработки на станции VP 2000 путем внутреннего тестирования срезов ткани опухоли легкого, состоящих из 2 уникальных ALK-положительные образцов тканей с различными уровнями позитивность и 1 уникальный ALK-отрицательный образец ткани НМРЛ. Воспроизводимость оценивалась с использованием 3 уникальных партий на станции VP 2000. Реагенты для предварительной обработки, испытывались в течение 3 дней (1 лот в день) с использованием VP 2000. Для каждого лота 6 слепых предметных стекол (3 панели участников, работающие в двух экземплярах), каждый был оценен дважды независимым исследователем, в общей сложности было оценено 36 результатов. Общее процентное соглашение (PA) с ожидаемым результатом по лотам составило 100,00% (95% ДИ от 90,26% до 100,00%). Положительный процент (PPA) составил 100,00% (95% ДИ от 85,75% до 100,00%). Отрицательное процентное соотношение (NPA) составило 100,00% (95% CI 73,54% к 100.00%).
Результаты представлены в **Таблице 24**.

Таблица 24. Общее процентное соотношение по лотам/панели участников с ожидаемыми результатами для набора предподготовки на станции VP2000

	Ожидаемые результаты		
Результаты	**Положительный**	**Отрицательный**	**Всего**
Положительный	24	0	24
Отрицательный	0	12	12
Всего	24	12	36

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Соглашения	Pt. Est.	Соотношение	Точный 95.00% (ДИ)
PA	100.00%	36/36	(90.26%, 100.00%)
PPA	100.00%	24/24	(85.75%, 100.00%)
NPA	100.00%	12/12	(73.54%, 100.00%)

Воспроизводимость слайдов с использованием Автоматизированных методов

Воспроизводимость ProbeChek ALK отрицательного и положительного контрольных слайдов была оценена в 3 внутренних лабораториях. Пробег состоял из 2 отрицательных и 2 положительных контрольных слайдов. Каждый контрольный слайд был обработан на станции VP 2000 и оценен один раз ручным методом оценки, затем оценен дважды (2 исследователями) с использованием метода оценки на станции BioView в каждой из 3 лабораторий, по 5 прогонов в течении 5 дней, не следующих друг за другом - минимум 20 дней. Каждая лаборатория оценила 20 контрольных слайдов, что дало 20 результатов ручного метода оценки слайдов и 40 результатов оценки слайдов на системе BioView. Это привело в общей сложности к 60 оценкам слайдов вручную и 120 оценкам слайдов на системе BioView. При обработке слайдов на станции VP 2000 и оценки слайдов ручным методом, процент контрольных слайдов в пределах установленного диапазона был рассчитан как 100,00% (60/60) (95% ДИ 93,98 до 100,00). Результаты представлены в **Таблице 25**.

При обработке слайдов на станции VP 2000 и оценки слайдов на системе BioView, процент контрольных слайдов в пределах установленного диапазона был рассчитан как 100% (120/120) (95% ДИ 96,90 до 100,00). Результаты представлены в **Таблице 26.**

Таблица 25. Процент контрольных слайдов (ProbeChek ALK-положительный и отрицательный слайды комбинированнные) в пределах установленного диапазона с использованием станции VP2000 для обработки слайдов и ручного метода оценки слайдов

	Количество слайдов в лабораториях/прогонах/среди		
Номер контрольного слайда Результаты	**Номер контрольного слайда Результаты в пределах установленного диапазона**	**Процент (%) контрольных слайдов Результаты в пределах установленного диапазона**	**Двусторонний 95% (CI)**
60	60	100.00	(93.98, 100.00)

Таблица 25. Процент контрольных слайдов (ProbeChek ALK-положительный и отрицательный слайды комбинированнные) в пределах установленного диапазона с использованием станции VP2000 для обработки слайдов и метода оценки слайдов на системе BioView

Количество слайдов в лабораториях/прогонах/среди			
Номер контрольного слайда Результаты	**Номер контрольного слайда Результаты в пределах установленного диапазона**	**Процент (%) контрольных слайдов Результаты в пределах установленного диапазона**	**Двусторонний 95% (CI)**
120	120	100.00	(96.90, 100.00)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer.
Nature. 2007;448 (7153):561-566.
2. Takeuchi K, Choi YL, Soda M, et al. Multiplex reverse transcription PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res.* 2008;14 (20):6618-6624.
3. Perner S, Wagner PL, Demichelis F, et al. EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event. *Neoplasia.* 2008;10(3):298-302.
4. Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell.* 2007;131(6):1190-1203.
5. Choi YL, Takeuchi K, Soda M, et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2008;68 (13):4971-4976.
6. Soda M, Takada S, Takeuchi K, et al. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105 (50):19893-19897.
7. Takeuchi K. Choi YL, Togashi Y, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based
diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15 (9):3143-3149.
8. Wong DW, Leung EL, So KK, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer.* 2009;115 (8);1723-1733.
9. Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14 (13):4275-4283.
10. Camidge DR, Kono SA, Flacco A, et al. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res.* 2010;16 (22):5581-5590.
11. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.*
2010;363 (18):1693-1703.
12. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). *Non-Small Cell Lung Cancer (Version 2.2013)*. 2013 National Comprehensive Cancer Network, Inc. Available at: NCCN.org. Accessed July 29, 2013.
13. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001;2 (9):533-543.
14. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2002;52 (1):23-47.
15. McDermott U, Iafrate AJ, Gray NS, et al. Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Cancer Res.* 2008;68 (9):3389-3395.
16. Christensen JG, Zou HY, Arango ME, et al. Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther.* 2007;6 (12):3314-3322.
17. Ardini E, Magnaghi P, Orsini P, Galvani A, Menichincheri M. Anaplastic lymphoma kinase: role in specific tumours, and
development of small molecule inhibitors for cancer therapy. *Cancer Lett.* 2010;299 (2):81-94.
18. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013;368 (25)2385-2394.
19. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.* 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. Available at: http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm. Accessed March 28, 2011.
20. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030, *Bloodborne Pathogens*.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline- Fourth Edition*. CLSI Document M29-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
22. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефонам (1-800-553-7042) (в США) +49-6122-580 (другие регионы) или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit и другие ДНК-пробы защищены патентом США. Патенты 5,663,319 и 5,491,224. Vysis LSI, меченые флуорохромами ДНК-пробы, защищены патентом США. Патенты RE40, 494, 6,596,479, 7,115,709, 7, 5,756, 696 и 6,607,877, 6,280,929 даны исключительно на продукцию Abbott Molecular Inc Калифорнийским Университетом. Методы детекции гибридизационных сигналов одновременно защищены патентами США. Патент 6,203,977 даны на продукцию Abbott Molecular Inc., Йельским университетом.

Vysis, LSI, ProbeCheck и VP 2000 – торговые марки группы компании Abbott в различных юрисдикциях.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines. IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany

© 2013, 2016 Abbott Laboratories

www.abbottmolecular.com

Октябрь 2016
30-608916/R4

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

/Логотип/ PathVysion
Набор ДНК-зондов HER-2
DNA Probe Kit II

RU

ИСХ. № 06N46
30-608493/R6

PathVysion
Набор ДНК-зондов HER-2 DNA Probe Kit II
ИСХ. № 06N46
30-608493/R6

Описание используемых символов

	Производитель
ИСХ. №	Исходный номер
ПАРТИЯ	Номер партии
Диагностика in-vitro	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Содержит достаточное количество тестов
	Ограничение температур
	Ограничение температур
	Биологическая опасность
	Опасность
	Опасность
	Опасность
	Опасность
	См. руководство по эксплуатации
	Использовать до
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

Набор ДНК-зондов PATHVYSION HER-2 DNA PROBE KIT II
Номер по списку 06N46-030 (20 тестов)/
Номер по списку 06N46-035 (50 тестов)/
Номер по списку 06N46-036 (100 тестов)/

ПРЕДУСМОТРЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Набор ДНК-зондов PathVysion HER-2 DNA Probe Kit II (PathVysion Kit II) предназначен для определения амплификации гена HER-2/*neu* посредством флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) в зафиксированных формалином и залитых парафином образцах ткани молочной железы и желудка человека.

Результаты, полученные при использовании набора PathVysion Kit II по показанию рак молочной железы, предназначены для использования в качестве дополнения к существующей клинической и патологической информации, которая в настоящее время используется в качестве прогностических факторов у пациентов с раком молочной железы стадии II с поражением лимфатических узлов. Набор PathVysion Kit II также показан в качестве вспомогательного средства для прогнозирования выживаемости без признаков заболевания и общей выживаемости у пациентов с раком молочной железы стадии II с поражением лимфатических узлов, получавших адъювантную химиотерапию циклофосфамидом, доксорубицином и 5-фторурацилом (CAF). Набор PathVysion II показан в качестве вспомогательного средства при оценке пациентов с раком молочной железы, для которых рассматривается возможность лечения препаратом HERCEPTIN® (трастузумаб) (см. листок-вкладыш к препарату HERCEPTIN).

Предупреждение:

Следующее предупреждение относится только к показанию использования набора PathVysion Kit II при лечении рака молочной железы.

Выбор терапии препаратом HERCEPTIN

ПРИМЕЧАНИЕ. Все пациенты, участвовавшие в клинических исследования препарата HERCEPTIN, были отобраны с использованием исследуемого иммуногистохимического анализа (анализ, валидированный для клинических исследований [CTA]). Ни один из пациентов в этих исследованиях не был выбран с использованием теста PathVysion. Тест PathVysion сравнивали с CTA на подмножестве образцов, полученных в клинических исследованиях. Было обнаружено, что он дает приемлемо согласующиеся результаты. Фактическая корреляция теста PathVysion с клиническими исходами, отмеченными при приеме препарата HERCEPTIN в проспективных клинических исследованиях, не установлена.

Выбор адъювантной терапии

Тест PathVysion не предназначен для использования с целью скрининга или диагностики рака молочной железы. Он предназначен для использования в качестве дополнения к другим прогностическим факторам, в настоящее время используемым для прогнозирования выживаемости без признаков заболевания и общей выживаемости у пациентов с раком молочной железы стадии II с поражением лимфатических узлов, а решение о неиспользовании лечения у пациентов с раком молочной железы стадии II с поражением лимфатических узлов должно быть основано только на статусе амплификации гена HER-2/*neu*. Некоторым пациентам с раком молочной железы, у которых не было выявлено амплификации гена HER-2/*neu*, все же может быть полезна адъювантная терапия циклофосфамидом, доксорубицином, 5-фторурацилом (CAF) на основе других прогностических факторов, которые предсказывают неблагоприятный исход (например, размер опухоли, количество пораженных лимфатических узлов и гормон-рецепторный статус). И наоборот, отобранные пациенты с раком молочной железы, у которых была выявлена амплификация гена, не могут быть кандидатами на лечение CAF из-за ранее существовавших или сопутствующих заболеваний.

Требуемое обучение

Abbott Molecular проведет обучение по подготовке образцов, процедуре анализа и интерпретации результатов FISH-тестирования гена HER-2/*neu* для неопытных пользователей. Также рекомендуется, чтобы лаборатория, которая ранее проходила обучение, но теперь имеет новый персонал, выполняющий анализ, запросила обучение для новых пользователей.

ОБЗОР И ПОЯСНЕНИЯ

В 2008 году рак молочной железы был самым распространенным раком (22,9%/1 384 155) и самой частой причиной смерти от рака (13,7%/458 503) среди женщин во всем мире.[1] Рак желудка был четвертым самым распространенным раком (9,7%/640 031) и третьей наиболее частой причиной смерти у мужчин (11,0%/463 930), а также был пятым самым распространенным раком (5,8%/348 571) и пятой наиболее частой причиной смерти у (8,2%/273 489) у женщин.[1]

Рак молочной железы

После операции рак молочной железы с поражением подмышечных лимфатических узлов, на которые приходится 30% всех случаев рака молочной железы,[2] связан с более короткой выживаемостью без признаков заболевания[3,4] и более короткой общей выживаемостью[5], чем рак молочной железы без поражения лимфатических узлов. Считается, что пациентам с раком молочной железы и поражением подмышечных лимфатических узлов при постановке диагноза следует предлагать адъювантное системное лечение.

Было доказано, что амплификация или сверхэкспрессия гена HER-2/*neu* (ERBB2) является индикатором плохого прогноза при раке молочной железы с поражением лимфатических узлов.[6-10] В одном исследовании прогностическая ценность статуса HER-2/*neu*, по-видимому, больше среди пациентов, получавших химиотерапию.[7]

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Однако при прогнозировании выживаемости без признаков заболевания и общей выживаемости у отдельных пациентов необходимо также учитывать другие установленные прогностические факторы, такие как размер опухоли, количество пораженных лимфатических узлов и гормон-рецепторный статус.

Метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) использовался для обнаружения амплификации гена HER-2/*neu* в клеточных линиях карциномы молочной железы человека как в интерфазных, так и в метафазных клетках.[11-14] Метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH), по-видимому, является альтернативным методом, способным преодолеть многие из присущих им технических и интерпретационных ограничений других методов, таких как иммуногистохимия.[15] Для количественного определения амплификации гена HER-2/*neu* FISH позволяет оценить не только уровень амплификации гена HER-2/*neu* непосредственно в опухолевых клетках, сохраняя характерную морфологию исследуемой ткани, но также и пространственное распределение копий онкогенов в отдельных первичных карциномах молочной железы.

Рак желудка

Амплификация или сверхэкспрессия гена HER-2/*neu* была продемонстрирована у 22% пациентов с распространенным раком желудка, прошедших скрининг на статус HER-2/*neu*.[16]

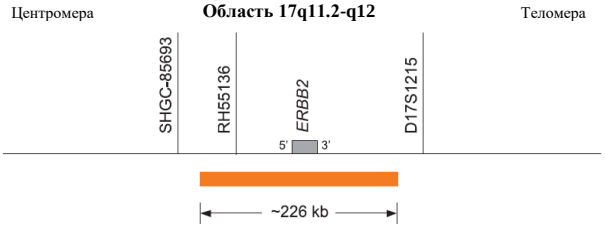
Для количественного определения амплификации гена HER-2/*neu* FISH позволяет оценить не только уровень амплификации гена HER-2/*neu* непосредственно в опухолевых клетках, сохраняя характерную морфологию исследуемой ткани, но также и пространственное распределение копий онкогенов в отдельных первичных карциномах молочной железы.

Метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) использовался для обнаружения амплификации гена HER-2/*neu* в клеточных линиях карциномы желудка человека.[16-19] Кроме того, статус HER-2/*neu* в первичных и парных метастатических участках аденокарциномы желудка показал высокую согласованность по FISH. Это говорит о том, что при раке желудка статус HER-2/*neu* в большинстве случаев во время метастатического процесса не изменяется.[19]

ОСНОВЫ ПРОЦЕДУРЫ

Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) - это метод, позволяющий визуализировать специфические последовательности нуклеиновых кислот в клеточном препарате. В частности, флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) для ДНК включает в себя точный отжиг одноцепочечного, меченного флуорофором ДНК-зонда до последовательностей-мишеней комплементарного гена. Гибридизация зонда с центром клеточной ДНК видна при прямом обнаружении с помощью флуоресцентной микроскопии. ДНК-зонд Locus Specific Identifier (LSI) HER-2/*neu* представляет собой флуоресцентный ДНК-зонд SpectrumOrange (SO) размером примерно 226 т.п.н., специфичный для локуса гена HER-2/*neu* (17q11.2-q12). ДНК-зонд Chromosome Enumeration Probe (CEP) 17 представляет собой флуоресцентный ДНК-зонд SpectrumGreen (SG) размером приблизительно 5,4 т.п.н., специфичный для последовательности альфа-сателлитной ДНК в центромерной области хромосомы 17 (17p11.1-q11.1). Для простоты использования зонды предварительно смешивают и предварительно денатурируют в буфере для гибридизации. Немеченая блокирующая ДНК также включена в зонды для подавления последовательностей, содержащихся в целевых локусах, являющихся общими для других хромосом. Набор PathVysion Kit II предназначен для обнаружения амплификации гена HER-2/*neu* в зафиксированных формалином и залитых парафином (FFPE) образцах ткани молочной железы и желудка человека методом FISH.

Зафиксированные формалином и залитые парафином образцы ткани помещают на стекла. Образцы проходят серию этапов предварительной химической и ферментативной обработки для повышения доступности ДНК для гибридизации. ДНК денатурируют до одноцепочечной формы, а затем проводят гибридизацию с зондами. После гибридизации свободный зонд удаляется серией промывок, а ядра окрашиваются при помощи DAPI (4',6 диамидино-2-фенилиндол), ДНК-специфичным окрашивающим средством, которое флуоресцирует синим цветом. Гибридизацию зондов наблюдают под флуоресцентным микроскопом, оснащенном соответствующими фильтрами возбуждения и эмиссионными фильтрами, позволяющими визуализировать оранжевые и зеленые флуоресцентные сигналы. Подсчет сигналов LSI HER-2/*neu* и CEP 17 проводится путем микроскопического исследования ядра, которое дает отношение гена HER-2/*neu* к количеству копий хромосомы 17.



Зонд LSI HER-2/neu (ERBB2) SpectrumOrange



17p11.1-q11.1 CEP 17
alpha satellite
SpectrumGreen

17q11.2-q12 LSI
N HER-2/*neu* (ERBB2)
SpectrumOrange

ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Диагностика in vitro Медицинское изделие для диагностики in vitro.

1. Для использования при диагностике in vitro
2. Набор PathVysion II предназначен для использования только с зафиксированными формалином и залитыми парафином (FFPE) раковых тканей молочной железы и желудка. Его не следует использовать с раковыми тканями, не являющимися тканями молочной железы, желудка или свежими раковыми тканями.
3. Все биологические образцы должны рассматриваться как способные передавать возбудителей инфекции. Контрольные стекла ProbeChek HER-2/*neu* производят из линий клеток человека, зафиксированных 10% формалином. Поскольку зачастую невозможно определить, какой из них может быть заразным, все человеческие образцы и контрольные предметные стекла должны быть обработаны с соблюдением универсальных предосторожностей.[21]
4. Следует избегать воздействия на образцы кислот, сильных оснований или очень высоких температур. Такие условия, как известно, повреждают ДНК и могут привести к сбою анализа флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).
5. Несоблюдение всех процедур денатурации, гибридизации и обнаружения стекол может привести к неприемлемым или ошибочным результатам.
6. Для определения целевых областей окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) следует проводить на каждом 10-м стекле одного и того же тканевого блока.
7. На условия гибридизации может отрицательно повлиять использование реагентов, отличных от предоставленных компанией Abbott Molecular.
8. Правильное хранение компонентов набора необходимо для обеспечения указанного срока годности. На результаты анализа могут отрицательно повлиять компоненты набора, хранящиеся в других условиях.
9. При хранении при низких температурах 20X SSC может кристаллизоваться. Если кристаллы не повторно растворяются при комнатной температуре, раствор следует отбросить.
10. Если какие-либо другие рабочие реагенты выпадают в осадок или становятся мутными, их следует отбросить и приготовить свежие растворы.
11. Флуорофоры можно фотообесцвечивать под воздействием света. Чтобы ограничить эту деградацию, работайте со всеми растворами, содержащими флуорофоры, при пониженном освещении. Сюда входят все шаги, связанные с использованием гибридизированного стекла. Выполняйте все действия, не требующие освещения для манипуляций (инкубационные периоды, промывки и т.д.) в темноте.
12. Смесь ДНК-зондов LSI HER-2/*neu* и CEP 17 содержит формамид, который является тератогеном. Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
13. Калиброванные термометры необходимы для измерения температуры растворов и водяных ванн.
14. Всегда проверяйте температуру раствора для предварительной обработки, раствора для денатурации и промывочных буферных растворов перед каждым использованием, измеряя температуру раствора в емкости Коплина с помощью калиброванного термометра.
15. Все опасные материалы должны быть утилизированы в соответствии с руководящими документами учреждения по утилизации опасных отходов.

Зонды PathVysion LSi hER-2/neu Spectrumorange/CEP 17 SpectrumGreen

ВНИМАНИЕ: Этот препарат содержит компоненты человеческого происхождения и/или компоненты потенциальных возбудителей. Ни один известный метод испытаний не может дать полной гарантии того, что продукты, полученные от человека, или инактивированные микроорганизмы не передадут инфекцию. Эти реагенты и человеческие образцы должны обрабатываться как инфекционные с использованием безопасных лабораторных процедур, описанных в разделе «Биологическая безопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях»,[20] стандартах OSHA по переносимым с кровью патогенам,[21] документе Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) M29-A3,[22] и других соответствующих практических руководствах по биологической безопасности.[23] Поэтому все материалы, полученные от человека, должны считаться инфекционными.

Сюда входят следующие меры предосторожности, но не ограничиваясь ими:

- При работе с образцами или реагентами надевайте перчатки.
- Не пипетировать ртом.
- Не есть, не пить, не курить, не наносить косметику и не пользоваться контактными линзами в тех местах, где используются данные материалы.
- Очистите и продезинфицируйте розливы образцов, используя туберкулоцидное дезинфицирующее средство, такого как 1,0% гипохлорит натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.20

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Обеззараживайте и утилизируйте все потенциальные возбудители инфекции в соответствии с местными, государственными и федеральными нормами.[23]

PathVysion LSI HER-2/*neu* SpectrumOrange/CEP 17
Зонды SpectrumGreen (продолжение)

Компоненты маркировки, определяющие опасность: Формамид



Опасность	
H360	Может повлиять на фертильность или навредить нерожденному ребенку.
P201	Перед использованием получите специальные инструкции.
P202	Не используйте устройство до тех пор, пока не будут прочитаны и изучены все меры предосторожности.
P280	Надевать защитные перчатки/защитную одежду/ средства защиты глаз.
P308+P313	При воздействии или потенциальном воздействии: Обратиться за медицинской помощью.
P405	Хранить под замком.
P501	Этот материал и его контейнер должны быть утилизированы безопасным способом.

NP-40

Компоненты маркировки, определяющие опасность:
Полиэтиленгликоль октилфениловый эфир



Опасность	
H302	Опасно при проглатывании.
H315	Вызывает раздражение кожи
H318	Вызывает серьезное повреждение глаз.
H411	Токсично для водных организмов. Последствия будут продолжительными.
P280	Надевать защитные перчатки/защитную одежду/ средства защиты глаз.
P264	После использования тщательно мыть руки.
P273	Не допускать попадания в окружающую среду.
P305+ P351+ P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промывайте водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы при их наличии и при возможности. Продолжайте промывать.
P301+ P312	ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: При плохом самочувствии обратитесь в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР/ к врачу.
P501	Утилизируйте содержимое / контейнер в соответствии с местными нормативами.

Паспорт безопасности: Важная информация, касающаяся безопасного обращения, транспортировки и утилизации данного продукта, содержится в Паспорте безопасности.

РЕАГЕНТЫ И ПРИБОРЫ

Предоставляемые материалы

Этот набор содержит достаточное количество реагентов для обработки 20, 50 или 100 тестов в зависимости от заказанного продукта. Тест определяют как одна
целевая область 22 мм x 22 мм.

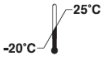
1. Зонды Vysis LSI HER-2/*neu* SpectrumOrange/CEP 17 SpectrumGreen
Номер по каталогу: 30-171062/35-171062
Количество: 200 мкл/500 мкл/500 мкл x 2 для набора из 100 тестов
Состав: 20 нг/мкл меченого флуорофором альфа-сателлитного ДНК-зонда SpectrumGreen для хромосомы 17, 10 нг/мкл меченого флуорофором ДНК-зонда SpectrumOrange для локуса гена HER-2/*neu* и блокирующей ДНК, предварительно денатурированной в буфере для гибридизации.

2. Контрастный краситель DAPI
Номер по каталогу: 30-804960
Количество: 1000 мкл
Состав: 1000 нг/мл DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) в фенилендиамина дигидрохлориде, глицерине и буфере.

3. NP-40
Номер по каталогу: 30-804820
Количество: 2000 мкл x 2
Состав: Игепал (заменитель NP-40) (Октилфенокси) полиэтоксиэтанол.

4. Стандартный солевой раствор (20X SSC)
Номер по каталогу: 30-805850
Количество: 66 г
Состав: Хлорид натрия и цитрат натрия

Хранение и обработка



Храните невскрытый набор ДНК-зондов PathVysion HER-2 II в сборе при -20°C, в защищенном от света месте.

Стандартный солевой раствор (20X SSC) и NP-40 можно хранить отдельно при комнатной температуре (от 15 до 30°C). Срок годности каждого из компонентов указан на этикетках отдельных компонентов. Эти условия хранения распространяются как на вскрытые, так и на невскрытые компоненты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Требуемые, но не предоставляемые материалы

Лабораторные реагенты

- Нормальные контрольные стекла ProbeChek HER-2/*neu* (нормальное отношение сигналов), номер по каталогу 30-805093, номер по списку 02J05-030 (ручной анализ) или номер по каталогу 32-805093, номер по списку 02J05-010 (для использования с системой Vysis AutoVysion); зафиксированные формалином, залитые парафином культивированные раковые клетки молочной железы человека (нормальное отношение LSI HER-2/*neu* к CEP 17), нанесенные на предметные стекла микроскопа. Количество: 5 стекол. Храните контрольные стекла при температуре от 15 до 30°C в закрытом контейнере с осушителем, чтобы защитить их от влажности.
- Контрольные стекла ProbeChek HER-2/ *neu* Cutoff (отношение слабоусиленного сигнала) номер по каталогу 30-805042, номер по списку 02J04-030 (ручной анализ) или номер по каталог 32-805042, номер по списку 02J04-010 (для использования с системой Vysis AutoVysion); зафиксированные формалином, залитые парафином культивированные раковые клетки молочной железы человека (низкий уровень амплификации HER-2/*neu*), нанесенные на предметные стекла микроскопа. Количество: 5 стекол. Храните контрольные стекла при температуре от 15 до 30°C в закрытом контейнере с осушителем, чтобы защитить их от влажности.
- Набор реагентов для предварительной обработки парафином Vysis (номер по каталогу 32-801200, номер по списку 02J02-032), который включает:
  - Раствор для предварительной обработки Vysis (NaSCN); Количество: 5 x 50 мл
  - Протеаза Vysis Protease (пепсин) Количество: 5 x 25 мг
  - Протеазный буфер Vysis Protease Buffer (раствор NaCl, pH 2,0);
  - Количество: 5 x 50 мл
  - Промывочный буфер Vysis (2X SSC, pH 7,0); Количество: 2 x 250 мл
- Забуференный нейтральный раствор формалина (4% формальдегида в ФСБ)
- Осветляющий агент Hemo-De (или аналог, например, d-лимонен)
- Гематоксилин и эозин (H&E)
- Иммерсионное масло, подходящее для флуоресцентной микроскопии. Хранить при комнатной температуре (от 15 до 30°C).
- Формамид, высокой очистки
- Этанол (100%). Хранить при комнатной температуре.
- Концентрированный (12 н.) раствор хлористоводородной кислоты (HCl)
- 1 н. раствор гидроксида натрия (NaOH)
- Вода очищенная (дистиллированная, деионизированная или качества Milli-Q); хранить при комнатной температуре.
- Каучуковый клей
- Драйерит

ПРИМЕЧАНИЕ. Если условия хранения не указаны, храните реагенты в соответствии с рекомендациями поставщика.

Лабораторное оборудование

- Предварительно очищенные силанизированные или положительно заряженные предметные стекла
- Столик с подогревом (45–50°C)
- Покровное стекло 22мм x 22мм
- Микролитровая пипетка (от 1 до 10 мкл) и стерильные наконечники
- Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки (0,5 или 1,5 мл)
- Таймер
- Микротом
- Магнитное перемешивающее устройство
- Вихревая мешалка
- Микроцентрифуга
- Мерный цилиндр
- Водяные бани (37 ± 1°C, 72 ± 1°C и 80 ± 1°C)
- Безбелковая водяная баня (40°C)
- Воздушные инкубаторы (37°C и 56°C)
- Скрейбер с алмазным наконечником
- Увлажненная камера для гибридизации
- Пинцеты
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Сосуды Коплина (6). Предлагаемый тип: вертикальный сосуд для окрашивания
- Флуоресцентный микроскоп с рекомендованными фильтрами (см. следующий раздел)
- pH-метр
- Калиброванный термометр
- Коробка с предметными стеклами с крышкой
- Блок фильтрации с порами размером 0,45 мкм

Микроскопическое оборудование и принадлежности

Микроскоп: Для просмотра результатов гибридизации необходим флуоресцентный микроскоп с осветителем отражённого света. Микроскоп должен быть проверен, чтобы убедиться, что он работает правильно, чтобы обеспечить оптимальный осмотр образцов при анализе флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) Микроскоп, используемый для обнаружения общих следов ДНК, таких как DAPI, йодид пропидия и квинакрин, может работать неправильно для анализов флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Рекомендуется регулярная очистка микроскопа и периодическое техническое обслуживание, особенно выравнивание ртутной лампы, техническим представителем изготовителя.

ПРИМЕЧАНИЕ: часто предполагаемый отказ реагентов в анализе in situ может фактически указывать на то, что для просмотра успешно проведенного анализа на гибридизацию используется неисправный или неоптимальный флуоресцентный микроскоп или неправильный набор фильтров.

Источник света возбуждения: Рекомендуемым источником возбуждения является 100-ваттная ртутная лампа или другая лампа с аналогичной интенсивностью и спектральной выходной мощностью. Регистрируют количество часов, в течение которых использовалась лампа, и заменяют ее до того, как номинальное время работы будет превышено. Убеждаются, что лампа правильно выровнена.

Объективы: Используйте масляные иммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥ 0,75 при использовании микроскопа со 100 - ваттной ртутной лампой или другой лампой с аналогичной интенсивностью и спектральной выходной мощностью. Объектив с 25-кратным увеличением в сочетании с окулярами 10-кратного увеличения подходит для определения местоположения цели. Объектив с 40-кратным увеличением в сочетании с окулярами 10-кратного увеличения подходит для сканирования. Удовлетворительные результаты определения числа сигналов FISH могут быть получены с помощью масляного погружного ахроматического объектива с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: Иммерсионное масло, используемое с масляными иммерсионными объективами, должно быть предназначено по составу для низкой автофлуоресценции и специально для использования в флуоресцентной микроскопии.

Фильтры: Наборы многополосных флуоресцентных фильтров для микроскопов, оптимизированные для использования с PathVysion Kit II, можно приобрести у компании Abbott Molecular для большинства моделей микроскопов. Рекомендуемые наборы фильтров для PathVysion Kit II: DAPI/9-Orange с двойной полосой пропускания, DAPI/Green с двойной полосой пропускания, Green/Orange (V.2) с двойной полосой пропускания и DAPI/Green/Orange (V.2) с тройной полосой пропускания. Гибридизация зондов LSI HER-2/*neu* и CEP 17 с их целевыми областями отмечена оранжевой и зеленой флуоресценцией соответственно. Вся остальная ДНК будет флуоресцировать синим цветом с окрашиванием DAPI.

Приготовление рабочих реагентов.

Стандартный солевой раствор (20X SSC) (3M хлорид натрия, 0,3 M цитрат натрия, pH 5,3)

Для приготовления объединяют:

66 г	Стандартный солевой раствор (20X SSC)
200 мл	вода очищенная

Тщательно перемешивают. Измеряют pH при комнатной температуре с помощью pH-метра. Доводят pH до 5,3 с помощью концентрированной HCl. Доводят до 250 мл водой очищенной. Фильтруют через фильтр с порами размером 0,45 мкм. Хранят при комнатной температуре в течение не более 6 месяцев.

Денатурирующий раствор (70% формамид/2X SSC, pH от 7,0 до 8,0)

Для приготовления объединяют:

49 мл	формамид
7 мл	Стандартный солевой раствор (20X SSC), pH 5,3
14 мл	вода очищенная
70 мл	конечный объем

Тщательно перемешивают. pH измеряют при комнатной температуре с помощью pH-метра со стеклянным pH-электродом, чтобы убедиться в том, что значение pH находиться в диапазоне от 7,0 до 8,0. Этот раствор можно использовать в течение не более 1 недели. Значение pH проверяют перед каждым использованием. Когда не используют, хранят при температуре от 2 до 8°C в плотно закрытом контейнере.

Растворы этанола

Готовят разведения об/об 70%, 85% и 100% этанола, используя 100% этанол и очищенную воду. Растворы можно использовать в течение 1 недели до тех пор, пока не будет отмечено испарение или раствор не станет слишком разбавленным из-за чрезмерного использования. Когда не используют, хранят при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах.

Промывочный буфер после гибридизации (2X SSC/0,3% NP-40)

Для приготовления объединяют:

100 мл	Стандартный солевой раствор (20X SSC), pH 5,3
847 мл	вода очищенная
3 мл	NP-40

Тщательно перемешивают. Измеряют pH при комнатной температуре с помощью pH-метра. Довести pH регулируют до 7,0-7,5 с помощью 1 н. раствора NaOH. Объем доводят до 1 литра водой очищенной. Фильтруют через фильтр с порами размером 0,45 мкм. Использованный раствор выбрасывают в конце каждого дня. Неиспользованный раствор хранят при комнатной температуре в течение не более 6 месяцев.

ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКОЛ

Отбор и обработка образцов

Набор PathVysion Kit II предназначен для использования с зафиксированными формалином и залитыми парафином образцами тканей. Сбор тканей должен выполняться в соответствии со стандартными лабораторными процедурами. **Выбор участка ткани для анализа PathVysion ii должен производится патологом**. Следует избегать воздействия на образцы кислот, сильных оснований или очень высоких температур. Такие условия, как известно, повреждают ДНК и могут привести к сбою анализа флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ткань молочной железы следует готовить в виде срезов толщиной от 4 до 6 мкм. Зафиксированную формалином и залитую парафином ткань можно использовать и хранить в соответствии со стандартными лабораторными процедурами. Для обеспечения оптимальных результатов при использовании набора PathVysion Kit II, эти методы должны быть согласованы по всем анализируемым образцам. Для определения целевых областей окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) следует проводить на каждом 10-м стекле одного и того же тканевого блока. Срезы тканей следует размещать на положительно заряженной стороне предметного стекла с органосилановым покрытием, чтобы минимизировать отделение ткани от предметного стекла во время проведения анализа методом FISH. Набор PathVysion Kit II содержит реагенты, достаточные примерно для проведения 20, 50 или 100 тестов. Один тест для набора PathVysion Kit II определяется как площадь 22 мм x 22 мм. Для больших срезов образцов потребуется более 10 мкл зонда на тест.

Приготовление предметного стекла из зафиксированной формалином и залитой парафином ткани

Для приготовления предметных стекол из зафиксированных формалином и залитых парафином образцов тканей можно использовать следующий метод:

1. С помощью микротома нарезают парафиновые срезы толщиной от 4 до 6 мкм.
2. Срезы помещают на безбелковую водяную баню при температуре 40°C.
3. Срез помещают на положительно заряженную сторону предметного стекла с органосилановым покрытием.
4. Предметным стеклам дают высохнуть на воздухе.

(Обработку контрольных предметных стекол ProbeChek hER-2/*neu* начинают здесь.)

5. Предметные стекла высушивают в течение ночи при температуре 56°C.

Подготовка предметных стекол

Перед анализом с использованием набора PathVysion Kit II необходимо удалить парафин с предметных стекол и зафиксировать образцы. Листок-вкладыш в набор реагентов для предварительной обработки парафином Vysis (номер по каталогу 32-801200, номер по списку 02J02-032) содержит подробные инструкции. Ниже приводится краткое описание процедуры.

Депарафинирование предметных стекол

- Предметные стекла погружают в осветляющий агент Hemo-De на 10 минут при комнатной температуре.
- Повторяют дважды, каждый раз используя новый Hemo-De.
- Предметные стекла обезвоживают в 100% этаноле в течение 5 минут при комнатной температуре. Повторяют.
- Предметные стекла высушивают на воздухе или предметные стекла помещают на столик с подогревом при температуре от 45 до 50°C.

Предварительная обработка стекол

- Предметные стекла погружают в 0,2 н. раствор HCl на 20 минут.
- Предметные стекла погружают в воду очищенную на 3 минуты.
- Предметные стекла погружают в промывочный буфер на 3 минуты.
- Предметные стекла погружают в раствор для предварительной обработки при температуре 80°C на 30 минут.
- Предметные стекла погружают в воду очищенную на 1 минуту.
- Предметные стекла погружают в промывочный буфер на 5 минуты. Повторяют.

Обработка протеазой

- Излишки буфера удаляют, промокнув края предметных стекол бумажным полотенцем.
- Предметные стекла погружают в раствор протеазы при температуре 37°C на 10-60 минут.
- Предметные стекла погружают в промывочный буфер на 5 минуты. Повторяют.
- Предметные стекла высушивают на столике с подогревом при температуре от 45 до 50°C в течение 2-5 минут.

Фиксация образца

- Предметные стекла погружают в забуференный нейтральный формалин при комнатной температуре на 10 минут.
- Предметные стекла погружают в промывочный буфер на 5 минуты. Повторяют.
- Предметные стекла высушивают на столике с подогревом при температуре от 45 до 50°C в течение 2-5 минут.
- Переходят к протоколу анализа PathVysion Kit II.

МЕТОДИКА АНАЛИЗА

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ IN SITU

Подготовка зонда

1. Дают зонду нагреться до комнатной температуры, чтобы вязкость достаточно снизилась для обеспечения точного дозирования.
2. Перемешивают на вортексе. Каждую пробирку центрифугируют в течение 2-3 секунд в настольной микроцентрифуге, чтобы опустить содержимое на дно пробирки. Осторожно перемешивают на вортексе.

Денатурация ДНК образца

Время приготовления растворов зондов следует тщательно согласовывать с денатурацией ДНК образца, чтобы оба образца были готовы к стадии гибридизации одновременно.

1. Предварительно нагревают увлажненную камеру для гибридизации (герметичный контейнер с куском влажной промокательной бумаги или бумажным полотенцем размером примерно 1 x 3 дюйма, приклеенным к боковой стороне контейнера) до 37°C, поместив его в инкубатор при 37°C перед приготовлением предметных стекол. Смачивают промокательную бумагу или бумажное полотенце водой перед каждым использованием камеры для гибридизаци.
2. Перед использованием следует убедиться в том, что pH денатурирующего раствора составляет от 7,0 до 8,0 при комнатной температуре. Денатурирующий раствор добавляют в сосуд Коплина и помещают на водяную баню при температуре 72 ± 1°C не менее чем на 30 минут или пока температура раствора не достигнет 72 ± 1°C. Перед использованием температуру раствора проверяют.
3. Участки, которые необходимо гибридизовать, помечают скрейбером с алмазным наконечником.
4. Денатурируют ДНК образца, погружая подготовленные предметные стекла в денатурирующий раствор при температуре 72 ± 1°C (≤ 6 предметных стекол на сосуд) на 5 минут. Не следует денатурировать более 6 предметных стекол на сосуд Коплина за один раз.
   ПРИМЕЧАНИЕ. Температуру раствора проверяют перед каждым использованием.
5. Предметные стекла удаляют пинцетом из денатурирующего раствора и немедленно помещают в 70%-ный промывочный раствор этанола при комнатной температуре. Предметное стекло встряхивают, чтобы удалить формамид. Дают постоять в промывочном растворе этанола в течение 1 минуты.
6. Предметные стекла вынимают из 70% этанола. Повторите шаг 5 с 85% этанолом, а затем со 100% этанолом.
7. Излишки этанола сливают с предметного стекла, прикоснувшись нижним краем предметного стекла к промокательной бумаге, и насухо вытирают нижнюю сторону предметного стекла лабораторной салфеткой.
8. Предметные стекла высушивают на столике с подогревом при температуре от 45 до 50°C в течение 2-5 минут.

Гибридизация

1. 10 мкл смеси зондов наносят на целевую область предметного стекла. Незамедлительно поверх зонда помещают покровное стекло размером 22 x 22 мм и дают ему равномерно распределиться под покровным стеклом. Пузырьки воздуха будут мешать гибридизации, и их следует избегать. Оставшийся раствор зонда следует заморозить сразу после использования.
2. Покровное стекло запечатывают резиновым клеем следующим образом: набирают резиновый клей в шприц на 5 мл. Выдавливают небольшое количество резинового клея по периферии покровного стекла, перекрывая покровное стекло и предметное стекло, образуя уплотнение вокруг покровного стекла.
3. Предметные стекла помещают в предварительно нагретую увлажненную камеру для гибридизации. Камеру закрывают плотной крышкой и инкубируют при температуре 37°C в течение ночи (от 14 до 18 часов).
4. Переходят к промывкам после гибридизации.

Промывки после гибридизации

1. В сосуд Коплина добавляют буфер для промывки после гибридизации (2X SSC/0,3% NP-40). Предварительно нагревают буфер для промывки после гибридизации, поместив сосуд Коплина в водяную баню при температуре 72 ± 1°C не менее чем на 30 минут или пока температура раствора не достигнет 72 ± 1°C.
   ПРИМЕЧАНИЕ. Перед промывкой каждой партии температуру промывочного раствора следует доводить до 72 ± 1°C.
1. Буфер для промывки после гибридизации помещают во второй сосуд Коплина при комнатной температуре. Оба промывочных раствора выбрасывают через 1 день использования.
2. С первого предметного стекла удаляют уплотнитель из резинового клея, осторожно потянув герметик пинцетом.
3. Предметные стекла погружают в буфер для промывки после гибридизации при комнатной температуре и удаляют покровное стекло.
4. После удаления покровного стекла удаляют излишки жидкости по краю предметного стекла. Предметное стекло помещают в буфер для промывки после гибридизации при 72 ± 1°C на 2 минуты (6 предметных стекол на сосуд).
5. Каждое предметное стекло вынимают из промывочной ванны и высушивают на воздухе в темноте в вертикальном положении. (Достаточно закрытого ящика или полки внутри закрытого шкафа).
6. 10 мкл контрастного красителя DAPI наносят на целевую область предметного стекла и накрывают покровным стеклом. Перед подсчетом сигналов предметные стекла хранят в темноте.

Хранение предметных стекол

Гибридизированные предметные стекла (с покровными стеклами) хранят при температуре -20°C в темноте. После снятия с хранения при -20°C предметному стеклу дают нагреться до комнатной температуры перед просмотром под флуоресцентным микроскопом.

Подсчет сигналов

Оценка пригодности предметных стекол

Оценку пригодности предметных стекол проводят с использованием следующих критериев.

- Интенсивность сигнала зонда: сигналы должны быть яркими, четкими и легко поддающимися оценке. Сигналы должны быть яркими, компактными, овальными или волокнистыми, рассеянными, овальными.
- Фон: Фон должен быть темным или черным и относительно свободным от флуоресцентных частиц или туманности.

Если какие-либо из вышеперечисленных характеристик не отвечают требованиям, смотрите Руководство по устранению неполадок (рак молочной железы) в таблице 3 и используйте свежее предметное стекло.

Распознавание целевых сигналов

Используют рекомендованные фильтры. Регулируют глубину фокуса и изучают размер и форму целевых сигналов и шума (мусора). Подсчитывают сигналы гибридизации только среди опухолевых клеток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Опухолевые клетки в целом больше нормальных клеток, лимфоцитов и эпителиальных клеток. Определяют целевые области окрашиванием гематоксилином и эозином (H&E) на каждом 10-м стекле одного и того же тканевого блока. Эти области определяют на покровном стекле после проведения анализа методом FISH.

Выбор оптимальной области обзора и оцениваемых ядер

Используют объектив с 25-кратным увеличением, чтобы просмотреть гибридизированную область и найти интересующую целевую область (опухолевые клетки, идентифицированные окрашиванием H&E). Избегают участков некроза и нечетких границ ядер. Пропускают те ядра с сигналами, которые требуют субъективной оценки. Пропускают сигналы со слабой интенсивностью и неспецифичностью или с шумным фоном. Пропускают ядра с недостаточным контрастом для определения границы ядра. Перечисляют только ядра с дискретными сигналами.

Подсчет сигналов

Используя объектив с 40-кратным увеличением, сканируют несколько областей опухолевых клеток, чтобы учесть возможную гетерогенность. Выбирают зону хорошего ядерного распределения. Избегают целевых областей со слабыми сигналами гибридизации. Используя объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением, начинают анализ в верхнем левом квадранте выбранной области и, просматривая слева направо, подсчитывают количество сигналов в пределах границы ядра каждой оцениваемой интерфазной клетки в соответствии с указаниями, приведенными ниже и на рисунке 1.

- Сфокусируйтесь вверху и внизу, чтобы найти все сигналы, присутствующие в ядре.
- Считают 2 сигнала одинакового размера, которые находятся друг от друга на расстоянии не более диаметра сигнала, как один сигнал.
- Ядра без сигналов или с сигналами только одного цвета не оценивают. Оценивают только ядра с одним или более FISH-сигналами каждого цвета.
- Для каждого ядра подсчитывают количество сигналов LSI HER-2/neu и количество сигналов CEP 17.

  ПРИМЕЧАНИЕ: Для просмотра обоих цветовых сигналов может потребоваться переключение между наборами фильтров DAPI/9-оранжевый, DAPI/зеленый, зеленый/оранжевый (V.2) и DAPI/зеленый/оранжевый (V.2). Записывают количество (см. рекомендуемый метод определения отношения LSI hER-2/*neu* к CEP 17).

Рисунок 1. Руководство по учету двухцветных сигналов

Условные обозначения: = зеленый зонд, CEP 17; = оранжевый зонд, LSI HER-2/neu

1		Подсчитывают как 2 оранжевых и 2 зеленых в каждом ядре. Ядра перекрываются, все области обоих ядер не видны, а сигналы не находятся в области перекрытия.
2		Подсчитывают как 2 оранжевых сигнала и 2 зеленых сигнала. Один оранжевый сигнал рассеян.
3		Не считают. Ядра перекрываются, все области ядер не видны, а некоторые сигналы находятся в области перекрытия.
4		Подсчитывают как 2 оранжевых сигнала и 2 зеленых сигнала. Один оранжевый сигнал разделен.
5		Подсчитывают как 1 оранжевый сигнал и 2 зеленых сигнала. Один зеленый сигнал разделяется, и оранжевый сигнал разделяется.
6		Подсчитывают как 2 оранжевых сигнала и 1 зеленый сигнал.
7		Подсчитывают как 3 оранжевых сигнала и 1 зеленый сигнал.
8		Подсчитывают как 4 оранжевых сигнала и 2 зеленых сигнала.

Рекомендуемый метод определения отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17

Рекомендуемый метод определения отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17 состоит в том, чтобы разделить общее количество сигналов LSI HER‑2/*neu* на общее количество сигналов CEP 17 в 20 подсчитанных ядрах.

1. Определяют и записывают количество LSI HER-2/*neu* и CEP 17 в 20 ядрах (см. **таблицу 1** для примера).
2. Добавляют все сигналы LSI HER-2/*neu*. Эта сумма представляет собой общее количество сигналов LSI HER-2/*neu* (например, 252 в **таблице 1**).
3. Добавляют все сигналы CEP 17. Эта сумма представляет собой общее количество сигналов CEP 17 (например, 44 в **таблице 1**).
4. Для расчета окончательного результата используют следующее отношение:
   Суммарные сигналы LSI HER-2/*neu* (этап 2)/общие сигналы CEP 17 (этап 3) (например, 252/44 равняется отношению 5,73, что является положительным для амплификации HER-2/*neu*).
   Если отношение LSI hER-2/*neu* к CEP 17 является пограничным (от 1,8 до 2,2), подсчитывают еще 20 ядер и пересчитывают отношение, исходя из всего 40 ядер.
5. Результаты указывают следующим образом:
   Если отношение < 2, амплификации гена HER-2/*neu* не наблюдалось; если соотношение ≥ 2, амплификация гена HER-2/*neu* наблюдалась .
   ПРИМЕЧАНИЕ: отношение на границе порога или около него (от 1,8 до 2,2) следует интерпретировать с осторожностью, как описано выше.

Таблица 1. Примерный лист данных по раку молочной железы

Номер клетки	**LSI HER-2/*neu***	**CEP 17**
1	5	1
2	6	1
3	10	1
4	11	1
5	14	1
6	17	1
7	6	2
8	11	2
9	15	2
10	14	2
11	16	2
12	20	2
13	8	3
14	10	3
15	12	3
16	14	3
17	18	3
18	19	3
19	11	4
20	15	4
Всего	**252**	**44**

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Использование контрольных предметных стекол

Контрольные предметные стекла необходимо анализировать одновременно с предметными стеклами пациента, чтобы контролировать выполнение анализа и оценивать точность подсчета сигналов. Контрольные предметные стекла следует использовать, начиная с процедуры подготовки предметных стекол (см. раздел «**ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКОЛ**»). Контроли следует анализировать каждый день тестирования методом FISH с использованием каждой новой партии набора PathVysion Kit II. Контрольные предметные стекла ProbeChek HER-2/*neu* требуются при каждой серии анализов обработанных предметных стекол пациента. Кроме того, отдельные пользователи могут использовать собственный контрольный материал при условии, что он охарактеризован и подтвержден в соответствии с требованиями ИХЛ высокой степени сложности.

Оценивают пригодность контрольных предметных стекол и выполняют подсчет сигналов в соответствии с инструкциями, представленными в разделе «Подсчет сигналов». Критерии пригодности предметных стекол должны быть удовлетворены, и результаты отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17 должны находиться в пределах установленных диапазонов приемлемых характеристик теста. Для получения приемлемых результатов оценки контрольных предметных стекол ProbeChek HER-2/*neu* см. **таблицу 2**.

Ни в коем случае не следует указывать результаты флуоресцентной гибридизации in situ (FISH), если контроли не дали результатов. Если контрольные предметные стекла не соответствуют критериям приемлемости, возможно, анализ не был проведен должным образом или компоненты набора PathVysion Kit II могли сработать ненадлежащим образом. Потребуется повторный анализ со свежими контрольными предметными стеклами и предметными стеклами пациентов. Если контрольные предметные стекла соответствуют критериям приемлемости, но результаты выходят за пределы указанного диапазона, подсчет мог быть выполнен неправильно, и может потребоваться повторный независимый анализ того же предметного стекла. В случае неудачной гибридизации при использовании либо образца, либо контрольного предметного стекла смотрите Руководство по поиску и устранению неисправностей (рак молочной железы) в **таблице 3**. Для клинических образцов, когда интерпретация сигнала гибридизации затруднена, а образца для повторного анализа недостаточно, тест считается неинформативным. Если клеток для анализа недостаточно, тест считается неинформативным. Контроль образцов пациентов следует проводить в соответствии с требованиями стандартных лабораторных процедур. Качество гибридизации и результаты подсчета должны быть задокументированы в соответствующей форме. При оценке результатов следует учитывать качество и эффективность гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 2. Приемлемые диапазоны отношения HER-2/*neu* к CEP 17 для контрольных предметных стекол ProbeChek HER-2/*neu*

Контроль	Допустимый диапазон HER-2/*neu* к CEP 17
Нормальное отношение Контрольное предметное стекло (Номер по каталогу 30-805093/Номер по списку 02J05-030)	От 0,75 до 1,25
Пороговое (слабо усиленное) Отношение Контрольное предметное стекло (Номер по каталогу 30-805042/Номер по списку 02J04-030)	От 1,6 до 2,0

Таблица 2A. Приемлемые диапазоны отношения HER-2/*neu*к CEP 17 для (автоматизированного) подсчета контрольных предметных стекол ProbeChek HER-2/*neu* системой Abbott AutoVysion

Контроль	Допустимый диапазон HER-2/*neu* к CEP 17
Нормальное отношение Контрольное предметное стекло (Номер по каталогу 32-805093/Номер по списку 02J05-010)	От 0,7 до 1,7
Пороговое (слабо усиленное) отношение Контрольное предметное стекло (Номер по каталогу 32-805042/Номер по списку 02J04-010)	От 1,5 до 2,6

Таблица 3. Руководство по поиску и устранению неисправностей (рак молочной железы)

Проблема	Вероятная причина	Решение
• Сигнал отсутствует или слабые сигналы	• Неправильный набор фильтров для просмотра предметного стекла	• Используйте рекомендуемые фильтры.
	• Микроскоп не работает должным образом	• Обратитесь к техническому представителю производителя микроскопа.
	• Неправильные лампы (например, ксеноновые или вольфрамовые)	• Используйте ртутную лампу (рекомендуется 100 Вт) или другую лампу с аналогичной интенсивностью и спектральной мощностью.
	• Слишком старая ртутная лампа	• Замените на новую лампу.
	• Ртутная лампа сместилась	• Выровняйте лампу.
	• Грязные и/или потрескавшиеся линзы коллектора	• Очистите или замените линзу.
	• Грязное или разбитое зеркало в светильнике	• Очистите и замените зеркало.
	• Несоответствующие условия гибридизации	• Проверьте температуру инкубатора 37 ± 1°C. • Увеличьте время гибридизации как минимум до 14 часов.
	• Несоответствующая температура промывки после гибридизации	• Проверьте температуру раствора 72 ± 1°C.
	• Пузырьки воздуха задерживаются под покровным стеклом и препятствуют доступу зонда	• Нанесите покровное стекло, сначала прикоснувшись к поверхности смеси для гибридизации.
	• Недостаточное количество раствора для гибридизации среза	• Увеличьте количество раствора для гибридизации до 20 мкл на срез.
	• Недостаточное расщепление протеазой	• Проверьте температуру раствора 37 ± 1°C. • Убедитесь в том, что pH буфера составляет 2,0 ± 0,2. • Увеличьте время расщепления до 60 мин.
	• Срез слишком сильно зафиксирован (границы клеток будут четкими)	• Устраните фиксацию при предварительной обработке. • Оптимальное время фиксации при приготовлении предметных стекол, залитых парафином, составляет от 24 до 48 часов. Более длительное время фиксации приведет к постепенному снижению интенсивности сигнала.
	• Потеря ДНК (плохое окрашивание DAPI)	• Проверьте условия фиксации.
• Изменение интенсивности сигнала на срезе ткани	• Присуща многим срезам тканей	• Проверьте окрашивание DAPI. Если окрашивание DAPI на плохих участках хорошее, оцените предметное стекло. • Если окрашивание DAPI плохое на плохих участках, увеличьте время фиксации.
	• Зонд неравномерно распределен на предметном стекле из-за пузырьков воздуха под покровным стеклом	• • Повторите гибридизацию на следующем срезе или на том же предметном стекле и убедитесь в том, что под покровным стеклом нет пузырьков воздуха.
	• Слишком крупный срез	• • Увеличьте объем раствора для гибридизации до 20 мкл на больших срезах ткани.
• Шумный фон	• Неадекватная строгость промывки	• Проверьте pH в диапазоне от 7,0 до 7,5 буфера для промывки после гибридизации. • Проверьте температуру раствора 72 ± 1°C. • Во время промывки осторожно перемешивайте. • Увеличьте время промывки до 5 минут.
• Некроз ткани или ухудшение морфологии ткани	• Фиксированный срез ткани (плохое окрашивание DAPI)	• Проверьте время/условия фиксации.
	• Использовались неподходящие предметные стекла	• Используйте положительно заряженные предметные стекла.
	• Неправильный обжиг предметных стекол	• Проверьте температуру печи 56°C.
	• Чрезмерная предварительная обработка	• Проверьте температуру раствора для предварительной обработки 80 ± 1°C. • Уменьшите время предварительной обработки. • Уменьшите время расщепления протеазой.
	• Чрезмерная денатурация	• Проверьте температуру раствора для денатурации 72 ± 1°C. • Уменьшите время денатурации до 10 минут.
	• После гибридизации срез ткани был разорван с удалением покровного стекла	• Дайте покровному стеклу отмокнуть в буфере для промывки после гибридизации.

Обратитесь в службу технической поддержки Abbott Molecular для получения дополнительной помощи.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Количество сигналов LSI HER-2/*neu* и CEP 17 на ядро записывают в столбцах. Результаты подсчета 20 интерфазных ядер опухолевых клеток на мишень представлены в виде отношения общих сигналов HER-2/*neu* к сигналам CEP 17. Проведенное клиническое исследование показало, что образцы с амплификацией демонстрируют отношение сигналов LSI HER-2/*neu* к CEP 17 ≥ 2,0; нормальные образцы демонстрируют отношение < 2,0. Результаты, близкие к пороговой точке (1,8-2,2), следует интерпретировать с осторожностью. В случае пограничного результата (от 1,8 до 2,2), особенно если также наблюдается вариабельность подсчетов от ядра к ядру, следует провести подсчет еще 20 ядер. Другой специалист должен повторно подсчитать предметное стекло для проверки результатов. Если все еще есть сомнения, анализ следует повторить со свежим предметным стеклом. Если результаты теста не соответствуют клиническим данным, необходима консультация патолога и лечащего врача.

Причины повторения анализа

Ниже приведены ситуации, требующие проведения повторных анализов со свежими предметными стеклами и соответствующими контрольными предметными стеклами. Смотрите Руководство по поиску и устранению неисправностей (рак молочной железы) в **таблице 3**, чтобы узнать о возможных причинах и действиях, необходимых для устранения конкретных проблем.

1. Если 1 или оба контрольных предметных стекла не соответствуют критериям приемлемости предметных стекол, результаты оценки предметных стекол ненадежны, и анализ необходимо повторить.
2. Если имеется менее 20 поддающихся оценке ядер, тест считается неинформативным, и анализ следует повторить.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Если после оценки качества предметных стекол, как описано в разделе «Подсчет сигналов», какой-либо из аспектов (интенсивность сигнала, фон или перекрестная гибридизация) не удовлетворяют требованиям, анализ необходимо повторить.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Набор для анализа на рак молочной железы PathVysion Kit II был оптимизирован только для идентификации и количественного определения хромосомы 17 и гена HER-2/*neu* в интерфазных ядрах из зафиксированных формалином и залитых парафином образцов ткани молочной железы человека. Другие типы образцов или фиксаторов использовать не следует.
2. Эффективность набора PathVysion Kit II была подтверждена с использованием процедур, представленных только в этом листке-вкладыше. Модификации этих процедур могут повлиять на эффективность анализа.
3. Функциональные характеристики набора PathVysion Kit II были установлены только для пациентов с поражением лимфатических узлов, получающих назначенные схемы CAF, и для пациентов с метастатическим раком молочной железы, рассматриваемых для лечения препаратом HERCEPTIN. Эффективность при использовании других схем лечения не установлена.
4. Клиническая интерпретация любых результатов теста должна оцениваться в контексте истории болезни пациента и результатов других диагностических лабораторных тестов.
5. Результаты анализа методом FISH могут быть неинформативными, если качество образца и/или подготовка предметных стекол не соответствуют требованиям.
6. Технологи, выполняющие подсчет сигналов FISH, должны уметь визуально различать оранжевый и зеленый сигналы.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Интерфазный анализ методом FISH проводили на образцах ткани молочной железы человека, полученных от 524 пациентов с раком молочной железы, с целью проверки пороговой точки и оценки ожидаемого отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17. В каждом образце насчитывалось шестьдесят ядер. На основании пороговой точки 2,0 для оценки амплификации гена HER-2/*neu* в образцах ткани молочной железы (для получения подробной информации об определении пороговой точки см. раздел «Установление пороговой точки»), 433 образца были отрицательными, а 91 положительными на амплификацию гена HER-2/*neu*. Распределение отношений сигналов HER-2/*neu* к CEP 17 для 433 образцов без амплификации обобщено в **таблице 4.** Распределение отношений сигналов HER-2/*neu* к CEP 17 для 91 образца с амплифицированным геном HER-2/ *neu*, обобщено в **таблице 5**.

Таблица 4. Распределение отношения сигналов LSI HER-2/*neu* к CEP 17 в образцах ткани молочной железы без амплификации

	Диапазон		
Статистика	От 0,1 до 1,0	От 1,1 до 1,5	От 1,6 до 1,99
Среднее значение	0,86	1,15	1,72
CO	0,14	0,13	0,11
n	185	226	22

Таблица 5. Распределение отношения сигналов LSI HER-2/*neu* к CEP 17 в образцах ткани молочной железы с амплификацией

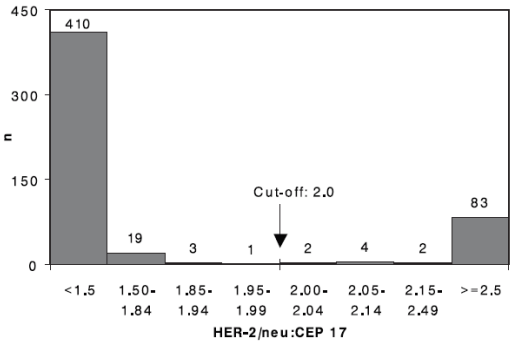
	Диапазон		
Статистика	От 2,0 до 5,0	От 5,1 до 10,0	> 10,0
Среднее значение	3,35	7,39	12,77
CO	0,95	1,41	1,80
n	33	42	16

CO = стандартное отклонение

Установление пороговой точки

В опорном исследовании CALGB 8869 пороговая точка для определения амплификации гена HER-2/*neu* составляла 2,0 на основе анализа наилучшего соответствия клинических результатов лечения CAF. Среди 433 образцов без амплификации наибольшее отношение сигналов LSI HER-2/*neu* к сигналам CEP 17 составляло 1,95, а среди 91 образца с амплификацией наименьшее отношение сигналов LSI HER-2/*neu* к сигналам CEP 17 составляло 2,0. Этот разрыв между наибольшим значением среди нормальных образцов и наименьшим значением среди образцов с амплификацией снижает вероятность ошибочной классификации при использовании 2,0 в качестве пороговой точки. Распределение отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17 в 524 образцах из исследования, описанного выше, показано на **рисунке 2**.

Рисунок 2. Распределение сигналов



ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Следующие функциональные характеристики были определены с использованием набора зондов PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (PathVysion Kit), номер по списку 02J01.

Аналитическая чувствительность и специфичность

Эффективность гибридизации

На контрольных предметных стеклах ProbeChek HER-2/*neu* средний процент клеток без сигнала гибридизации составлял от 0,0 до 2,0%. Эти предметные стекла приготовлены из зафиксированных формалином и залитых парафином клеточных линий рака молочной железы и представляют собой наиболее благоприятный вариант эффективности гибридизации. Таким образом, в этих условиях ожидается, что эффективность гибридизации составит 98%, при этом <2% клеток будут демонстрировать отсутствие сигнала для каждого зонда.

Аналитическая чувствительность

Аналитическую чувствительность зондов из набора PathVysion Kit проверяли в исследовании воспроизводимости, описанном ниже. В этом исследовании образец с отношением HER-2/*neu* к CEP 17 от 1,0 до 1,2 оценивали со средним значением 1,05 (± 0,03), а образец с отношением HER-2/*neu* к CEP 17 от 1,6 до 2,0 оценивали со средним значением 1,81 (± 0,08). Верхний 95% ДИ для образца с отношением от 1,0 до 1,2 составлял 1,11, а нижний 95% ДИ для образца от 1,6 до 2,0 составлял 1,65. Таким образом, предел обнаружения набора PathVysion Kit в интерфазных клетках, по оценкам, составляет 1,5.

Аналитическая специфичность

Исследования специфичности локуса проводили с использованием метафазных пластинок нормальных лимфоцитов в соответствии со стандартными протоколами ОКК компании Abbott Molecular. В общей сложности 254 метафазных пластинок последовательно исследовали методом G-бэндинга для идентификации хромосомы 17 и локуса гена HER-2/*neu*, с последующей флуоресцентной гибридизацией in situ (FISH). Никакой перекрестной гибридизации с другими локусами хромосом не наблюдалось ни в одной из 254 исследованных клеток. Гибридизация была ограничена намеченными целевыми областями двух зондов.

В соответствии со стандартными протоколами компании Abbott Molecular были также проведены исследования строгости на зафиксированных формалином и залитых парафином образцах ткани для определения оптимального времени и температуры денатурации, времени и температуры гибридизации, времени и температуры промывки после гибридизации, и состава буфера для промывки после гибридизации. Для стадии денатурации испытывали 3 температуры (65°C, 73°C и 80°C) по 2 минут, 5 минут и 8 минут каждая. Результаты не показали статистической разницы в общей оценке всех температур и продолжительности денатурации. Все комбинации прошли оценку качества. Проверка строгости стадии гибридизации состояла из 2 частей: сначала гибридизацию проводили при 5 различных температурах (27°C, 32°C, 37°C, 42°C и 47°C) в течение 18 часов, затем в течение 5 различных периодов времени (10, 14, 18, 22 и 26 часов) при рекомендованной температуре (37°C). На гибридизацию значительно влияли как температура, так и время гибридизации, при этом самые высокие общие показатели качества были получены при гибридизации при температуре 37°C в течение 18 часов, хотя статистически значимых различий в качестве гибридизации между 14 и 18 часами отмечено не было. Таким образом, рекомендуемое время инкубации составляет от 14 до 18 часов. Стадию промывки после гибридизации проверяли аналогичным образом. Первые анализы проводили при 5 различных температурах (69°C, 71°C, 73°C, 76°C, и 80°C), затем при различной продолжительности, в пределах от 2 до 8 минут при температуре 73°C. Существенным фактором была температура промывки, при этом самые высокие показатели были получены при температуре 73°C. Приемлемые результаты были получены при времени промывки от 2 до 5 минут, но увеличение времени промывки до 8 минут значительно снизило общий показатель качества некоторых образцов. Следовательно, рекомендуемые условия промывки после гибридизации составляют 72 ± 1°C в течение 2 минут. Также был проанализирован состав промывочного буфера для определения влияния на интенсивность сигнала и специфичность зонда. Увеличение концентрации соли с 0,4X SSC до 2X SSC увеличивало интенсивность сигнала, но, по всей видимости, не ухудшало специфичность зонда. Таким образом, рекомендуемым составом промывочного буфера является 2X SSC/0,3% NP-40.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Доклинические исследования воспроизводимости и повторяемости

Воспроизводимость анализа PathVysion для HER-2/*neu* определяли на последовательных срезах нормальной и амплифицированной ткани молочной железы, а также на срезах одной и той же ткани разной толщины. На 10 последовательных срезах ткани одной нормальной ткани молочной железы среднее отношение количества копий LSI HER-2/*neu* к CEP 17 составило 1,19 (CO = 0,05). Результаты представлены в таблице 6. На 10 последовательных срезах ткани из 1 образца с амплифицированным геном HER-2/*neu* среднее отношение количества копий HER-2/*neu* к CEP 17 составило 3,61 (CO = 0,50). Результаты представлены в таблице 7. Точно так же на 8 последовательных срезах нормальной ткани разной толщины (от 2 до 8 мкм) среднее отношение количества копий HER-2/*neu* к CEP 17 составило 1,15 (CO = 0,16). Эти результаты (показанные в таблице 8) свидетельствуют о приемлемой степени воспроизводимости анализа HER-2/*neu* методом FISH на срезах ткани толщиной от 4 до 8 мкм.

Таблица 6. Среднее количество сигналов на клетку и отношение количества копий LSI HER-2/*neu* к CEP 17 в последовательных срезах (с нормальным HER-2/*neu*)

	Номер среза									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LSI HER-2	3,8	3,2	3,6	3,5	3,6	3,5	3,4	3,5	3,3	3,1
CEP 17	3,1	3,1	3,0	2,7	3,0	3,0	2,8	2,1	3,0	2,7
Отношение	1,2	1,2	1,2	1,3	1,2	1,2	1,2	1,6	1,1	1,1

Таблица 7. Среднее количество сигналов на клетку и отношение количества копий LSI HER-2/*neu* к CEP 17 в последовательных срезах (с амплифицированным геном HER-2/*neu*)

	Номер среза									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LSI HER-2	4,7	4,9	5,9	4,5	3,6	4,6	4,6	4,8	4,5	4,2
CEP 17	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,4	1,3	1,4	1,3
Отношение	3,9	3,7	4,7	3,6	2,8	3,7	3,3	3,8	3,3	3,3

Таблица 8. Среднее количество сигналов на клетку и отношение количества копий LSI HER-2/*neu* к CEP 17 в последовательных срезах разной толщины

	Толщина среза (мкм)							
	2	2	4	4	6	6	8	8
LSI HER-2	2,3	2,4	2,4	2,7	2,7	2,8	2,6	3,3
CEP 17	1,7	1,8	2,3	2,5	2,7	2,7	2,5	3,2
Отношение	1,4	1,4	1,1	1,1	1,0	1,1	1,1	1,0

Воспроизводимость с использованием контрольных предметных стекол

Для оценки воспроизводимости анализа PathVysion, анализы отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17 оценивали на воспроизводимость от участка к участку, воспроизводимость от партии к партии, ежедневную воспроизводимость и воспроизводимость от наблюдателя к наблюдателю на контрольных предметных стеклах с различными уровнями амплификация гена HER-2/*neu*. Четыре образца, состоящие из зафиксированной формалином и залитой парафином ткани, полученной из линий опухолевых клеток молочной железы человека, с нормальным (от 1,0 до 1,2) и амплифицированным (1,6 до 2,0, от 3 до 5, 7 до 11) отношениями LSI HER-2/*neu* к CEP 17, оценивали на LSI HER-2/*neu* и CEP 17 согласно инструкции по подсчету сигналов, представленной в листке-вкладыше. Общий показатель успешности гибридизации составил 98,3% (118/120) с первой попытки. Гибридизация 2 замененных предметных стекол прошла успешно. При использовании дисперсионного анализа наблюдались статистически значимые различия между наблюдателями, которые отражают субъективность в интерпретации и подсчете сигналов. Никаких статистически значимых изменений ни по одному из других параметров исследования не наблюдалось. Среднее значение, стандартное отклонение и процент КВ наблюдаемых отношений LSI HER-2/*neu* к CEP 17 показаны в **таблицах с** 9 по **12**.

Таблица 9. Воспроизводимость от участка к участку

Отношение LSI HER-2/*neu* к CEP 17	Статистика	Участок № 1	Участок № 2	Участок № 3
От 0,1 до 1,2	Среднее значение	1,08	1,01	1,07
	CO	0,03	0,04	0,07
	КВ (%)	2,66	3,58	6,77
	n	8	8	8
От 1,6 до 2,0	Среднее значение	1,81	1,71	1,78
	CO	0,05	0,05	0,19
	КВ (%)	2,88	2,78	10,50
	n	8	8	8
От 3,0 до 5,0	Среднее значение	4,39	3,65	4,49
	CO	0,22	0,18	0,79
	КВ (%)	4,99	4,93	17,64
	n	8	8	8

CO = стандартное отклонение; КВ (%) = коэффициент вариации

Таблица 10. Воспроизводимость от партии к партии

Отношение LSI HER-2/*neu* к CEP 17	Статистика	Партия № 1	Партия № 2	Партия № 3	Партия № 4
От 0,1 до 1,2	Среднее значение	1,05	1,07	1,02	1,04
	CO	0,07	0,06	0,03	0,05
	КВ (%)	6,48	6,06	3,21	4,87
	n	6	6	6	6
От 1,6 до 2,0	Среднее значение	1,78	1,77	1,77	1,75
	CO	0,10	0,13	0,15	0,09
	КВ (%)	5,65	7,49	8,54	5,07
	n	6	6	6	6
От 3,0 до 5,0	Среднее значение	4,08	3,92	4,57	4,14
	CO	0,44	0,34	0,96	0,40
	КВ (%)	10,78	8,74	20,92	9,56
	n	6	6	6	6
От 7,0 до 11	Среднее значение	7,67	7,72	7,89	8,33
	CO	0,69	0,72	0,88	1,06
	КВ (%)	8,97	9,36	11,16	12,68
	n	6	6	6	6

CO = стандартное отклонение; КВ (%) = коэффициент вариации

Таблица 11. Ежедневная воспроизводимость

Отношение LSI HER-2/*neu* к CEP 17	Статистика	День анализа № 1	День анализа № 2	День анализа № 3	День анализа № 4
От 0,1 до 1,2	Среднее значение	1,06	1,07	1,02	1,04
	CO	0,06	0,07	0,05	0,04
	КВ (%)	5,65	6,61	4,58	4,03
	n	6	6	6	6
От 1,6 до 2,0	Среднее значение	1,76	1,77	1,77	1,77
	CO	0,17	0,14	0,08	0,10
	КВ (%)	9,62	7,99	4,31	5,65
	n	6	6	6	6
От 3,0 до 5,0	Среднее значение	4,24	4,48	4,10	3,89
	CO	0,48	0,97	0,36	0,38
	КВ (%)	11,25	21,56	8,89	9,71
	n	6	6	6	6
От 7,0 до 11	Среднее значение	7,91	8,01	7,72	7,97
	CO	1,11	0,90	0,57	0,89
	КВ (%)	13,99	11,22	7,39	11,20
	n	6	6	6	6

CO = стандартное отклонение; КВ (%) = коэффициент вариации

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 12. Воспроизводимость от наблюдателя к наблюдателю

Отношение LSI HER-2/*neu* к CEP 17	Статистика	Наблюдатель № 1	Наблюдатель № 2
От 0,1 до 1,2	Среднее значение	1,06	1,04
	CO	0,07	0,03
	КВ (%)	7,00	2,85
	n	12	12
От 1,6 до 2,0	Среднее значение	1,71	1,82
	CO	0,10	0,11
	КВ (%)	6,01	6,20
	n	12	12
От 3,0 до 5,0	Среднее значение	4,05	4,31
	CO	0,44	0,73
	КВ (%)	10,80	16,84
	n	12	12
От 7,0 до 11	Среднее значение	7,52	8,28
	CO	0,49	0,95
	КВ (%)	6,55	11,44
	n	12	12

CO = стандартное отклонение; КВ (%) = коэффициент вариации

Переносимость анализа

Для оценки переносимости анализа было проведено 5-центровое слепое рандомизированное сравнительное исследование с использованием зафиксированных формалином и залитых парафином образцов рака молочной железы человека.24 Исследуемые образцы состояли из зафиксированных формалином и залитых парафином срезов ткани рака молочной железы человека с различными уровнями амплификации гена HER-2/*neu*. Образцы включали 1 нормальный (без амплификации), 2 с низким уровнем и 1 с умеренным уровнем амплификации гена HER-2/*neu*, как было определено методом FISH.

Ежедневная воспроизводимость

В **таблице 13** представлены средние наблюдаемые отношения LSI HER-2/neu к CEP 17 за 3 дня анализа. Как видно из *P*-значения, статистически значимых изменений в значениях отношений за 3 дня исследования (все P-значения > 0,05) отмечено не было. Результаты этого исследования свидетельствуют о том, что анализ PathVysion воспроизводится изо дня в день.

Таблица 13. Сводная статистика по отношению LSI HER-2/*neu* к CEP 17 по дням анализа

Ожидаемое отношение	Статистика	День анализа № 1	День анализа № 2	День анализа № 3	*P*-значение
От 0,1 до 1,2	Среднее значение	1,01	1,06	1,05	0,6826
	CO	0,10	0,12	0,08	
	КВ (%)	9,90	11,32	7,62	
	n	15	15	15	
От 2,1 до 2,8	Среднее значение	2,54	2,43	2,32	0,5535
	CO	0,19	0,32	0,22	
	КВ (%)	7,48	13,17	9,52	
	n	15	15	15	
ОТ 2,5 до 3,5	Среднее значение	3,18	2,98	3,03	0,2083
	CO	0,30	0,31	0,32	
	КВ (%)	9,43	10,40	10,56	
	n	15	15	15	
От 5,0 до 7,0	Среднее значение	5,69	5,63	5,69	0,9620
	CO	0,53	0,49	0,86	
	КВ (%)	9,31	8,70	15,11	
	n	15	15	15	

CO = стандартное отклонение; КВ (%) = коэффициент вариации

Воспроизводимость от участка к участку

В **таблице 14** представлены средние наблюдаемые отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17 для 5 исследовательских центров. Наблюдались некоторые статистически значимые различия в значении соотношения между 5 исследовательскими центрами (*P* = <0,05 для нормального образца и образца от 2,5 до 3,5). Однако эти различия не были клинически значимыми. 99% образцов были правильно классифицированы как положительные или отрицательные на амплификацию гена HER-2/neu. Сводка вариантов анализа по всем 5 представлена в таблице 15. Стандартное отклонение (CO) и коэффициент вариации (КВ) были относительно небольшими и стабильными для всех отношений LSI HER-2/*neu* к CEP 17.

Таблица 14. Воспроизводимость от участка к участку

Ожидаемое отношение	Статистика	Участок № 1	Участок № 2	Участок № 3	Участок № 3	Участок № 3	*P*-значение
От 0,1 до 1,2	Среднее значение	1,00	1,16	1,01	1,04	0,97	0,0001
	CO	0,09	0,09	0,07	0,09	0,04	
	КВ (%)	9,00	7,76	6,93	8,65	4,12	
	n	9	9	9	9	9	
От 2,1 до 2,8	Среднее значение	2,40	2,46	2,57	2,26	2,65	0,0965
	CO	0,19	0,26	0,52	0,22	0,24	
	КВ (%)	7,92	10,60	20,20	9,73	9,06	
	n	9	9	9	9	9	
ОТ 2,5 до 3,5	Среднее значение	3,01	3,09	3,41	2,74	3,08	< 0,0001
	CO	0,21	0,35	0,20	0,23	0,16	
	КВ (%)	6,98	11,30	5,87	8,39	5,19	
	n	9	9	9	9	9	
От 5,0 до 7,0	Среднее значение	5,48	5,22	5,94	5,82	5,91	0,0568
	CO	0,66	0,43	0,56	0,89	0,18	
	КВ (%)	12,0	8,24	9,43	15,30	3,05	
	n	9	9	9	9	9	

CO = стандартное отклонение; КВ (%) = коэффициент вариации

Сводка вариантов анализа по всем 5 представлена в **таблице 15**. Стандартное отклонение (CO) и коэффициент вариации (КВ) были относительно небольшими и стабильными для всех отношений LSI HER-2/*neu* к CEP 17.

Таблица 15. Резюме воспроизводимости от участка к участку

Отношение LSI HER-2/*neu* к CEP 17	Среднее значение	CO	КВ (%)	N
От 0,1 до 1,2	1,04	0,10	9,60	45
От 2,1 до 2,8	2,47	0,32	12,96	45
ОТ 2,5 до 3,5	3,07	0,31	10,10	45
От 5,0 до 7,0	5,67	0,63	11,11	45

CO = стандартное отклонение; КВ (%) = коэффициент вариации

В данном исследовании показатель эффективности гибридизации составил 100%, что подтверждает простоту использования набора PathVysion.

Клинические исследования

Доза циклофосфамида, адриамицина (доксорубицина) и 5-фторурацила (CAF), исследование CALGB 8869

Взаимодействие между амплификацией гена HER-2/*neu* и дозой CAF оценивали в ретроспективном анализе единичного рандомизированного клинического исследования CALGB 8869. Это было большое проспективное рандомизированное исследование у пациентов с раком молочной железы с поражением лимфатических узлов II стадии, в котором оценивали 3 различные дозы адъювантной химиотерапии CAF:

- Высокая доза (циклофосфамид 600 мг/м^2, доксорубицин 60 мг/м^2 и 5-фторурацил 600 мг/м^2 в течение 4 циклов),
- Умеренная доза (циклофосфамид 400 мг/м^2, доксорубицин 40 мг/м^2 и 5-фторурацил 400 мг/м^2 в течение 6 циклов), или
- Низкая доза (циклофосфамид 300 мг/м^2, доксорубицин 30 мг/м^2 и 5-фторурацил 300 мг/м^2 в течение 4 циклов).

Дозы вводили с 28-дневным циклом.

Помещенные в архив образцы тканей 572 пациентов, выбранных случайным образом из исходной исследуемой популяции, были включены в анализ методом FISH с использованием ДНК-зонда. Целями этого исследования являлись определение того, дает ли амплификация гена HER-2/*neu* статистически значимую и независимую прогностическую информацию, относящуюся к выживаемости без признаков заболевания и общей выживаемости у пациентов с раком молочной железы с поражением лимфатических узлов II стадии, получающих адъювантную терапию CAF, и изучение взаимосвязи между амплификацией гена HER-2/*neu* и клиническими данными, включая такие факторы, как степень злокачественности опухоли и стероид-рецепторный статус.

Среди этих 572 образцов опухолей 45 были исключены из-за неудачных результатов анализа методом FISH, а 3 были дублирующими. Осталось 524 случая для анализа. При использовании набора PathVysion, амплификация гена HER-2/*neu* составляла > 2 (т.е. отношение среднего сигнала HER-2/neu к среднему сигналу CEP 17 с 60 подсчитанными ядрами). В общей сложности 433 образца пациентов оказались HER-2/*neu*-отрицательными и 91 HER-2/*neu*-положительными.

В **таблице 16** перечислены несколько исходных характеристик 524 пациентов, у которых для оценки были взяты помещенные в архив образцы опухолей, а также представлены подробные данные адъювантного лечения, полученного в исходном исследовании CALGB 8869.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 16. Сравнение характеристик пациентов на исходном уровне и подробные данные адъювантного лечения

	С амплификацией HER-2/*neu** n = 91	Без амплификации HER-2/*neu** n = 433
Возраст		
< 40	17,6	14,5
40-50	39,6	40,0
> 50	42,9	48,5
Предклимактерический	46,2	39,5
Пери/постклимактерический	53,8	60,5
Размер опухоли		
< 2 см	31,9	37,2
От > 2 до < 5	57,1	58,4
> 5	9,9	3,9
неизвестно	1	0,5
Метастаз-позитивные узлы		
< 3	59,3	55,9
4-9	27,5	34,9
> 10	13,2	9,2
ER (+)	49,5	71,4
PR (+)	35,2	61,7
ER (+) или PR (+)	60,4	77,8
Режим дозирования CAF получен		
Высокий	33,0	34,4
Умеренный	34,1	31,4
Низкий	33,0	34,2

* Процент пациентов
ER = эстроген; PR = прогестерон

Результаты анализа выживаемости без признаков заболевания с моделью пропорциональных рисков Кокса и измерения амплификации гена HER-2/*neu* методом FISH показали статистически значимое взаимодействие между амплификацией гена HER-2/*neu* и режимом дозирования CAF (P = 0,033, критерий правдоподобия; см. **таблицу 17**). Аналогичным образом, результаты анализа общей выживаемости по модели пропорциональных рисков Кокса также свидетельствуют о статистически значимом взаимодействии между амплификацией гена HER-2/*neu* и полученным режимом дозирования CAF (P = 0,028, критерий правдоподобия; см. **таблицу 17**).

Таблица 17. Модель пропорциональных рисков Кокса, показывающая критерий отношения правдоподобия для выживаемости без признаков заболевания и общей выживаемости

Источник	Выживаемость без признаков заболевания			Общая выживаемость		
	DF	ChiSq	P-значение	DF	ChiSq	P-значение
CAF	2	5,56	0,06	2	4,57	0,10
Квадратный корень: кол-во метастаз-позитивных узлов	1	72,87	0,0000	1	56,32	0,0000
Опухоль > 2 см	1	13,77	0,0002	1	12,93	0,0003
Предклимактерический	1	1,96	0,16	1	0,10	0,76
Отношение HER-2	1	10,05	0,0015	1	10,52	0,0012
Зависимость отношения HER-2 от дозы CAF	2	6,84	0,033	2	7,15	0,028

DF = степени свободы; ChiSq = хи-квадрат

Вероятности выживаемости без признаков заболевания (**таблица 18, рис. 3a**) сопоставимы в трех группах пациентов с *HER-2/neu*-отрицательными опухолями. Например, через 7 лет после рандомизации оценочная вероятность выживания без признаков заболевания составляет 55%, 63% и 61% для групп с низкой (L), умеренной (M) и высокой (H) дозой CAF, соответственно. Эффект дозы больше у пациентов с HER-2/*neu*-положительными опухолями (**таблица 18, рисунок 3b**), при этом выживаемость без признаков заболевания в дозовых группах L, M и H CAF через 7 лет составила 36%, 44% и 66%, соответственно. Соответствующие показатели общей выживаемости через 7 лет (**таблица 19, рисунок 3c**) имеют аналогичное отношение: 64%, 75% и 70% у пациентов с HER-2/*neu*-отрицательными опухолями и 48%, 50% и 76% у пациентов с HER-2/*neu*-положительными опухолями, и снова для дозовых групп L, M и H CAF, соответственно (**таблица 19, рисунок 3d**).

Таблица 18. Вероятность выживаемости без признаков заболевания

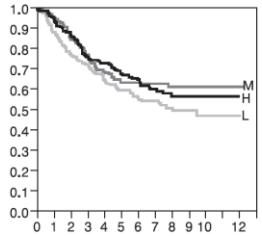
Доза CAF	HER-2/*neu*-отрицательный	HER-2/*neu*-положительный
Низкий	55%	36%
Умеренный	63%	44%
Высокий	61%	66%

Таблица 19. Вероятности общей выживаемости

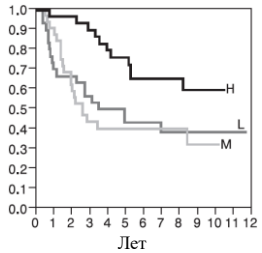
Доза CAF	HER-2/*neu*-отрицательный	HER-2/*neu*-положительный
Низкий	64%	48%
Умеренный	75%	50%
Высокий	70%	76%

Рисунок 3. Выживаемость без признаков заболевания (a, b) и общая (c, d) выживаемость пациентов с HER-2/*neu*-отрицательными (a, c) и положительными (b, d) опухолями в трех дозовых группах CAF H, M, и L*

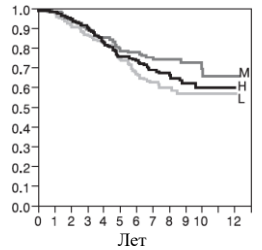
(a) Выживаемость без признаков заболевания при HER-2/*neu*-отрицательных опухолях



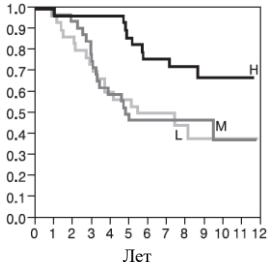
(b) Выживаемость без признаков заболевания при HER-2/*neu*-положительных опухолях



в) Общая выживаемость при HER-2/*neu*-отрицательных опухолях



(d) Общая выживаемость при HER-2/*neu*-положительных опухолях



*HER-2/neu-положительность означает HER/CEP ≥ 2. Размеры выборки при (a, c) составляют 149, 136 и 148 (для H, M и L), а при (b, d) - 30, 31 и 30.
Уровни значимости HER-2/neu по взаимодействию с CAF на основании моделей пропорциональных рисков (**таблица 17**) составляют 0,033 в случае выживаемости без признаков заболевания - (a) по сравнению с (b) - и 0,028 в случае общей выживаемости - (c) по сравнению с (d).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Анализ исследуемых образцов методом FISH показал, что у пациентов с амплификацией гена HER-2/*neu* наблюдался значительный дозозависимый эффект адъювантной химиотерапии с CAF, но не у пациентов без амплификации или с минимальной амплификацией гена HER-2/*neu*. Эта связь была обнаружена в отношении как выживаемости без признаков заболевания, так и общей выживаемости. Кроме того, в этом исследовании не было обнаружено корреляции между количеством копий HER-2/*neu*, оцененным методом FISH, и возрастом пациента, менопаузальным статусом, размером опухоли или количеством метастаз-позитивных узлов. Статистически значимая отрицательная корреляция наблюдалась между количеством копий HER-2/*neu* и статусом рецепторов эстрогена (ER) и прогестерона (PR).

Соответствие анализу в рамках клинических исследований (CTA)

Первичный механизм сверхэкспрессии белка HER-2/*neu* при раке молочной железы человека, по-видимому, связан с амплификацией гена.[25-28] Обнаружение амплификации гена HER-2/*neu* методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) является дополнительным диагностическим методом определения сверхэкспрессии HER-2/*neu*.

Набор PathVysion сравнивали с CTA, который использовался для включения пациентов в опорные исследования препарата HERCEPTIN, спонсируемые Genentech (H0648g, H0649g и H0650g).[26,27] Для установления соответствия между FISH и CTA, подмножество из 623 образцов (317 положительных и 306 отрицательных, как было определено в CTA) было случайным образом выбрано в предполагаемом соотношении 1:1 из образцов, отобранных для включения в исследования HERCEPTIN. Анализы методом FISH проводились на всех образцах. Содержательные результаты были получены на 529 образцах. Результаты анализа 529 информативных случаев представлены в **таблице 20**.

Таблица 20. CTA по сравнению с FISH

	Показатель CTA				
FISH	0	1+	2+	3+	**Всего**
Отрицательный	207 7	28	67	21	323
Положительный	(3,2%)	2 (6,7%)	21 (23,9%)	176 (89,3%)	206
всего	214	30	88	197	529

Результаты свидетельствуют о соответствии 2 x 2 82% (95% доверительный интервал от 79 до 85%), где соответствие было определено как доля образцов с показателем 0 или 1+ по CTA и неамплифицированных по FISH, плюс доля образцов с показателем 2+ или 3+ по CTA и амплифицированных по FISH. Эти данные согласуются с высокой степенью соответствия между сверхэкспрессией белка (как было определено в иммуногистохимическом анализе [CTA]) и амплификацией гена (как определено методом FISH [Набор PathVysion Kit]).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РАК ЖЕЛУДКА

Требуемые, но не предоставляемые материалы

Лабораторные реагенты

- Реагенты для предварительной обработки желудка (ручной анализ)
  - Протеаза IV, 75 мг (номер по списку 06N46-001)
- Реагенты для предварительной обработки желудка (автоматический анализ - VP 2000)
  - Протеаза IV, 750 мг (номер по списку 06N46-002)
  - Стандартный солевой раствор (20X SSC): 500 г (номер по списку 02J10-032)
- Осветляющий агент Hemo-De (или аналог, например, d-лимонен)
- Гематоксилин и эозин (H&E)
- Иммерсионное масло, подходящее для флуоресцентной микроскопии. Хранить при комнатной температуре (от 15 до 30°C).
- Этанол (100%). Хранить при комнатной температуре.
- Концентрированный (12 н.) раствор хлористоводородной кислоты (HCl)
- 1 н. раствор HCl
- Натрия гидроксид (NaOH)
- Очищенная вода (дистиллированная, деионизированная или вода качества Milli-Q). Хранить при комнатной температуре.
- Каучуковый клей

ПРИМЕЧАНИЕ. Если условия хранения не указаны, храните реагенты в соответствии с рекомендациями поставщика.

Лабораторное оборудование

- Процессор VP 2000
- ThermoBrite (номер по списку 07J91-010 или 07J91-020)
- Карты влажности ThermoBrite (номер по списку 07J68-001)
- Предварительно очищенные силанизированные или положительно заряженные предметные стекла
- Покровное стекло 22мм x 22мм
- Микролитровая пипетка (от 1 до 10 мкл) и стерильные наконечники
- Таймер
- Микротом
- Микроцентрифуга
- Магнитное перемешивающее устройство
- Вихревая мешалка
- Мерный цилиндр
- Водяные бани с циркуляцией (73°C и 80°C)

ПРИМЕЧАНИЕ. Статические водяные бани не обеспечивают адекватный контроль температуры для бани с более высокой температурой.

- Водяная баня с циркуляцией или без нее (37°C)
- Безбелковая водяная баня (40 ± 2°C)
- Воздушные инкубаторы/духовка/электроплитка (56 ± 2°C)
- Резец для стекла
- Пинцеты
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Сосуды Коплина (от 50 до 70 мл); Предлагаемый тип: вертикальный сосуд для окрашивания
- Флуоресцентный микроскоп с рекомендованными фильтрами (см. следующий раздел)
- pH-метр
- Калиброванный термометр
- Коробка с предметными стеклами с крышкой
- Фильтрационная установка с порами размером 0,22 или 0,45 мкм

Микроскопическое оборудование и принадлежности

Микроскоп: Для просмотра результатов гибридизации необходим флуоресцентный микроскоп с осветителем отражённого света. Микроскоп должен быть проверен, чтобы убедиться, что он работает правильно, чтобы обеспечить оптимальный осмотр образцов при анализе флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) Микроскоп, используемый для обнаружения общих следов ДНК, таких как DAPI, йодид пропидия и квинакрин, может работать неправильно для анализов флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Рекомендуется регулярная очистка микроскопа и периодическое техническое обслуживание, особенно выравнивание ртутной лампы, техническим представителем изготовителя.

ПРИМЕЧАНИЕ: часто предполагаемый отказ реагентов в анализе in situ может фактически указывать на то, что для просмотра успешно проведенного анализа на гибридизацию используется неисправный или неоптимальный флуоресцентный микроскоп или неправильный набор фильтров.

Источник света возбуждения: Рекомендуемым источником возбуждения является 100-ваттная ртутная лампа или другая лампа с аналогичной интенсивностью и спектральной выходной мощностью. Регистрируют количество часов, в течение которых использовалась лампа, и заменяют ее до того, как номинальное время работы будет превышено. Убеждаются, что лампа правильно выровнена.

Объективы: Используйте масляные иммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥ 0,75 при использовании микроскопа со 100 - ваттной ртутной лампой или другой лампой с аналогичной интенсивностью и спектральной выходной мощностью. Объектив с 25-кратным увеличением в сочетании с окулярами 10-кратного увеличения подходит для определения местоположения цели. Объектив с 40-кратным увеличением в сочетании с окулярами 10-кратного увеличения подходит для сканирования. Удовлетворительные результаты определения числа сигналов FISH могут быть получены с помощью масляного погружного ахроматического объектива с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: Иммерсионное масло, используемое с масляными иммерсионными объективами, должно быть предназначено по составу для низкой автофлуоресценции и специально для использования в флуоресцентной микроскопии.

Фильтры: Наборы однополосных флуоресцентных фильтров для микроскопов, оптимизированные для использования с PathVysion Kit II, можно приобрести у компании Abbott Molecular для большинства моделей микроскопов. Рекомендуемые наборы фильтров для набора PathVysion Kit II: однополосный оранжевый, однополосный зеленый и однополосный DAPI. Гибридизация зондов LSI HER-2/*neu* и CEP 17 с их целевыми областями отмечена оранжевой и зеленой флуоресценцией соответственно. Вся остальная ДНК будет флуоресцировать синим цветом с окрашиванием DAPI.

Использование этого фильтра Vysis	Позволяет добиться возбуждения и выделения...
Оранжевый однополосный	Флурофор SpectrumOrange
Зеленый однополосный	Флурофор SpectrumGreen
Однополосный DAPI	DAPI (4,6-Диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид)

Приготовление исходных реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ. В соответствующих случаях измеряют pH этих растворов при комнатной температуре. Если не указано иное, используют pH-метр со стеклянным электродом.

Стандартный солевой раствор (20X SSC) (250 мл для предварительной обработки в ручном анализе)

Для приготовления объединяют:

66 г	Стандартный солевой раствор (20X SSC)
200 мл	вода очищенная

Тщательно перемешивают. Доводят до 250 мл водой очищенной. Фильтруют через фильтр с порами размером 0,22 или 0,45 мкм. Хранят при комнатной температуре в течение не более 6 месяцев.

Стандартный солевой раствор (20X SSC) (500 мл для автоматического анализа - предварительная обработка VP 2000)

Для приготовления объединяют:

132 г	Стандартный солевой раствор (20X SSC)
400 мл	вода очищенная

Тщательно перемешивают. Доводят до 500 мл водой очищенной. Фильтруют через фильтр с порами размером 0,22 или 0,45 мкм. Хранят при комнатной температуре в течение не более 6 месяцев.

Раствор для предварительной обработки (1X SSC) (1 л)

Для приготовления объединяют:

50 мл	Стандартный солевой раствор (20X SSC)
900 мл	вода очищенная

Тщательно перемешивают. Измеряют pH и регулируют pH до 6,3 ± 0,2 с помощью NaOH или HCl. Добавляют воду очищенную, чтобы довести конечный объем до 1 литра. Фильтруют через фильтр с порами размером 0,22 или 0,45 мкм. Хранят при комнатной температуре в течение не более 6 месяцев.

Растворы этанола

Готовят разведения об/об 70%, 85% и 100% этанола, используя 100% этанол и очищенную воду. Когда не используют, хранят при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах.

Промывочный буфер после гибридизации (2X SSC/0,3% NP-40) (1 л)

Для приготовления объединяют:

100 мл	Стандартный солевой раствор (20X SSC)
850 мл	вода очищенная
3 мл	NP-40

Тщательно перемешивают. Измеряют pH при комнатной температуре с помощью pH-метра. Регулируют pH до 7,0-7,5 с помощью NaOH или HCl. Объем доводят до 1 литра водой очищенной. Фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 или 0,45 мкм. Неиспользованный раствор хранят при комнатной температуре в течение не более 6 месяцев.

Протеазный буфер (0,1 н. раствор HCl) (1 л)

Для приготовления объединяют:

100 мл	1 н. раствор HCl
900 мл	вода очищенная

Тщательно перемешивают. Неиспользованный раствор хранят при комнатной температуре в течение не более 6 месяцев.

Подготовка рабочих реагентов для ручной процедуры

ПРИМЕЧАНИЕ. Объемы растворов указаны для сосудов Коплина на 50-70 мл (см. «Лабораторное оборудование»). При использовании разных сосудов Коплина могут потребоваться большие объемы. Раствора должно быть достаточно, чтобы покрыть целевую область, но не настолько, чтобы полностью погрузить в него этикетки предметных стекол.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Осветляющий агент Hemo-De
3 сосуда Коплина заполняют 50-70 мл осветляющего агента Hemo-De. Выбрасывают после 1 недели использования.
Раствор для предварительной обработки
От 50 до 70 мл стандартного солевого раствора (1X SSC) с pH 6,3 помещают в сосуд Коплина. Перед предварительной обработкой предметных стекол сосуд комнатной температуры нагревают до 80 ± 1°C на водяной бане с циркуляцией. Перед использованием проверяют, чтобы температура раствора составляла 80 ± 1°C. Выбрасывают после 1 дня использования.
Раствор протеазы (1,5 мг/мл)
75 мг протеазы (номер по списку 06N46-001) добавляют к 50 мл 0,1 н. раствора HCl для получения конечной концентрации протеазы 1,5 мг/мл. Осторожно перемешивают. Раствор протеазы помещают в сосуд Коплина, а сосуд Коплина помещают в водяную баню при 37 ± 1°C. Выдерживают в течение не менее 30 минут, периодически перемешивая перед началом анализа, и перед использованием проверяют, чтобы температура буфера составляла 37 ± 1°C. Перед использованием визуально убеждаются в том, что протеаза полностью растворилась. Раствор выбрасывают через 1 день использования.
Вода очищенная
1 сосуд Коплина заполняют 50-70 мл воды очищенной. Используют при комнатной температуре.
Растворы этанола
Растворы можно использовать в течение 1 недели до тех пор, пока не будет отмечено испарение или раствор не станет слишком разбавленным из-за чрезмерного использования.
3 сосуда Коплина заполняют 50-70 мл 100% этанола.
1 сосуд заполняют 50-70 мл 85% этанола.
1 сосуд заполняют 50-70 мл 70% этанола.

Приготовление рабочих реагентов для процедуры VP 2000

Осветляющий агент Hemo-De
3 емкости VP 2000 (комнатной температуры) заполняют 500 мл осветляющего агента Hemo-De каждый. Выбрасывают после 1 недели использования.
Раствор для предварительной обработки
500 мл стандартного солевого раствора (1X SSC) с pH 6,3 помещают в емкость VP 2000 (нагретую). Перед предварительной обработкой предметных стекол раствор комнатной температуры нагревают до 80°C. Перед использованием проверяют, чтобы температура раствора составляла 80°C. Выбрасывают после 1 дня использования.
Раствор протеазы (1,5 мг/мл)
750 мг протеазы (номер по списку 06N46-002) добавляют к 500 мл 0,1 н. раствора HCl в емкости VP 2000 до достижения конечной концентрации 1,5 мг/мл. Осторожно перемешивают и нагревают до 37 ± 1°C. Выдерживают в течение не менее 30 минут, периодически перемешивая перед началом анализа, и перед использованием проверяют, чтобы температура буфера составляла 37 ± 1°C. Перед использованием визуально убеждаются в том, что протеаза полностью растворилась. Раствор выбрасывают через 1 день использования.
Вода очищенная
VP 2000 должен быть подключен к источнику воды очищенной для подпитки проточной промывной емкости.
Растворы этанола
Растворы можно использовать в течение 1 недели до тех пор, пока не будет отмечено испарение или раствор не станет слишком разбавленным из-за чрезмерного использования.
3 емкости VP 2000 (комнатной температуры) заполняют 500 мл 100% этанола каждую. 1 емкость VP 2000 (комнатной температуры) заполняют 500 мл 85% этанола.
1 емкость VP 2000 (комнатной температуры) заполняют 500 мл 70% этанола.

ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКОЛ

Отбор и обработка образцов

Набор PathVysion Kit II предназначен для использования с залитыми парафином образцами ткани рака желудка, зафиксированными формалином (10% забуференный нейтральный формалин). Сбор тканей должен выполняться в соответствии со стандартными лабораторными процедурами. Следует избегать воздействия на образцы кислот, сильных оснований или очень высоких температур. Такие условия, как известно, повреждают ДНК и могут привести к сбою анализа флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).
Ткань желудка следует готовить в виде срезов толщиной от 4 до 6 мкм. Зафиксированную формалином и залитую парафином ткань можно использовать и хранить в соответствии со стандартными лабораторными процедурами. Для обеспечения оптимальных результатов при использовании набора PathVysion Kit II, эти методы должны быть согласованы по всем анализируемым образцам.
Срезы тканей следует размещать на положительно заряженной стороне предметного стекла с органосилановым покрытием, чтобы минимизировать отделение ткани от предметного стекла во время проведения анализа методом FISH. Набор PathVysion Kit II содержит реагенты, достаточные примерно для проведения 20, 50 или 100 тестов. Один тест для набора PathVysion Kit II определяется как площадь 22 мм x 22 мм. Для больших срезов образцов потребуется более 10 мкл зонда на тест.

Приготовление предметного стекла из зафиксированной формалином и
залитой парафином ткани

1. С помощью микротома вырезают парафиновые срезы толщиной 5 ± 1 мкм.
2. Срезы помещают на безбелковую водяную баню при температуре 40 ± 2°C.
3. Срез устанавливают на положительно заряженное предметное стекло.
4. Предметные стекла высушивают на воздухе в течение ночи.
5. Выполняют стандартное окрашивание H&E 1 предметного стекла.
   ПРИМЕЧАНИЕ: предметное стекло, используемое для процедуры анализа, должно находиться в пределах 10 серийных секций h&E предметного стекла.

   ПРИМЕЧАНИЕ: Шаг 6 должен выполнять патолог.
6. Изучают и отмечают (обводят) максимально возможную область опухоли, исключая некротическую, воспалительную или нормальную слизистую.
7. С помощью резцы для стекла переносят метку с предметного стекла H & E на соответствующие участки неокрашенного предметного стекла, пометив стекло на стороне, противоположной срезу ткани.
8. Неокрашенные предметные стекла высушивают в течение 2 -24 часов при температуре 56 ± 2°C.
9. Неокрашенные предметные стекла обрабатывают, следуя приведенным ниже процедурам.

Подготовка предметных стекол

Ручная предварительная обработка

Депарафинирование предметных стекол
1. Предметные стекла погружают в осветляющий агент Hemo-De на 5 минут при комнатной температуре.
2. Повторяют шаг 1, используя свежий Hemo-De.
3. Повторяют шаг 1 еще раз, используя свежий Hemo-De.
4. Предметные стекла обезвоживают в 100% этаноле в течение 1 минуты при комнатной температуре.
5. Повторяют шаг 4. Немедленно приступают к предварительной обработке предметного стекла.

Предварительная обработка стекол
6. Предметные стекла помещают в раствор для предварительной обработки (1X SSC; pH 6,3) при 80 ± 1°C на 35 ± 5 минут. При необходимости, 2 предметных стекла можно поместить вплотную друг к другу в каждый слот в сосуде Коплина, по 1 предметному стеклу в каждый крайний слот. Для торцевых предметных стекол сторона предметного стекла с тканевым срезом должна быть обращена к центру сосуда.
7. Предметные стекла погружают в воду очищенную на 3 минуты при комнатной температуре. Предметные стекла удаляют из сосуда с водой очищенной. Лишнюю воду удаляют, промокнув края предметных стекол бумажным полотенцем. Не оставляют сохнуть.

Обработка протеазой
8. Предметные стекла погружают в раствор протеазы (протеаза IV, [номер по списку 06N46-001] 1,5 мг/мл в 0,1 н. растворе HCl) при температуре 37 ± 1°C на 20 ± 3 минут. При необходимости, 2 предметных стекла можно поместить вплотную друг к другу в каждый слот в сосуде Коплина, по 1 предметному стеклу в каждый крайний слот. Для торцевых предметных стекол сторона предметного стекла с тканевым срезом должна быть обращена к центру сосуда.
9. Предметные стекла погружают в воду очищенную на 3 минуты при комнатной температуре.
10. Предметные стекла погружают в 70% этанол на 1 минуту.
11. Предметные стекла погружают в 85% этанол на 1 минуту.
12. Предметные стекла погружают в 100% этанол на 1 минуту.
13. Предметные стекла высушивают на воздухе или на столике с подогревом.
    Приступают к процедуре совместной денатурации/гибридизации ДНК образца.

Автоматическая (VP 2000) предварительная обработка

Дополнительную информацию об использовании прибора см. в Руководстве по эксплуатации процессора Abbott VP 2000. Протокол предварительной обработки VP 2000 представлен в **таблице 21**.

ПРИМЕЧАНИЕ. Используют протеазу IV (номер по списку 06N46-002), 1,5 мг/мл в 0,1 н. раствор HCl.

Таблица 21. Протокол предварительной обработки VP 2000

Шаг	Решение	Температура	Время
1	Hemo-De	Комнатная	5 минут
2	Hemo-De	Комнатная	5 минут
3	Hemo-De	Комнатная	5 минут
4	100% этанол	Комнатная	1 минута
5	100% этанол	Комнатная	1 минута
6	Раствор для предварительной обработки 1X SSC	80°C	35 ± 5 мин
7	Вода очищенная, настройка непрерывного потока	Комнатная	3 минуты
8	Раствора протеазы	37°C	20 ± 3 мин
9	Вода очищенная, настройка непрерывного потока	Комнатная	3 минуты
10	70% этанол	Комнатная	1 минута
11	85% этанол	Комнатная	1 минута
12	100% этанол	Комнатная	1 минута
13	Сушка воздухом		

Приступают к процедуре совместной денатурации/гибридизации ДНК образца.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

МЕТОДИКА АНАЛИЗА
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ IN SITU
КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Подготовка зонда

1. Дают зонду нагреться до комнатной температуры, чтобы вязкость достаточно снизилась для обеспечения точного дозирования.
2. Перемешивают на вортексе. Каждую пробирку центрифугируют в течение 2-3 секунд в настольной микроцентрифуге, чтобы опустить содержимое на дно пробирки. Осторожно перемешивают на вортексе.

Совместная денатурация/гибридизация ДНК образцов

См. Руководство пользователя ThermoBrite для получения дополнительной информации о том, как использовать прибор.

1. Карту влажности смачивают водой и вставляют в слоты для карт ThermoBrite.
2. Устанавливают температуру плавления (Melt Temp) на 73°C и время плавления на 5 минут. Устанавливают температуру гибридизации (Hyb Temp) на 37°C, а время гибридизации (Hyb Time) на 12-24 часа.
3. Наносят 10 мкл смеси зондов на предметное стекло и сразу же накрывают покровным стеклом.
4. Запечатывают края покровного стекла резиновым клеем.
5. Запускают программу совместной денатурации/гибридизации.

По окончании периода гибридизации (от 12 часов до 24 часов) переходят к промывкам после гибридизации.

Промывки после гибридизации

1. В сосуд Коплина добавляют буфер для промывки после гибридизации (2X SSC/0,3% NP-40). Предварительно нагревают буфер для промывки после гибридизации, поместив сосуд Коплина в водяную баню при температуре 73 ± 1°C не менее чем на 30 минут или пока температура раствора не достигнет 73 ± 1°C.
   ПРИМЕЧАНИЕ: Температуру промывочного раствора измеряют, поместив датчик температуры в сосуд Коплина. Перед промывкой каждой партии температура промывочного раствора должна составлять 73 ± 1°C.
2. Буфер для промывки после гибридизации помещают во второй сосуд Коплина при комнатной температуре. Оба промывочных раствора выбрасывают через 1 день использования.
3. С предметных стекол удаляют уплотнитель из резинового клея, осторожно потянув герметик пинцетом.
4. Предметные стекла погружают в буфер для промывки после гибридизации при комнатной температуре и удаляют покровное стекло.
5. После того, как покровное стекло было удалено, удаляют излишки жидкости и погружают предметное стекло в промывочный буфер после гибридизации при температуре 73 ± 1°C на 2 минуты (4 предметных стекла на сосуд).
   ПРИМЕЧАНИЕ: Рекомендуется обрабатывать 4 предметных стекла на один сосуд Коплина для поддержания соответствующей температуры растворов. если у вас меньше 4 предметных стекол, добавляют пустые предметные стекла комнатной температуры, чтобы общее количество слайдов достигло 4.
6. Каждое предметное стекло вынимают из промывочной ванны и высушивают на воздухе в темноте в вертикальном положении. Достаточно закрытого ящика или полки внутри закрытого шкафа.
7. 10 мкл контрастного красителя DAPI наносят на целевую область предметного стекла и накрывают покровным стеклом. Перед подсчетом сигналов предметные стекла хранят в темноте.

Хранение предметных стекол

Гибридизированные предметные стекла (с покровными стеклами) хранят при температуре -20°C в темноте. После снятия с хранения при -20°C предметному стеклу дают нагреться до комнатной температуры перед подсчетом сигналов.

Подсчет сигналов

Оценка пригодности предметных стекол

Оценку пригодности предметных стекол проводят с использованием следующих критериев.

- Морфология ядра: выбранные области изучают с помощью объектива с 40-кратным или 63-кратным увеличением, наблюдая морфологию ядра в размеченной целевой области. Для оценки выбирают хорошо расщепленные участки ткани. Ядра, наблюдаемые по красителю DAPI, должны быть различимы и иметь четко определенные границы.
- Интенсивность сигнала зонда: сигналы должны быть яркими, четкими и легко поддающимися оценке. Сигналы должны быть компактными, овальными или волокнистыми (рассеянными) овальными.
- Фон: Фон должен быть темным (черным) и относительно свободным от флуоресцентных частиц.

Если размеченная целевая область на предметном стекле не соответствует этим критериям, анализ повторяют с новым предметным стеклом. Условия анализа могут быть изменены в пределах диапазонов, указанных в разделах **«Отбор и обработка образцов», «Предварительная обработка предметных стекол»**, «Совместная денатурация/гибридизация ДНК образца» и «Промывки после гибридизации».

Выбор оптимальной области обзора и оцениваемых ядер

- Используют объектив с 10- или 25-кратным увеличением и и однополосный фильтр DAPI, чтобы просмотреть гибридизированную область и найти интересующую целевую область (опухолевые клетки, идентифицированные окрашиванием H&E).
- Предметное стекло H&E, используемое в качестве ориентира для разметки, можно использовать для справки при выборе оптимальной области просмотра.
- Избегают участков некроза и нечетких границ ядер.

Распознавание целевых сигналов

Определение паттерна амплификации HER-2/*neu*: паттерны амплификации HER-2/*neu*, как правило, состоят из кластеров сигналов (см. **рисунок 4**, строка 8), но могут также состоять из отдельных сигналов HER-2/*neu* с большим количеством копий по сравнению с количеством копий CEP 17 (см. **рисунок 4**, строка 9).

- Размеченную целевую область сканируют, используя рекомендованные фильтры и объектив с 40-кратным или 63-кратным увеличением. Предметное стекло H&E, используемое в качестве ориентира для разметки, можно использовать для справки при оценке распределения сигнала.
- Регулируют глубину фокуса и изучают размер и форму целевых сигналов и шума (мусора).
- Избегают ядер, которые не соответствуют критериям пригодности, описанным в разделе «Оценка пригодности предметных стекол».
- Оценивают распределение сигнала только в опухолевых клетках, используя оранжевые и зеленые однополосные фильтры. Опухолевые клетки в целом больше нормальных клеток, лимфоцитов и эпителиальных клеток.
- Наблюдайте за общим распределением сигнала, которое может быть однородным или неоднородным. В случае неоднородного распределения для подсчета выбирают области, содержащие паттерны амплификации.

Подсчет сигналов

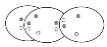
- Для подсчета выбирают примерно 4 неперекрывающихся поля обзора.
  - Однородное распределение сигнала:
    Для подсчета выбирают приблизительно 4 поля обзора, содержащие опухолевые клетки в пределах отмеченной целевой области.
  - Неоднородное распределение сигнала:
    Если существуют паттерны фокальной амплификации, для подсчета выбирают примерно 4 поля обзора, содержащие амплифицированные клетки. Если амплифицированные клетки перемешаны с полисомальными или дисомальными клетками, для подсчета выбирают приблизительно 4 поля обзора, содержащие паттерны амплификации, но включающие как амплифицированные клетки, так и последовательные неамплифицированные клетки при подсчете 20 клеток.
- Используя объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением и однополосный фильтр DAPI, начинают анализ в верхнем левом квадранте выбранной области. В каждом поле обзора для подсчета выбирают приблизительно 5 последовательных ядер с неповрежденными, четко определенными ядрами и четкими границами ядер. Затем переходят к следующему репрезентативному полю микроскопа и повторяют, пока не будет подсчитано в общей сложности 20 ядер. Переключаются на оранжевый и зеленый однополосные фильтры, чтобы подсчитать количество сигналов в пределах границы каждого выбранного ядра в соответствии с инструкциями, приведенными ниже и на **рисунке 4**.
- Сфокусируйтесь вверху и внизу, чтобы найти все сигналы, присутствующие в ядре.
- Считают 2 сигнала одинакового размера, которые находятся друг от друга на расстоянии не более диаметра 1 сигнала, как один сигнал (См. **рисунок 4**, ряд 4).
- Кластеры сигналов - это локализованные совокупности сигналов, содержащие минимум 3 соседних сигнала, находящихся друг от друга на расстоянии, которое меньше одного диаметра сигнала.
- Подсчет отдельных сигналов может быть затруднен из-за их близости друг к другу. В этом случае выполняют оценку количества копий сигнала (см. **рисунок 4**, строка 8).
  - Оценивают размер одиночного сигнала, а затем экстраполируют его на область, содержащую кластер сигналов. Оценивают размер области с шагом от 5 до 10 согласно рекомендациям, представленным в **таблице 22**.
  - Если ядро содержит отдельные сигналы LSI HER-2/*neu* вне кластера сигнала, их включают в оценку сигнала.
- Ядра без сигналов или с сигналами только одного цвета не оценивают. Оценивают только ядра с одним или более FISH-сигналами каждого цвета.
- Для каждого ядра подсчитывают количество сигналов LSI HER-2/*neu* и количество сигналов CEP 17. Записывают количество для каждого ядра (см. **таблицу 23**).
- Когда отдельные сигналы легко различимы, записывают фактическое количество в соответствии с **таблицей 22**. При наличии кластеров сигналов, фиксируют оценку номера сигнала с шагом 5 и записывают значения средней точки (см. рекомендации в таблице 22). Эти средние значения следует использовать для расчета отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17 (как показано в **таблице 23**).

Таблица 22. Рекомендации по оценке количества сигналов для кластеров сигналов

Если оценка сигнала попадает в этот диапазон.	**... Затем фиксируют эти значения**
До 10	Записывают оценочное индивидуальное целочисленное значение
От 10 до 15	12,5
От 15 до 20	17,5
От 20 до 25	22,5
От 25 до 30	27,5
От 30 до 35	32,5
От 35 до 40	37,5
От 40 до 45	42,5
От 45 до 50	47,5
Более 50	50

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 4. Руководство по учету двухцветных сигналов

Условные обозначения:		= зеленый зонд, CEP 17 = оранжевый зонд, LSI HER-2/neu
1		Подсчитывают как 2 оранжевых и 2 зеленых сигнала в каждом ядре. Ядра перекрываются, все области обоих ядер не видны, а сигналы не находятся в области перекрытия.
2		Не считают. Ядра перекрываются, все области ядер не видны, а некоторые сигналы находятся в области перекрытия.
3		Подсчитывают как 2 оранжевых сигнала и 2 зеленых сигнала. Один зеленый сигнал рассеян.
4		Подсчитывают как 2 оранжевых сигнала и 2 зеленых сигнала. Один зеленый сигнал разделяется, и 1 оранжевый сигнал разделяется.
5		Подсчитывают как 1 оранжевый сигнал и 2 зеленых сигнала.
6		Подсчитывают как 2 оранжевых сигнала и 2 зеленых сигнала.
7		Подсчитывают как 4 оранжевых сигнала и 4 зеленых сигнала.
8	 	Сигналы в этих ядрах характерны для паттерна амплификации гена HER-2/*neu*. Оценивают количество оранжевых сигналов (LSI HER-2/*neu*) в кластере и добавляют к отдельным оранжевым сигналам, чтобы получить общее количество оранжевых сигналов. Оценка количества сигналов LSI HER-2/*neu* в этих примерах составляет от 25 до 30, а количество сигналов CEP 17 - 4. Более подробное объяснение представлено в **таблице 22**.
9		Сигналы в этом ядре характерны для паттерна амплификации гена HER-2/*neu*. Подсчитывают как 5 оранжевых (LSI HER-2/*neu*) сигналов и 2 зеленых (CEP 17) сигнала.

Рекомендуемый метод определения отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17

Рекомендуемый метод определения отношения LSI HER-2/*neu* к CEP 17 состоит в том, чтобы разделить общее количество сигналов LSI HER‑2/*neu* на общее количество сигналов CEP 17 при подсчете 20 ядер.

1. Количества сигналов LSI HER-2/*neu* и CEP 17 на ядро записано в столбцах (см. **таблицу 23** для примера).

Таблица 23. Примерный лист данных по раку желудка

Номер клетки	**LSI HER-2/*neu***	**CEP 17**
1	5	1
2	6	1
3	10	1
4	12,5	1
5	12,5	1
6	17,5	1
7	6	2
8	12,5	2
9	12,5	2
10	12,5	2
11	17,5	2
12	17,5	2
13	8	3
14	10	3
15	12,5	3
16	12,5	3
17	17,5	3
18	17,5	3
19	12,5	4
20	17,5	4
Всего	**250**	**44**

2. Добавляют все сигналы LSI HER-2/*neu* (20 клеток). Эта сумма представляет собой общее количество сигналов LSI HER-2/*neu* (например, 250 в таблице 23).
3. Добавляют все сигналы CEP 17 (20 клеток). Эта сумма представляет собой общее количество сигналов CEP 17 (например, 44 в таблице 23).
4. Отношение LSI HER-2/*neu* к CEP 17 рассчитывают путем деления суммы сигналов LSI HER-2/*neu* на сумму сигналов CEP 17 (например, 250/44 равняется соотношению 5,68, что говорит о присутствии амплификации HER-2/*neu*).
5. Если соотношение >2,2 или <1,8, то дальнейший подсчет НЕ требуется. Окончательный статус амплификации HER-2/*neu* будет основан на этом результате. Для получения окончательного результата переходят к шагу 7.
6. Если соотношение находится в пороговой точке или около нее (от 1,8 до 2,2), подсчитывают еще 20 ядер и пересчитывают отношение на основе комбинированных сумм сигналов LSI HER-2/*neu* и CEP 17 (40 клеток).
7. Когда будет получен окончательный результат:
   Если отношение <2,0, амплификации гена HER-2/*neu* не наблюдалось.
   Если отношение >2,0, амплификация гена HER-2/*neu* наблюдалась.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Оценивают пригодность предметного стекла в соответствии с инструкциями в разделе «Подсчет сигналов». Критерии пригодности предметных стекол должны быть удовлетворены. При оценке результатов следует учитывать качество и эффективность гибридизации.

Нормальные клетки обеспечивают внутренний контроль качества набора.

- Нормальные клетки содержат от 1 до 2 оранжевых (LSI HER-2/*neu*) и от 1 до 2 зеленых (CEP 17) сигналов.
- Обратите внимание, что некоторые нормальные клетки имеют менее 2 сигналов каждого цвета на клетку из-за усечения во время процедуры изготовления срезов.
- Нормальные области предметного стекла должны соответствовать критериям пригодности предметных стекол.

Тест считается неинформативным, если интерпретация сигнала гибридизации затруднена или если клеток для анализа недостаточно. В случае неудачной гибридизации смотрите Руководству по поиску и устранению неисправностей (рак желудка) в **таблице 24**.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 24. Руководство по поиску и устранению неисправностей (рак желудка)

Проблема	Вероятная причина	Решение
• Сигнал отсутствует или слабый сигнал	• Неправильный набор фильтров для просмотра предметного стекла	• Используйте рекомендуемые фильтры.
	• Микроскоп не работает должным образом	• Обратитесь к техническому представителю производителя микроскопа.
	• Неправильные лампы (например, ксеноновые или вольфрамовые)	• Используйте ртутную лампу (рекомендуется 100 Вт) или другую лампу с аналогичной интенсивностью и спектральной мощностью.
	• Слишком старая ртутная лампа	• Замените на новую лампу.
	• Ртутная лампа сместилась	• Выровняйте лампу.
	• Грязные или потрескавшиеся линзы коллектора	• Очистите или замените линзу.
	• Грязное или разбитое зеркало в светильнике	• Очистите и замените зеркало.
	• Несоответствующие условия гибридизации.	• Увеличьте время гибридизации в допустимом диапазоне.
	• Несоответствующая температура промывки после гибридизации	• Проверьте температуру буфера для промывки после гибридизации.
		• Уменьшите температуру буфера для промывки после гибридизации до нижнего предела допустимого диапазона температур.
	• Пузырьки воздуха задерживаются под покровным стеклом и препятствуют доступу зонда	• Нанесите покровное стекло, сначала прикоснувшись к поверхности смеси для гибридизации.
	• Недостаточное количество раствора для гибридизации среза	• Увеличьте количество раствора для гибридизации до 20 мкл на срез.
	• Недостаточное расщепление протеазой	• Проверьте температуру раствора протеазы.
		• Убедитесь в том, что используемая протеаза - это протеаза IV (номер по списку 06N46-001 или 06N46-002).
		• Убедитесь в том, что концентрация HCl составляет 0,1 н. HCl.
		• Убедитесь в том, что концентрация протеазы составляет 1,5 мг/мл в 0,1 н. раствор HCl.
		• Увеличьте время расщепления протеазы в допустимом диапазоне.
• Сигнал отсутствует или слабый сигнал (продолжение)	• Неадекватная предварительная обработка	• Проверьте температуру раствора для предварительной обработки. Проверяют, чтобы раствором для предварительной обработки был 1X SSC, pH 6,3 ± 0,2.
		• Увеличьте время инкубации раствора для предварительной обработки и/или температуру в пределах допустимого диапазона.
	• Срез слишком сильно зафиксирован (границы клеток будут четкими)	• Длительное время фиксации ткани перед замачиванием в парафин может привести к прогрессирующему снижению интенсивности сигнала и может потребовать увеличения времени расщепления протеазой или времени/температуры инкубации перед обработкой. Увеличьте время расщепления протеазой или время инкубации раствора для предварительной обработки и/или температуру в пределах допустимого диапазона.
• Изменение интенсивности сигнала на срезе ткани	• Присуща многим срезам тканей	• Проверьте окрашивание DAPI и интенсивность сигнала в целевой области. Если большая часть целевой области имеет неповрежденные ядра и яркие сигналы, тогда оцените предметное стекло.
	• Зонд неравномерно распределен на предметном стекле из-за пузырьков воздуха под покровным стеклом	• Повторите гибридизацию на следующем смежном срезе того же тканевого блока и убедитесь в том, что под покровным стеклом нет пузырьков воздуха.
		• Нанесите покровное стекло, сначала прикоснувшись к поверхности смеси для гибридизации.
	• Слишком крупный срез	• Увеличьте объем смеси зондов для гибридизации до 20 мкл на больших срезах ткани.
• Шумный фон	• Неадекватная строгость промывки	• Убедитесь в том, что pH раствора для промывки после гибридизации составляет от 7,0 до 7,5.
		• Проверьте температуру буфера для промывки после гибридизации.
		• Увеличьте температуру буфера для промывки после гибридизации до верхнего предела допустимого диапазона температур.
• Некроз ткани или ухудшение морфологии ткани	• Использовались неподходящие предметные стекла	• Используйте положительно заряженные предметные стекла.
•	• Неправильный обжиг предметных стекол	• Проверьте температуру и время термической обработки.
		• Если парафин на предметных стеклах не плавится, увеличьте температуру и/или время в допустимом диапазоне.
	• Чрезмерная предварительная обработка	• Проверьте температуру раствора для предварительной обработки.
		• Уменьшите время и/или температуру в допустимом диапазоне.
	• Чрезмерное расщепление	• Уменьшите время расщепления протеазы в допустимом диапазоне.
	• Чрезмерная денатурация	• Проверьте время и температуру денатурации ThermoBrite.
	• Срез ткани был разорван при удалении покровного стекла после гибридизации.	• Дайте покровному стеклу отмокнуть в буфере для промывки после гибридизации.
	• Фиксированный срез ткани (плохое окрашивание DAPI)	• Сокращенное время фиксации ткани перед заливкой парафином может привести к чрезмерному расщеплению и/или предварительной обработке образца. Уменьшите время расщепления протеазой или время инкубации раствора для предварительной обработки и/или температуру в пределах допустимого диапазона.

Обратитесь в службу технической поддержки Abbott Molecular для получения дополнительной помощи.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Количество сигналов LSI HER-2/*neu* и CEP 17 на ядро записывают в столбцах. Результаты подсчета 20 интерфазных ядер опухолевых клеток на мишень представлены в виде отношения общих сигналов HER-2/*neu* к сигналам CEP 17. Амплификация определяется как отношение сигналов LSI HER- 2/*neu* к CEP 17 ≥ 2,0; без амплификации определяется как коэффициент < 2,0.

Результаты, близкие к пороговой точке (1,8-2,2), следует интерпретировать с осторожностью. В случае пограничного результата (от 1,8 до 2,2), особенно если также наблюдается вариабельность подсчетов от ядра к ядру, следует провести подсчет еще 20 ядер. Другой специалист должен повторно подсчитать предметное стекло для проверки результатов. Если все еще есть сомнения, анализ следует повторить со свежим предметным стеклом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Причины повторения анализа

Ниже приведены ситуации, требующие повторных анализов с использованием свежих предметных стекол. Смотрите Руководство по поиску и устранению неисправностей (рак желудка) в **таблице 24**, чтобы узнать о возможных причинах и действиях, необходимых для устранения конкретных проблем.

1. Если имеется менее 20 поддающихся оценке ядер, тест считается неинформативным, и анализ следует повторить.
2. Если какой-либо из критериев качества предметных стекол (морфология ядра, интенсивность сигнала и фон) не соответствуют требованиям, как описано в разделе «Подсчет сигналов», анализ необходимо повторить.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Набор для анализа на рак желудка PathVysion Kit II был оптимизирован только для идентификации и количественного определения хромосомы 17 и гена HER-2/*neu* в интерфазных ядрах из зафиксированных формалином и залитых парафином образцов ткани желудка человека. Другие типы образцов или фиксаторов использовать не следует.
2. Эффективность набора PathVysion Kit II была подтверждена с использованием процедур, представленных только в этом листке-вкладыше. Модификации этих процедур могут повлиять на эффективность анализа.
3. Результаты анализа методом FISH могут быть неинформативными, если качество образца и/или подготовка предметных стекол не соответствуют требованиям.
4. Технологи, выполняющие подсчет сигналов FISH, должны уметь визуально различать оранжевый и зеленый сигналы.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Показатель эффективности

Показатель эффективности набора PathVysion Kit II определяли как для ручных процедур, так и для процедур предварительной обработки VP 2000. Показатель эффективности определяется как процент информативных образцов от общего числа испытанных образцов. При использовании ручной предварительной обработки 19 зафиксированных формалином и залитых парафином образцов рака желудка (4 HER-2/*neu*-положительных и 15 HER-2/*neu*-отрицательных, как было определено в иммуногистохимическом анализе [IHC]) были протестированы в 4 повторностях, всего 76 предметных стекол. При использовании предварительной обработки VP 2000, 19 образцов были протестированы в двух повторностях, всего 38 предметных стекол. Каждое предметное стекло оценивали на интенсивность сигнала, специфичность сигнала, фон предметного стекла и общее качество, чтобы определить производительность набора PathVysion Kit II.

В случае процедуры ручной предварительной обработки показатель эффективности набора составил 100% (96,1%, нижняя граница 95% ДИ). В случае процедуры предварительной обработки VP 2000 показатель эффективности набора составил 100% (92,4%, нижняя граница 95% ДИ). Результаты представлены в **таблице 25**.

Таблица 25. Показатель эффективности

Процедура	Кол-во испытанных предметных стекол	Кол-во прошедших испытание предметных стекол	Показатель эффективности набора (%)	Нижняя граница 95% ДИ
Ручная обработка	76	76	100%	96,1%
VP 2000	38	38	100%	92,4%

Аналитическая специфичность

Для получения результатов по аналитической специфичности см. раздел **ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ** при раке молочной железы данного листка-вкладыша.

Воспроизводимость

Воспроизводимость набора PathVysion Kit II оценивали с использованием зафиксированных формалином и залитых парафином образцов рака желудка. Четыре образца рака желудка (2 HER-2/*neu*-положительных и 2 HER-2/*neu*-отрицательных, как было определено в иммуногистохимическом анализе [IHC] анализа) были протестированы в 4 повторностях в течение 5 дней подряд (1 анализ в день). Каждое предметное стекло оценивали на качество и считывали 3 ридерами для определения статуса амплификации HER-2/*neu*. Результаты тестирования на статус амплификации HER-2/*neu* сравнивали с результатами анализа IHC для оценки воспроизводимости набора PathVysion Kit II. Набор PathVysion Kit II продемонстрировал воспроизводимость со 100% общей согласованностью как в случае анализа на воспроизводимость от ридера к ридеру, так и в случае анализа на ежедневную (воспроизводимость (от анализа к анализу). Результаты представлены в **таблице 26** и **таблице 27**.

Таблица 26. Воспроизводимость: от ридера к ридеру

Ридер	Кол-во, соответствующее IHC	Кол-во, не соответствующее IHC
1	80	0
2	80	0
3	80	0

Согласованность в процентах: (240/240) = 100%

Таблица 27. Воспроизводимость: ежедневная (от анализа к анализу)

День/Этап	Кол-во, соответствующее IHC	Кол-во, не соответствующее IHC
1	48	0
2	48	0
3	48	0
4	48	0
5	48	0

Согласованность в процентах: (240/240) = 100%

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Resarch on Cancer; 2010. http://globocan.iarc.fr. По состоянию на 9 января 2011 г.
2. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer: an NSABP update. *Cancer*. 1983;52(9):1551-1557.
3. Fisher ER, Redmond C, Fisher B, Bass G. Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast and bowel projects (NSABP): Prognostic discriminants for 8-year survival for node-negative invasive breast cancer patients. *Cancer*. 1990;65(9)(Suppl):2121-2128.
4. Mansour EG, Gray R, Shatila AH, et al. Efficacy of adjuvant chemotherapy in high-risk node-negative breast cancer: an intergroup study. *N Engl J Med*. 1989;320(8):485-490.
5. Bonadonna G, Valagussa T, Zambetti M. Milan adjuvant trials for stage I-II breast cancer. In: Slamon SW, ed. *Adjuvant Chemotherapy of Cancer* V. Orlando, FL: Grune & Stratton. 1987:211-21.
6. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-182.
7. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer: International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncology*. 1992;10(7):1049-1056.
8. Gullick WJ, Love SB, Wright C, et al. c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br J Cancer*. 1991;63(3):434-438.
9. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res.* 1990;50(14):4332-4337.
10. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1989;7(8):1120-1128.
11. Szollosi J, Balazs M, Feuerstein BG, Benz CC, Waldman FM. ERBB-2 (HER2/*neu*) gene copy number, $p185^{HER-2}$ overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer. *Cancer Res.* 1995;55(22):5400-5407.
12. Pauletti G, Singh R, Press MF, et al. HER-2/neu Gene Amplification Detected by Fluorescence in Situ Hybridization: A comparative study with other techniques. Abstract 3247, Proceedings of the American Association for Cancer Research. 1994;35:545.
13. Szollosi J, Balazs M, Feuerstein BG, Benz C, Waldman F. Phenotype genotype relationship in ERBB-2 amplification. Abstract 536D, International Society for Analytical Cytology. 1994:92.
14. Kallioniemi O, Kallioniemi A, Kurisu W, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(12):5321-5325.
15. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/ neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res.* 1994;54(10):2771-2777.
16. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet.* 2010;376(9742):687-697.
17. Yano T, Doi T, Ohtsu A, et al. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncol Rep.* 2006;15(1):65-71.
18. Hofmann M, Stoss O, Shi D, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*. 2008;52(7):797-805.
19. Bozzetti C, Negri FV, Lagrasta CA, et al. Comparison of HER2 status in primary and paired metastatic sites of gastric carcinoma. *Brit J Cancer*. 2011;104(9):1372-1376.
20. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]
21. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline—Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
23. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
24. Persons DL, Bui MM, Lowery MC, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of HER-2/neu amplification in breast cancer: a multicenter portability study. *Ann Clin Lab Sci.* 2000;30(1):41-48.
25. Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*. 1996;13(1):63-72.
26. Mass R, Sanders C, Kasian C, Johnson L, Everett T, Anderson S. The Concordance Between the Clinical Trials Assay (CTA) and Fluorescence in situ Hybridization (FISH) in the Herceptin Pivotal Trials [abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol* 19. 2000(291).
27. Dybdal N, Leiberman G, Anderson S, et al. Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;93(1):3-11.
28. Mass RD, Press MF, Anderson S, et al. Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab [abstract]. *Clin Breast Cancer*. 2005;6(3):240-246.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОМОЩЬ

Для получения технической помощи позвоните в техническую службу компании Abbott Molecular по телефону + 49-6122-580, напишите по электронной почте на адрес molicalsupport@abbott.com или посетите веб-сайт компании Abbott Molecular по адресу http://www.abbottmolecular.com.

PathVysion, CEP, LSI, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, ProbeChek, AutoVysion и VP 2000 являются товарными знаками группы компаний Abbott в различных юрисдикциях.

HERCEPTIN® является зарегистрированным товарным знаком компании Genentech, Inc.

ThermoBrite является товарным знаком компании Iris Sample Processing, Inc.

Все другие товарные знаки являются собственностью соответствующих владельцев.

Набор ДНК-зондов PathVysion HER-2 II и другие различные продукты ДНК-зондами для FISH с прямой меткой защищены патентами США 5,663,319 и 5,491,224. Флуоресцентные зонды Vysis LSI, CEP и WCP с прямой меткой подпадают под действие патентов США RE40,494, 6,596,479, 7,115,709, 5,756,696, 6,475,720, и 6,607,877 лицензирующих исключительно компанию Abbott Molecular Inc. попечительским советом Калифорнийского университета. Комплект PathVysion II защищен патентом США 5,985,553, выданным компании Vysis на неисключительных основаниях Соединенными Штатами Америки в лице Министерства здравоохранения.

Адрес производителя

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines. Иллинойс 60018,
США

CE

Адрес уполномоченного представителя (УП)

EC REP
ABBOTL QMBH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Висбаден
Германия

© 2006, 2016 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

Май 2016 г.
30-608493/R6

/Логотип: Abbott/

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

НАБОР ЗОНДОВ (ПРОБ) VYSIS ESOPHAGEAL ДЛЯ ГИБРИДИЗАЦИИ FISH

en

REF 04N19-020
30-608437/R3

Vysis Esophageal
FISH Probe Kit
REF 04N19-020
30-608437/R3

Обозначения

	Производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурный режим
	Опасность
	Биологический риск
	Внимание! См. сопроводительную документацию
	Годен до
	См. инструкцию по применению
	Уполномоченный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор зондов (проб) Vysis Esophageal для FISH предназначен для подсчета количества копий локусов ERBB2 (17q12), p16 (9p21), MYC (8q24) и ZNF217 (20q13.2) с помощью флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) в образцах клеток (браш-биопсия пищевода) и ткани пищевода, фиксированных в формалине и залитых парафином.

ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ И ПОЯСНЕНИЯ

Набор зондов (проб) Vysis Esophageal для FISH состоит из четырех идентифицирующих LSI проб и предназначен для подсчета копий локусов ERBB2 (17q12), p16 (9p21), MYC (8q24) и ZNF217 (20q13.2) с помощью многоцветной FISH. Известно, что изменения этих четырех локусов наблюдаются при дисплазии и аденокарциноме пищевода у пациентов с пищеводом Барретта[1,2]. Считается, что пищевод Барретта увеличивает риск развития аденокарциномы пищевода[3,4]. Увеличение частоты встречаемости этого предракового заболевания привело к резкому увеличению количества новых случаев аденокарциномы пищевода в странах Западной Европы, в Канаде и США[5,6,7]. По сравнению с другими раковыми заболеваниями скорость роста заболеваемости аденокарциномой пищевода является максимальной (4 – 10 % в течение последних двадцати лет); при этом 5-летняя выживаемость составляет менее 10 %[8,9].

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

FISH позволяет визуализировать специфические последовательности нуклеиновых кислот в клеточном препарате. Точнее, FISH заключается в точной гибридизации однонитевого ДНК-зонда, меченного флуорофором, на комплементарные последовательности. Визуализация гибридизация зонда на ДНК клетки осуществляется с помощью флуоресцентного микроскопа[10,11]. Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов[12], а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Набор зондов Vysis Esophageal для FISH состоит из зондов нуклеиновых кислот, меченных флуорофорами, и предназначен для проведения гибридизации *in situ* на образцах клеток пищевода человека, полученных с помощью браш-биопсии и фиксированных на предметных стеклах, и образцах ткани пищевода человека, фиксированных в формалине и залитых парафином. Набор зондов Vysis Esophageal для FISH состоит из четырех последовательностей ДНК-проб, меченных разными флуорофорами.

Для простоты использования зонды находятся в гибридизационном буфере. Смесь также содержит немеченую блокирующую ДНК; ее задачей является подавление последовательностей исследуемых локусов, которые часто встречаются и в других хромосомах. При гибридизации и визуализации эти зонды дают информацию о количестве копий хромосом.

Зонд ERBB2 мечен в SpectrumGreen; он предназначен для участка длиной около 226 килобаз, содержащего весь ген ERBB2 17-ой хромосомы. Зонд p16 мечен в SpectrumRed; он предназначен для участка длиной около 190 килобаз, содержащего весь ген p16 9-ой хромосомы и смежные участки. Зонд MYC мечен в SpectrumAqua; он предназначен для участка длиной около 821 килобазы, содержащего весь ген MYC 8-ой хромосомы и смежные участки. Зонд ZNF217 мечен в SpectrumGold; он предназначен для участка длиной около 433 килобаз, содержащего весь ген ZNF217 20-ой хромосомы и смежные участки.

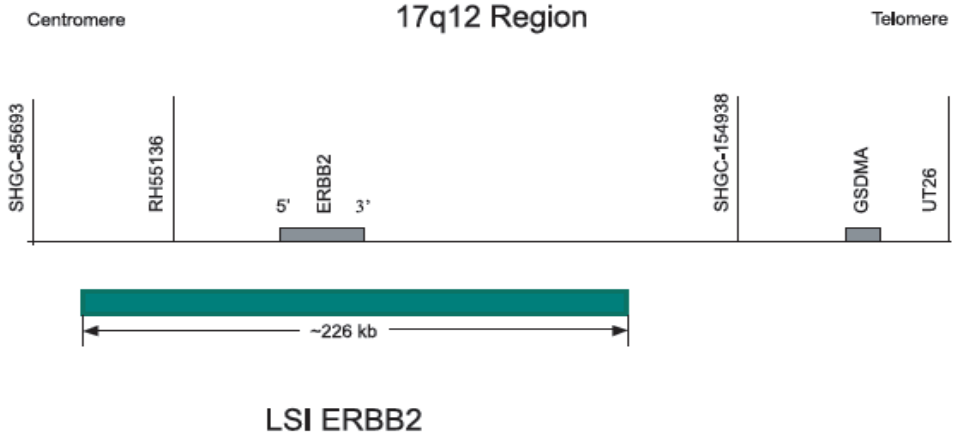


Рисунок: сверху: центромера, участок 17q12, теломера; в середине: SHGC-85693, RH55136, ERBB2, SHGC-154938, GSDMA, UT26; под зеленой чертой: ~ 226 килобаз. Подпись: LSI ERBB2

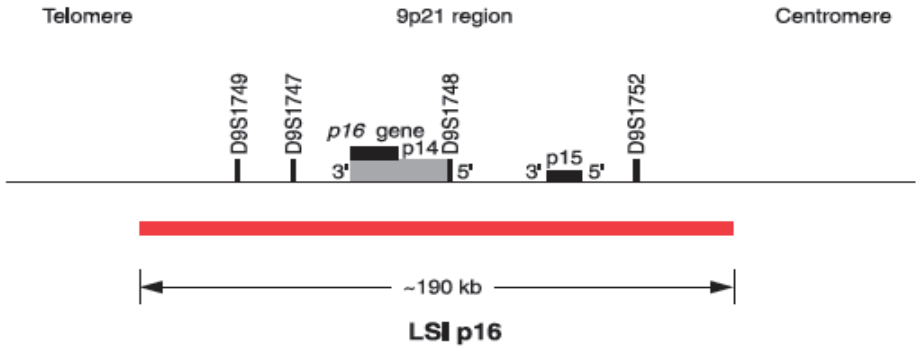


Рисунок: сверху: теломера, участок 9p21, центромера; в середине: D9S1749, D9S1747, ген p16, p14, D9S1748, p15, D9S1752; под красной чертой: ~ 190 килобаз. Подпись: LSI p16

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

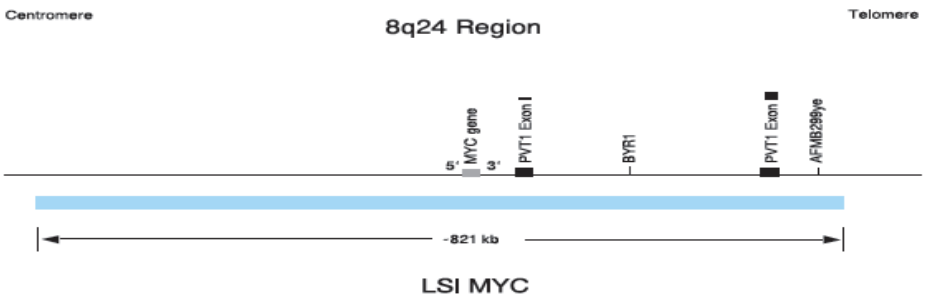


Рисунок: сверху: центромера, участок 8q24, теломера; в середине: ген MYC, PVT1 экзон I, BYR1, PVT1 экзон, AFMB299ye; под голубой чертой: ~ 821 килобаза. Подпись: LSI MYC

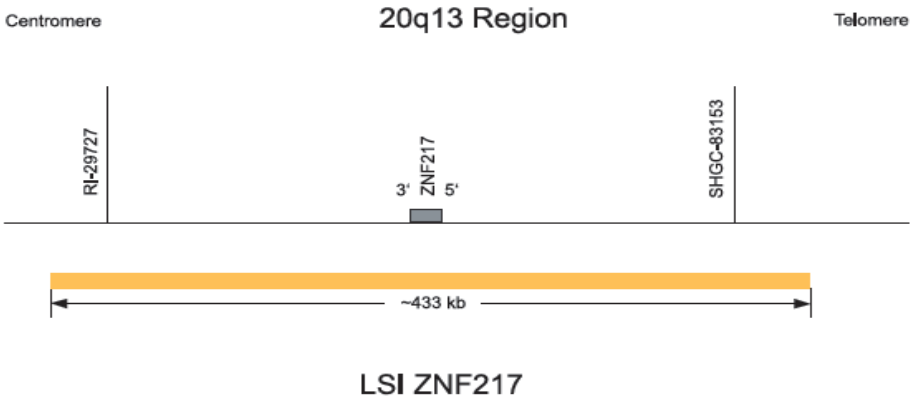
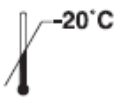


Рисунок: сверху: центромера, участок 20q13, теломера; в середине: RI-29727, ZNF217, SHGC-83153; под оранжевой чертой: ~ 433 килобазы. Подпись: LSI ZNF217

Реагенты

1. Зонды Vysis LSI ERBB2 (17q12) SGn / p16 (9p21) SR / MYC (8q24) SA / ZNF217 (20q13.2) SGd (Part №. 30-231030) (200 мкл во флаконе)
В каждом флаконе ДНК-зонд (ДНК-проба), меченный флуорофором, и блокирующая ДНК находятся в сульфате декстрана, формамиде и SSC (pH 7.0). Зонды находятся в гибридизационном буфере. Сертификаты безопасности находятся в Технической Службе компании Abbott Molecular Inc.

Условия хранения



Набор зондов Vysis Esophageal для FISH следует хранить при температуре не выше -20ºC (±5°C) или холоднее, и беречь от света.

Условия транспортировки

Во время транспортировки набор зондов Vysis Esophageal для FISH обкладывают сухим льдом.

Если Вы получили реагенты, которые хранятся в неподобающих условиях или имеют повреждения, обратитесь в Техническую Службу компании Abbott Molecular Inc.

Предупреждения и меры предосторожности

IVD **Предназначен только для диагностики *in vitro*.**

Только для диагностики in vitro
Vysis LSI ERBB2 (17q12) SGn/p16 (9p21) SR/MYC (8q24) SA/ZNF217 (20q13.2) SGd Probe
Для получения информации о мерах предосторожности при использовании ThermoBrite™ обратитесь к руководству по эксплуатации (раздел, посвященный безопасности).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для получения информации о мерах предосторожности при использовании процессора VP2000™ производства компании Эбботт (Abbott) обратитесь к руководству по эксплуатации (раздел, посвященный безопасности),



Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Эти реагенты или образцы от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.
Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, не надевайте контактные линзы там, где работаете с этими материалами.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорит натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.
• Обеззараживать и утилизировать все потенциально инфекционные материалы в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP, согласно директивам ЕС, является: токсичным (T) и раздражающим (Xi) веществом. Ниже приведены характеристики риска (R) и безопасности (S):



ОПАСНОСТЬ

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид

H360 Может влиять на плод ребенка
P201 Получите специальные инструкции перед использованием
P202 Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281 Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313 В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405 Хранить в закрытом виде.

P501 Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом.

Паспорта безопасности: важная информация о безопасности, транспортировке и утилизации этих продуктов содержится в паспортах безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (MSDS) для всех предоставленных наборах реагентов доступны по запросу в отделе технического обслуживания Abbott Molecular.

Набор зондов Vysis Esophageal для FISH предназначен для изучения образцов клеток пищевода человека, полученных с помощью браш-биопсии, и образцов ткани пищевода человека, фиксированных в формалине и залитых парафином. Все биологические образцы необходимо обработать так, как если бы они содержали возбудителей инфекционных заболеваний. Невыполнение всех процедур по денатурации, гибридизации и визуализации может привести к получению неприемлемых или ошибочных результатов. Используйте только те реагенты, которые поставляет компания Эббот Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.). Соблюдайте условия хранения набора: при несоблюдении условий хранения результаты анализа будут недостоверными.
Набор зондов Vysis Esophageal для FISH содержит формамид, который обладает тератогенными свойствами. Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками. Для измерения температуры растворов, водяных бань и термостатов используйте калиброванные термометры. Перед каждым использованием измеряйте температуру раствора для предварительной обработки и промывочных буферных растворов в сосуде Коплина с помощью чистых калиброванных термометров. Все материалы, представляющие опасность для окружающих, необходимо утилизировать в соответствии со стандартами вашего учреждения.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Разрушение: под действием света флуорофоры быстро обесцвечиваются, поэтому все растворы и микропрепараты, содержащие флуорофоры, следует хранить в затемненном помещении. Все процедуры, для проведения которых свет не требуется, например, культивирование и промывание, следует выполнять в темноте.

Рекомендации по выполнению процедур: перед использованием разморозьте реагенты при температуре окружающей среды, а затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2–3 секунд в обычной микроцентрифуге.

Процедура

Необходимые материалы (в комплекте)

- Набор зондов Vysis Esophageal FISH, (List № 04N19-020)

Необходимые материалы (не в комплекте)

Оборудование

- Инструмент ThermoBrite
- Воздушный термостат/сушильный шкаф/горячая чашка Петри (54-68°C)
- Флуоресцентный микроскоп, оснащенный рекомендуемыми фильтрами (см. раздел Микроскоп и дополнительные устройства)
- Чистые стеклянные предметные стекла, имеющие положительный заряд
- Стеклянные покровные стекла 22x22 мм
- Пипеттор (1–10 мкл) и стерильные наконечники
- Полипропиленовые пробирки для микроцентрифуги (0,5–1,5 мкл)
- Таймер
- Микротом
- Микроцентрифуга
- Магнитная мешалка
- Градуированный цилиндр
- Водяные бани с циркуляцией (37°C, 74°C и 80°C). Примечание: водяные бани без циркуляции не обеспечивают поддержания высокой температуры.
- Водяная баня с дистиллированной водой (40°-45°C)
- Алмазный резец
- Пинцет
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Сосуды Коплина (12x50 мл) Рекомендуется: Wheaton Product № 900570 вертикальный сосуд для окрашивания микропрепаратов
- Калиброванный термометр
- Коробка для предметных стекол с крышкой и/или картонными обложками для стекол
- pH-метр и высокочувствительная индикаторная бумага

VP2000
Примечание: протокол VP2000 предусматривает то же оборудование, за исключением сосудов Коплина.

Реагенты

- Дистиллированная вода
- 100% этанол
- 20XSSC (список № 02J10-032 или равноценный)
- NP-40 (список № 07J05-001 или равноценный)
- 10% нейтральный буферный раствор формалина, pH 6.8-7.2, 25°C (назначение: для фиксации патологических образцов)
- HCl
- NaOH
- Резиновый клей
- Иммерсионное масло, подходящее для флюоресцентного микроскопа

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Образцы, фиксированные формалином и залитые в парафин

- HemoDe (или равноценный, например, д-лимонен или ксилол)
- DAPI I (список № 06J49-01)
- Протеаза (пепсин, USB, 3 000 – 4 000 Ед/мг)
- 0.1N HCl

Цитология

- DAPI II (список № 06J50-001)
- Набор реагентов для предварительной обработки перед FISH (список № 02J03-032 **или**
- Протеаза (пепсин, компания Амреско (Amresco)
- 0.01N HCl
- 1X фосфатный буферный раствор, pH 7.4
- $MgCl_2$ (2M)

Микроскоп и дополнительные устройства

Микроскоп: для визуализации результатов гибридизации требуется флуоресцентный микроскоп с освещением объекта сверху. *При наличии флуоресцентного микроскопа необходимо убедиться в том, что он сможет обеспечить оптимальную визуализацию микропрепаратов с флуоресцентной гибридизацией in situ.*

Обычные красители для ДНК, например, DAPI, пропидиум йодид и хинакрин могут не подойти для FISH. Рекомендуется периодически приглашать представителя технического отдела фирмы- производителя микроскопа для очистки и проверки его работы, особенно для регулировки ртутной лампы.

Примечание: возможная неэффективность реагентов может свидетельствовать о нарушении работы или неправильном выборе флуоресцентного микроскопа или использовании неподходящего набора фильтров, в то время как гибридизация прошла успешно.

Возбуждающий источник света: в качестве возбуждающего источника рекомендуется использовать ртутную лампу 100 Вт. Фиксируйте количество часов работы лампы и замените ее до окончания срока службы. Убедитесь в том, что лампа выровнена.

Объективы: для микроскопа с ртутной лампой 100 Вт или лампой с длительным сроком эксплуатации 100 Вт используйте масляно-иммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥ 0,75. Для сканирования подходит объектив с 40-кратным увеличение и окуляры с 10-кратным увеличением. Для получения удовлетворительных результатов для визуализации FISH используйте масляно-иммерсионный ахроматический объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: иммерсионное масло, используемое совместно с иммерсионными объективами, должно подходить для низкого уровня аутофлуоресценции и должны быть предназначено специально для флуоресцентного микроскопа.

Фильтры: гибридизация зондов LSI ERBB2 (17q12) SGn/p16 (9p21) SR / MYC (8q24) SA / ZNF217 (20q13.2) SGd на соответствующие участки сопровождается зеленым, красным, голубым и золотым свечением соответственно. Все остальные ДНК будут светиться голубым за счет красителя DAPI. Компания Эббот Молекуляр (Abbott Molecular) выпускает наборы фильтров с одной полосой пропускания, которые оптимизированы для использования совместно с наборами ДНК-зондов LSI и подходят для большинства моделей флуоресцентных микроскопов.

Для набора зондов Vysis Esophageal для FISH рекомендуется использовать наборы фильтров с одной полосой пропускания: DAPI, Green, Red, Aqua и Gold.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ, ФИКСИРОВАННЫХ В ФОРМАЛИНЕ И ЗАЛИТЫХ ПАРАФИНОМ

Подготовка исходных реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Раствор 20X SSC

Тщательно растворите 132 г 20X SSC в 400 мл дистиллированной воды. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Раствор 1X SSC для предварительной обработки

Тщательно растворите 50 мл 20X SSC в 900 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью NaOH или HCl доведите его до 6.3±0.2.Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Спиртовые растворы (70 %, 85 %, 100 %)

Из 100 % этанола и дистиллированной воды приготовьте 70 % и 85 % спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

2X SSC/0,3 % NP-40 промывочный раствор

Тщательно растворите 100 мл 20X SSC в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH или HCl доведите его до 7.0 – 7.5. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Приготовление рабочих реагентов

Примечание: объемы растворов приведены для сосудов Коплина объемом 50 мл (см. Оборудование). При использовании других сосудов Коплина могут потребоваться большие объемы растворов. Объема раствора должно хватить, чтобы полностью покрыть исследуемый участок, но метки должны остаться на поверхности.

Осветлитель Hemo-De

В три сосуда Коплина налейте по 50 мл осветлителя Hemo-De. Срок хранения – одна неделя.

Раствор для предварительной обработки

В сосуд Коплина налейте 50 мл 1XSSC, pH 6.3. Перед депарафинизацией микропрепаратов поместите сосуд на водяную баню с циркуляцией (80±1ºC). Перед использованием убедитесь в том, что температура раствора составляет 80±1ºC. Срок хранения – один день.

Протеазный раствор (1,5 мг/мл)

К 50 мл 0.1 N HCl добавьте 0,075 протеазы (пепсин USB, 3 000–4 000 Ед/мг) до получения окончательной концентрации 1,5 мг/мл. Тщательно перемешайте. Протеазный раствор поместите в сосуд Коплина, а сосуд Коплина поместите на водяную баню (37±1ºC). Держите сосуд Коплина на водяной бане не менее 30 минут, периодически помешивая. Перед использованием убедитесь, что температура буферного раствора составляет 37±1ºC и что протеаза полностью растворилась. Срок хранения – один день.

Дистиллированная вода

В сосуд Коплина налейте 50 мл дистиллированной воды. Использовать при температуре окружающей среды.

Спиртовые растворы

В один сосуд Коплина налейте 50 мл 100% этанола, в другой – 50 мл 85% раствора этанола, в третий – 50 мл 70% этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – семь дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Процедура предварительной обработки образцов (фиксированных в формалине и залитых парафином)

Примечание: процедура предварительной обработки специально оптимизирована для образцов, фиксированных в формалине и залитых парафином. При необходимости процедуру можно сделать менее или более агрессивной (уменьшить или увеличить время обработки протеазой на 3–5 минут соответственно). Обратитесь к разделу, посвященному устранению проблем.

Подготовка микропрепаратов

Примечание: образцы ткани пищевода следует фиксировать в формалине не более суток, после чего удается получить хорошие срезы. Во время приготовления микропрепаратов следите за тем, чтобы образцы, взятые у разных пациентов, не смешивались.
1. С помощью микротома подготовьте срезы шириной 4 – 5 мкм.
2. Подержите срезы над поверхностью водяной бани (42°C) с дистиллированной водой, например, прошедшей тройную очистку.
3. Поместите срез на предметное стекло, имеющее положительный заряд.
4. Высушите на воздухе в течение ночи.
5. Неокрашенные микропрепараты выдерживайте при 56±2°C в течение 2 - 24 ч.
6. Неокрашенные микропрепараты обработайте согласно приведенным ниже инструкциям.

Инструкции по предварительной обработке

Депарафинизация микропрепаратов

1. При комнатной температуре погрузите микропрепараты в Hemo-De на 5 минут.
2. Пункт 1 повторите дважды, каждый раз используя свежий Hemo-De.
3. Дважды обработайте микропрепараты 100 % этанолом в течение 1 минуты при комнатной температуре.
4. Немедленно приступайте к предварительной обработке.

Предварительная обработка микропрепаратов

1. Погрузите микропрепараты в 1XSSC, pH 6.3, 80±1ºC, на 35 минут. При необходимости в каждый слот сосуда Коплина можно класть по два предметных стекла нижними поверхностями друг к другу. В последнюю выемку следует положить только одно предметно стекло; при этом поверхность, на которую нанесен образец, **должна** быть обращена к центру сосуда.
2. Погрузите микропрепараты в дистиллированную воду на 3 минуты при комнатной температуре.

Предварительная обработка протеазой

1. Удалите микропрепараты из сосуда с дистиллированной водой.
2. С помощью бумажного полотенца удалите излишки воды с краев предметного стекла; не высушивайте.
3. Погрузите микропрепараты в протеазный раствор (37±1ºC) на 18 минут. При необходимости в каждую выемку сосуда можно класть по два предметных стекла нижними поверхностями друг к другу. В последнюю выемку следует положить только одно предметно стекло; при этом поверхность, на которую нанесен образец, **должна** быть обращена к центру сосуда.
4. Погрузите микропрепараты в дистиллированную воду на 3 минуты при комнатной температуре.
5. Погрузите микропрепараты в 70 % раствор этанола на 1 минуту.
6. Погрузите микропрепараты в 85 % раствор этанола на 1 минуту.
7. Погрузите микропрепараты в 100 % этанол на 1 минуту.
8. Высушите слайды на подогревательном столике или на воздухе.
9. Приступайте к гибридизации или храните высушенные микропрепараты при температуре -20°C в течение 1 недели.

Автоматическая предварительная обработка (VP2000)

Для получения информации об использовании процессора VP2000 производства компании Эбботт (Abbott) обратитесь к руководству по эксплуатации.
Протокол VP2000:

Раствор	**Температура**	**Время**
Hemo-De	Окружающей среды	5 мин.
Hemo-De	Окружающей среды	5 мин.
Hemo-De	Окружающей среды	5 мин.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

100 % этанол	Окружающей среды	1 мин.
100 % этанол	Окружающей среды	1 мин.
Раствор 1X SSC для предварительной обработки	80ºC	35 мин.
Дистиллированная вода	Окружающей среды	3 мин.
Протеазный раствор	37ºC	18 мин.
Дистиллированная вода	Окружающей среды	3 мин.
70 % раствор этанола	Окружающей среды	1 мин.
85 % раствор этанола	Окружающей среды	1 мин.
100 % этанол	Окружающей среды	1 мин.
Высушивание на воздухе		

Приступайте к гибридизации или храните высушенные микропрепараты при температуре -20°C (±5°C) в течение 1 недели.

Гибридизация (образцов, фиксированных в формалине и залитых парафином)

Для получения подробной информации об использовании ThermoBrite обратитесь к руководству по эксплуатации.

Если микропрепараты хранились при температуре -20°C, выполните с 5 по 8 пункт предварительной обработки протеазой (см. выше).

1. Намочите увлажняющую карту водой и поместите в специальные выемки ThermoBrite.
2. Установите **температуру размораживания** на 73°C и **время размораживания** на 5 минут; **температуру гибридизации** на 37°C и **время гибридизации** на 16 - 20 ч.
3. С помощью алмазного резца отметьте участки гибридизации на обратной стороне предметного стекла и поместите микропрепараты на ThermoBrite.
4. Доведите температуру смеси зондов до температуры окружающей среды.
5. Встряхните смесь зондов. Помешайте, чтобы поднять раствор со дна и удалить пузырьки воздуха.
6. Нанесите 10 мкл смеси зонда на микропрепарат и сразу же накройте его покровным стеклом.
7. Края обработайте резиновым клеем.
8. Запустите программу совместной гибридизации.

По окончании гибридизации (16 - 20 ч) приступите к **промыванию**, описанному ниже.

Промывание микропрепаратов (образцов, фиксированных в формалине и залитых парафином)

Примечание: для поддержания температуры промывочного буферного раствора I на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.

1. В сосуд Коплина налейте 50 мл раствора 2X SSC/0.3% NP-40. Не менее чем на 30 минут до использования поместите сосуд на водяную баню (73±1ºC).
2. Перед использованием убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC. Срок хранения – 1 день.
3. В другой сосуд Коплина также налейте 50 мл раствора 2XSSC/0.3% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды для отделения покровных стекол. Срок хранения – 1 день.
4. Удалите резиновый клей с одного микропрепарата, стараясь не изменять положение покровного стекла, и немедленно опустите его в раствор 2XSSC/0.3% NP-40, имеющий температуру окружающей среды. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов и оставьте их на 2–5 минут, чтобы покровные стекла отсоединились.
5. Опустите микропрепараты в подогретый раствор 2XSSC/0.3% NP-40. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов. Если количество микропрепаратов меньше четырех, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды. Отсчет времени начинается после погружения последнего микропрепарата. Примечание: для поддержания соответствующей температуры раствора 2X SSC/0.3% NP-40 промывайте одновременно по четыре микропрепарата.
6. Извлеките микропрепараты через 2 минуты. **Примечание:** прежде чем промывать вторую партию микропрепаратов, убедитесь в том, что промывочный раствор имеет температуру 73±1ºC.

Визуализация гибридизации

1. Сушите микропрепарат (-ы) на воздухе в темноте чуть меньше 2 ч. **Примечание:** во время высушивания предметные стекла должны стоять на одном из краев вертикально или горизонтально.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI I и накройте покровным стеклом. После нанесения красителя подождите 15 минут, после чего можете изучать микропрепарат под микроскопом.
3. Изучите образец с помощью флуоресцентного микроскопа в течение суток или храните при температуре -20° С в течение 1 недели.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
Green	флуорофоров SpectrumGreen
Red	флуорофоров SpectrumRed
Aqua	флуорофоров SpectrumAqua
Gold	Флуорофоров SpectrumGold
DAPI	DAPI

Изучение микропрепарата

Для визуализации гибридизированного участка используйте объективы с 10- или 25-кратным увеличением, а для определения местоположения исследуемых участков – фильтр DAPI. Просмотрите весь микропрепарат: начните с одного из углов и последовательно меняйте поля зрения. Выбранные участки исследуйте с помощью объектива с 40–63-кратным увеличением, обращая внимание на морфологию ядер. Выберите участки, на которых Вы будете производить подсчет сигналов (края ядер должны быть различимы, и ядра должны быть целыми).

Изучение сигнала FISH
Используя, объектив с 63-100-кратным увеличение, для подсчета сигналов выберите неперекрывающиеся ядра. Пропускайте ядра с нечеткими краями, что является следствием неправильной контрастирующей окраски. С помощью соответствующих фильтров Vysis подсчитайте количество сигналов для каждого из четырех зондов.

Условия хранения

Микропрепараты следует хранить при температуре -20°C (±5°C) и беречь от света.

Недостатки процедуры

Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Ожидаемые результаты

В нормальном диплоидном ядре или метафазных хромосомах должны появиться восемь флуоресцентных сигналов (два зеленых, два красных, два голубых и два золотых). Эти сигналы соответствуют исследуемым локусам гомологичных хромосом, к которым присоединяются зонды: зеленый, ERBB2 (17q12); красный, p16 (9p21); голубой, MYC (8q24); золотой, ZNF217 (20q13.2).

Наличие патологического количества копий...	характеризуется появлением большего или меньшего количества сигналов зонда:
Гена ERBB2 (17q12)	зеленого
Гена p16 (9p21)	красного
Гена MYC (8q24)	голубого
Гена ZNF217 (20q13.2)	золотого

Примечание: Обратите внимание на то, что во время приготовления срезов образцов, залитых парафином, происходит усечение ядер, что приводит к появлению в ядрах меньшего количества сигналов. Например, в некоторых нормальных ядрах сигналов ERBB2, p16, MYC и ZNF217 меньше, чем положено.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Инструкция по устранению проблем

Проблема	Возможная причина	Решение
• Отсутствие сигнала или слабый сигнал	• Неподходящий набор фильтров	• Используйте рекомендуемые фильтры.
	• Нарушение работы микроскопа	• Свяжитесь с техническим представителем компании-производителя микроскопа.
		• Используйте ртутную лампу (желательно, 100 Вт).
	• Неподходящие лампы (т.е. ксеноновые или вольфрамовые)	• Замените старую лампу на новую.
	• Просроченная ртутная лампа	• Выровняйте лампу.
	• Смещение ртутной лампы	• Протрите и замените линзы.
	• Грязные и/или потрескавшиеся собирательные линзы	
	• Грязное или разбитое зеркало	• Протрите или замените зеркало.
	• Неподходящая температура промывочных растворов после гибридизации	• Убедитесь в том, что температура промывочных растворов составляет 73±1ºC.
		• Уменьшите температуру промывочного раствора до 72ºC.
	• Под покровное стекло попали пузырьки воздуха, и зонд не достиг места назначения	• Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда.
	• Недостаточное количество гибридизационного раствора для среза	• Увеличьте количество гибридизационного раствора до 20 мкл на один срез.
	• Неправильная обработка протеазой	• Убедитесь в том, что температура раствора составляет 37±1ºC.
		• Убедитесь в том, что pH 0.1 N HCl составляет 1.0±0.2.
		• Увеличьте продолжительность обработки протеазой с прибавкой по 3 - 5 минут.
		• Если у Вас нет возможности приготовить новый микропрепарат выполните следующие действия со старым: o удалите покровное стекло с микропрепарата, окрашенного DAPI, с помощью раствора 2X SSC/0.3% NP-40 при комнатной температуре; o промойте микропрепарат в дистиллированной воде; o поместите микропрепарат в протеазный раствор (37±1ºC) на 3 – 5 минут; o промойте микропрепарат в дистиллированной воде; и o приступайте к гибридизации согласно разделу **Исследование образцов, фиксированных в формалине и залитых в парафин**.
		• Более длительная фиксация приводит к прогрессирующему уменьшению интенсивности сигнала и требует более длительной обработки протеазой.
	• Длительная фиксация среза (разъединение клеток)	• Соблюдайте условия фиксации.
	• Потеря ДНК (плохая окраска DAPI)	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Фоновые помехи	• Несоблюдение условий промывания	• Убедитесь в том, что pH промывочных растворов составляет 7.0 – 7.5, в противном случае, утилизируйте раствор. • Убедитесь в том, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC. • Увеличьте температуру промывочного раствора до 74ºC • Увеличьте продолжительность промывания до 5 минут
• Изменение интенсивности сигнала в срезе	• Вариант нормы • Из-за попадания пузырьков воздуха под покровное стекло зонд распределен по микропрепарату неравномерно • Слишком большой срез	• Если проблемные зоны хорошо окрашены DAPI, микропрепарат можно использовать для подсчета ядер. • Повторите гибридизацию на следующем смежном срезе и убедитесь в том, что под покровное стекло не попали пузырьки воздуха. • Поместите покровное стекло сразу после нанесения смеси зондов. • Для больших срезов увеличьте объем гибридизационного раствора до 20 мкл.
• Потеря ткани или нарушение ее морфологии	• Длительная фиксация среза (плохое окрашивание DAPI) • Неподходящие микропрепараты • Неправильная сушка микропрепаратов • Чрезмерная предварительная обработка	• Уменьшайте продолжительность обработки микропрепаратов протеазой с шагов в 3–5 минут. • Используйте положительно заряженные предметные стекла. • Измерьте температуру ThermoBrite/сушильного шкафа/горячей чашки Петри/термостата (норма 54-68°C). Если парафин на микропрепарат не растаял, увеличьте температуру (максимум - 68°C). • Убедитесь в том, что температура раствора для предварительной обработки составляет 80±1ºC • Уменьшите продолжительность предварительной обработки • Уменьшите продолжительность обработки протеазой
	• Чрезмерная денатурация (продолжительность размораживания)	• Уменьшите продолжительность обработки протеазой (новый микропрепарат). • Уменьшайте продолжительность размораживания с шагом в одну минуту до минимальной – две минуты (новые микропрепарат)
	• При удалении покровного стекла после гибридизации произошло повреждение среза ткани	• В буферном растворе покровное стекло должно отсоединиться («съехать» с покровного стекла)

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ КЛЕТОК

Подготовка исходных реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости измерьте pH растворов при температуре окружающей среды. При отсутствии специальных указаний используйте pH-метр со стеклянным электродом.

Раствор 20X SSC

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Тщательно растворите 132 г 20XSSC в 400 мл дистиллированной воды. Для получения раствора объемом 500 мл добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

2X SSC

Тщательно растворите 100мл 20XSSC в 850 мл дистиллированной воды. Измерьте pH и с помощью NaOH или HCl доведите его до 7.0±0.2.Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

1 % раствор формамида

Для получения 50 мл 1% раствора формамида тщательно смешайте 37 мл 1X фосфатного буферного раствора, 12,5 мл 10% нейтрального буферного раствора формалина и 0,5 мл 100X (2M) $MgCl_2$. Обновляйте ежедневно.

Спиртовые растворы (70 %, 85 %, 100 %)

Из 100 % этанола и дистиллированной воды приготовьте 70% и 85% спиртовые растворы (об./об.). Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения – 6 месяцев.

2X SSC/0,1% NP-40 промывочный раствор

Тщательно растворите 100 мл 20X SSC в 850 мл дистиллированной воды. Добавьте 1 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH или HCl доведите его до 7.0±0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

0.4X SSC/0,1 % NP-40 промывочный раствор

Тщательно растворите 20 мл 20XSSC в 950 мл дистиллированной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Тщательно размешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и с помощью NaOH или HCl доведите его до 7.4±0.2. Для получения раствора объемом 1 л добавьте необходимое количество дистиллированной воды. Хранить при температуре окружающей среды. Срок хранения - 6 месяцев или меньше (при помутнении или контаминации раствора).

Приготовление рабочих реагентов

Примечание: объемы растворов приведены для сосудов Коплина объемом 50 мл (см. Оборудование). При использовании других сосудов Коплина могут потребоваться большие объемы растворов. Объема раствора должно хватить, чтобы полностью покрыть исследуемый участок, но метки должны остаться на поверхности.

Раствор для предварительной обработки

В сосуд Коплина налейте 50 мл 2X SSC. Перед обработкой микропрепаратов сосуд Коплина поместите на водяную баню с циркуляцией (73±1ºC). Перед использованием убедитесь в том, что температура раствора составляет 73±1ºC. Срок хранения – один день.

Протеазный раствор (0,5 мг/мл)

К 50 мл 0.01 N HCl добавьте 0,025 протеазы (пепсин производства компании Amresco) до получения окончательной концентрации 0,5 мг/мл. Тщательно перемешайте. Протеазный раствор поместите в сосуд Коплина, а сосуд Коплина поместите на водяную баню (37ºC). Держите сосуд Коплина на водяной бане не менее 30 минут, периодически помешивая. Перед использованием убедитесь, что температура буферного раствора составляет 37±1ºC и что протеаза полностью растворилась. Срок хранения – один день.

Фосфатный буферный раствор

В два сосуда Коплина поместите по 50 мл 1X фосфатного буферного раствора. Используйте при комнатной температуре. Срок хранения – 1 день.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1 % раствор формальдегида

Смешайте 12,5 мл 10 % нейтрального буферного раствора формалина, 37 мл 1X фосфатного буферного раствора и 0,5 мл 100X $MgCl_2$. В сосуд Коплина поместите 50 1 % раствора формальдегида. Тщательно отмерьте нужный объем. Использовать при комнатной температуре. Срок хранения – 1 неделя. Если Вы не используете раствор, храните его при температуре 2 - 8°C.

Спиртовые растворы

В один сосуд Коплина налейте 50 мл 100 % этанола, в другой – 50 мл 85 % раствора этанола, в третий – 50 мл 70 % этанола. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – семь дней или меньше (при разбавлении или испарении раствора).

Инструкции по предварительной обработке

Предварительная обработка микропрепаратов

1. Погрузите микропрепараты в 2X SSC (73±1ºC) на 2 минуты.
При необходимости в каждую выемку сосуда Коплина можно класть по два предметных стекла нижними поверхностями друг к другу. В последнюю выемку следует положить только одно предметно стекло; при этом поверхность, на которую нанесен образец, должна быть обращена к центру сосуда.

Предварительная обработка протеазой

1. Удалите микропрепараты из сосуда с 2XSSC.
2. С помощью бумажного полотенца удалите излишки 2XSSC с краев предметного стекла; не высушивайте.
3. Погрузите микропрепараты в протеазный раствор (37±1ºC) на 10 минут.
При необходимости в каждую выемку сосуда можно класть по два предметных стекла нижними поверхностями друг к другу. В последнюю выемку следует положить только одно предметно стекло; при этом поверхность, на которую нанесен образец, должна быть обращена к центру сосуда.
4. Погрузите микропрепараты в фосфатный буферный раствор на 5 минут при температуре окружающей среды.

Фиксация 1 % раствором формальдегида

1. Извлеките микропрепараты из фосфатного буферного раствора.
2. Погрузите микропрепараты в 1 % раствор формальдегида при температуре окружающей на 5 минут.
3. Извлеките микропрепараты из 1 % раствора формальдегида.
4. Погрузите микропрепараты в фосфатный буферный раствор при температуре окружающей среды на 5 минут.
5. Погрузите микропрепараты в 70 % раствор этанола на 1 минуту.
6. Погрузите микропрепараты в 85 % раствор этанола на 1 минуту.
7. Погрузите микропрепараты в 100 % этанол на 1 минуту.
8. Высушите микропрепараты на подогревательном столике или на воздухе.
9. Приступайте к гибридизации или храните высушенные микропрепараты при температуре -20°C в течение 1 недели.

Автоматическая предварительная обработка (VP2000)

Для получения информации об использовании процессора VP2000 производства компании Эбботт (Abbott) обратитесь к руководству по эксплуатации.

Протокол VP2000:

Раствор	**Температура**	**Время**
Раствор 1X SSC для предварительной обработки	73ºC	2 мин.
Протеазный раствор	37ºC	10 мин.
1X фосфатный буферный раствор	Окружающей среды	5 мин.
1 % раствор формальдегида	Окружающей среды	5 мин.
1X фосфатный буферный раствор	Окружающей среды	5 мин.
70 % раствор этанола	Окружающей среды	1 мин.
85 % раствор этанола	Окружающей среды	1 мин.
100 % этанол	Окружающей среды	1 мин.
Высушивание на воздухе		

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приступайте к гибридизации или храните высушенные микропрепараты при температуре -20°C (±5°C) в течение 1 недели.

Гибридизация (образцы клеток)

Для получения подробной информации об использовании ThermoBrite обратитесь к руководству по эксплуатации. Если микропрепараты хранились при температуре -20°C, выполните с 5 по 8 пункт фиксации 1 % раствором формальдегида (см. выше).

Намочите увлажняющую карту водой и поместите в специальные выемки ThermoBrite.
1. Установите **температуру размораживания** на 73°C и **время размораживания** на 3 минуты; **температуру гибридизации** на 37°C и **время гибридизации** на 16 - 20 ч.
2. С помощью алмазного резца отметьте участки гибридизации на обратной стороне предметного стекла и поместите микропрепараты на ThermoBrite.
3. Встряхните смесь зондов. Помешайте, чтобы поднять раствор со дна и удалить пузырьки воздуха.
4. Нанесите 10 мкл смеси зонда на микропрепарат и сразу же накройте его покровным стеклом.
5. Края обработайте резиновым клеем.
6. Запустите программу совместной гибридизации.
По окончании гибридизации (16 - 20 ч) приступите к процессу отмывки, описанному ниже.

Отмывка микропрепаратов (цитология)
В сосуд Коплина налейте 50 мл раствора 0.4X SSC/0.3% NP-40. Не менее чем на 30 минут до использования поместите сосуд на водяную баню (73±1ºC).
Перед использованием убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC. Срок хранения – 1 день.
В другой сосуд Коплина налейте 50 мл раствора 2X SSC/0.1% NP-40. Использовать при температуре окружающей среды. Срок хранения – 1 день.
Примечание: для поддержания температуры раствора 0.4X SSC/0.3% NP-40 на должном уровне одновременно промывайте по 4 микропрепарата. Если микропрепаратов меньше, используйте пустые предметные стекла, имеющие температуру окружающей среды.
1. Опустите микропрепараты в подогретый раствор 0.4X SSC/0.3% NP-40. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.
2. Извлеките микропрепараты через 2 минуты.
3. Опустите микропрепараты в раствор 2X SSC/0.1% NP-40, имеющий температуру окружающей среды, на 5 сек. – 1 мин. Повторите процедуру для остальных микропрепаратов.

Визуализация гибридизации
1. Сушите микропрепарат (-ы) на воздухе в темноте не менее 2 ч. **Примечание:** во время высушивания предметные стекла должны стоять на одном из краев вертикально или горизонтально.
2. На исследуемый участок микропрепарата нанесите 10 мкл контрастирующего красителя DAPI II и накройте покровным стеклом. После нанесения красителя подождите 15 минут, после чего можете изучать микропрепарат под микроскопом.
3. Изучите образец с помощью флуоресцентного микроскопа в течение суток или храните при температуре -20° C в течение 1 недели.

Фильтр Vysis...	**Обеспечивает одновременное возбуждение и излучение...**
Green	флуорофоров SpectrumGreen
Red	флуорофоров SpectrumRed
Aqua	флуорофоров SpectrumAqua
Gold	Флуорофоров SpectrumGold
DAPI	DAPI

Условия хранения
Микропрепараты следует хранить при температуре -20°C и беречь от света.

Ограничения процедуры
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих методик контроля и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ожидаемые результаты

В нормальном диплоидном ядре должны появиться восемь флуоресцентных сигналов (два зеленых, два красных, два голубых и два золотых). Эти сигналы соответствуют исследуемым локусам гомологичных хромосом, к которым присоединяются зонды: зеленый, ERBB2 (17q12); красный, p16 (9p21); голубой, MYC (8q24); золотой, ZNF217 (20q13.2).

Наличие патологического количества копий...	характеризуется появлением большего или меньшего количества сигналов зонда:
Гена ERBB2 (17q12)	зеленого
Гена p16 (9p21)	красного
Гена MYC (8q24)	голубого
Гена ZNF217 (20q13.2)	золотого

Инструкция по устранению проблем

Проблема	**Возможная причина**	**Решение**
• Отсутствие сигнала или слабый сигнал	• Неподходящий набор фильтров • Нарушение работы микроскопа • Неподходящие лампы (т.е. ксеноновые или вольфрамовые) • Просроченная ртутная лампа • Смещение ртутной лампы • Грязные и/или потрескавшиеся собирательные линзы • Грязное или разбитое зеркало • Неподходящие условия гибридизации • Неподходящая температура промывочных растворов после гибридизации • Под покровное стекло попали пузырьки воздуха, и зонд не достиг места назначения • Недостаточное количество гибридизационного раствора для среза • Неправильная обработка протеазой • Потеря ДНК (плохая окраска DAPI)	• Используйте рекомендуемые фильтры. • Свяжитесь с техническим представителем компании-производителя микроскопа. • Используйте ртутную лампу (желательно, 100 Вт). • Замените старую лампу на новую. • Выровняйте лампу. • Протрите и замените линзы. • Протрите или замените зеркало. • Продолжительность гибридизации должна составлять не менее 14 ч. • Убедитесь в том, что температура промывочных растворов составляет 73±1ºC. • Уменьшите температуру промывочного раствора до 72ºC. • Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. • Увеличьте количество гибридизационного раствора до 20 мкл на один срез. • Убедитесь в том, что температура раствора составляет 37±1ºC. • Увеличьте продолжительность обработки протеазой с прибавкой по 3 - 5 минут. • Более длительная фиксация приводит к прогрессирующему уменьшению интенсивности сигнала и требует более длительной обработки протеазой. • Соблюдайте условия фиксации.
• Низкая специфичность сигнала	• Неподходящие условия гибридизации.	• Измерьте температуру денатурационного и гибридизационного растворов.
	• Низкая температура промывочных растворов.	• Поддерживайте температуру промывочных растворов на уровне 73±1ºC
• Слишком яркий	• Слишком высокая	• Попробуйте заблокировать некоторые сигнал,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

сигнал	концентрация зонда для Вашего микроскопа	поместив нейтральный светофильтр на пути сигнала.
• Фоновые помехи	• Недостаточная вязкость раствора	• Убедитесь в том, что pH промывочных растворов составляет 7.0 – 7.5, в противном случае, утилизируйте раствор. • Убедитесь в том, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC. • Увеличьте температуру промывочного раствора до 74ºC**.**
• Нарушение клеточной структуры	• Чрезмерная обработка микропрепарата протеазой.	• Уменьшите продолжительность обработки микропрепарата протеазой.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Введение
Согласно стандартам и нормативам Американской коллегии медицинской генетики[13] изучение набора зондов Vysis Esophageal для FISH было направлено на исследование аналитической чувствительности и специфичности зондов LSI ERBB2 (17q12) SGn / p16 (9p21) SR / MYC (8q24) SA / ZNF217 (20q13.2) SGd и их производительности при проведении анализа с использованием образцов клеток и образцов, фиксированных в формалине и залитых парафином.

Аналитическая чувствительность и специфичность

Оценка эффективности применения зондов проводилась с использованием 100 метафазных пластинок культивированных лимфоцитов крови 5 разных людей (20 метафазных пластинок в каждом образце). Микропрепараты изучили с помощью флуоресцентного микроскопа со специальными фильтрами с одной полосой пропускания для DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол), SpectrumAqua, SpectrumGreen, SpectrumGold и SpectrumRed. В каждой метафазной пластинке проводился подсчет сигналов зонда ERBB2 (17q12) (Green), имеющих правильное расположение (длинной плечо 17-ой хромосомы, диск 12, рядом с центромерой: истинно положительные сигналы), и количество сигналов зонда ERBB2, расположенных в других местах (ложноположительные сигналы). Точно также были подсчитаны сигналы зонда red LSI p16 (9p21) (правильное расположение – середина короткого плеча 9-ой хромосомы, диск 21), зонда aqua LSI MYC (8q24) (правильное расположение – теломерный конец длинного плеча 8-ой хромосомы, диск 24) и зонда gold LSI ZNF217 (20q13.2) (правильное расположение – длинное плечо 20-ой хромосомы, диск 13.2). Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что все зонды имели правильное расположение: ни в одной из 100 метафазных пластинок не было перекрестной гибридизации.

Анализ с использованием образцов клеток

1. Доля успешных попыток (эффективность гибридизации). Для определения доли успешных попыток использовался заменитель образца клеток (моча). FISH проводилась на микропрепаратах мочи, полученной от пяти здоровых человек, всего 60 анализов. 30 анализов были выполнены с использованием ручной предварительной обработки, и еще 30 анализов – с использованием процессора VP2000. Для определения доли успешных попыток проводилась оценка следующих параметров: специфичности сигнала, интенсивности сигнала, наличия/отсутствия фоновых помех и общей считываемости зондов ERBB2 (17q12), p16 (9p21), MYC (8q24) и ZNF217 (20q13.2) на каждом гибридизованном микропрепарате. Принимая во внимание полученные результаты, все анализы прошли успешно.
2. Пилотное исследование: FISH проводилась с использованием образцов клеток пищевода 92 пациентов, полученных с помощью браш-биопсии во время эндоскопического исследования. Пациенты находились под наблюдением по поводу пищевода Барретта в клинике Мейо, г. Рочестер, штат Миннесота[2]. 84 пациентам по результатам биопсии был поставлен диагноз дисплазии высокой степени и/или аденокарциномы пищевода, 7 пациентам – дисплазии низкой степени и только одному пациенту – кишечной метаплазии. Всем пациентам во время эндоскопического исследования систематически выполнялась биопсия. По результатам гистологического исследования у 14 пациентов пищевод Барретта отсутствовал; 16 пациентов имели кишечную метаплазию, 20 – дисплазию низкой степени, 22 – дисплазию высокой степени и 20 – аденокарциному пищевода. После гибридизации зондами p16 (9p21) SR, ERBB2 (17q12) SGn, MYC (8q24) SA и ZNF217 (20q13.2) SGd образцы были изучены с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного фильтрами с одной полосой пропускания для DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол), SpectrumGreen, SpectrumRed, SpectrumAqua, и SpectrumGold. Подсчет количества сигналов каждого зонда проводился в 100

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

последовательных неороговевающих клетках без признаков воспаления. Как показано на рисунке 1, подсчет доли клеток с большим (более двух) и меньшим количеством сигналов (менее двух) в каждом локусе проводился в соответствии с гистологической классификацией.[2]

На рисунке 1 (Fritcher EG и др., 2008 г., с изменениями) представлена средняя доля клеток, имеющих большее или меньшее количество локусов в соответствии с гистологической категорией. Наблюдалось заметное увеличение доли клеток с меньшим количеством 9p21 и большим количеством 8q24, 17q12 и 20q13.2 при прогрессировании от доброкачественных клеток ороговевающего эпителия до дисплазии высокой степени. Дополнительное увеличение доли клеток, имеющих большее количество локусов 8q24, 17q12 и 20q13.2, наблюдалось при прогрессировании до аденокарциномы.

Рисунок 1. Доля клеток, имеющих большее или меньшее количество локусов в зависимости от гистологической категории.

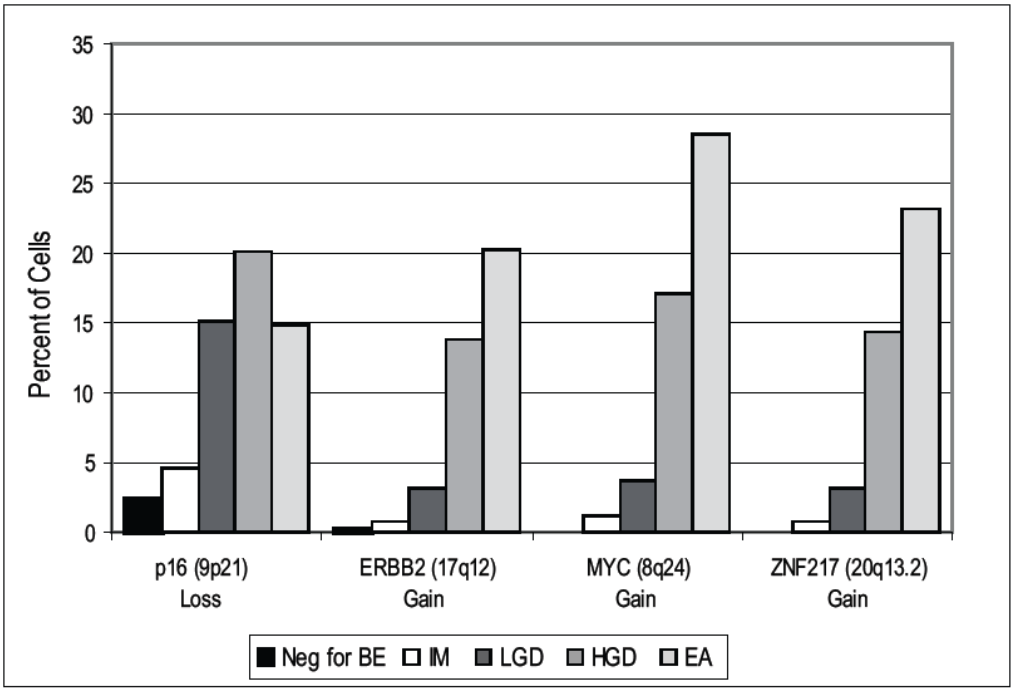


Рисунок: по оси абсцисс: p16 (9p21) Уменьшение, ERBB2 (17q12) Увеличение, MYC (8q24) SA Увеличение, ZNF217 (20q13.2) Увеличение; по оси ординат: доля клеток
Подписи: Отсутствие пищевода Барретта; Кишечная метаплазия; Дисплазия низкой степени; Дисплазия высокой степени; Аденокарцинома пищевода

Анализ с использованием образцов, фиксированных в формалине и залитых парафином
1. Доля успешных попыток (эффективность гибридизации). Для определения доли успешных попыток использовались образцы ткани пищевода, фиксированные в формалине и залитые парафином. Образцы были взяты у 10 пациентов (по результатам гистологического исследования: 4 доброкачественных образца и 6 образцов аденокарциномы). FISH проводилась на микропрепаратах толщиной 5 микрон. 30 анализов выполнены с использованием ручной предварительной обработки, и еще 30 анализов – с использованием процессора VP2000. Для определения доли успешных попыток проводилась оценка следующих параметров: специфичности сигнала, интенсивности сигнала, наличия/отсутствия фоновых помех и общей считываемости зондов ERBB2 (17q12), p16 (9p21), MYC (8q24) и ZNF217 (20q13.2) на каждом гибридизованном микропрепарате. Принимая во внимание полученные результаты, все анализы прошли успешно.
2. Анализ с использованием образцов, фиксированных в формалине и залитых парафином и не имеющих патологии по результатам гистологического исследования. От каждого из 4 доброкачественных образцов ткани пищевода отделили по 4 среза толщиной 5 микрон и приготовили микропрепараты. Микропрепараты разделили на 4 группы: каждая группа содержала по одному микропрепарату каждого образца. Для всех 16 микропрепаратов провели гибридизацию зондом Vysis Esophageal для FISH, а затем проанализировали результаты. Сначала 3 независимых эксперта пронумеровали одну группу из 4 микропрепаратов, чтобы определить воспроизводимость подсчета сигналов между экспертами (12 исследований). Оставшиеся три группы разделили между экспертами (по одной группе каждому эксперту), и один и тот же эксперт трижды пронумеровал каждый микропрепарат, чтобы определить воспроизводимость результатов у одного и того же эксперта (36 исследований, 12 для каждого эксперта). Подсчет сигналов каждого зонда проводился в 25

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

последовательных клетках каждого образца. Это позволило определить среднее количество сигналов ERBB2 (17q12), p16 (9p21), MYC (8q24) и ZNF217 (20q13.2) в клетке, а также оценить воспроизводимость результатов между экспертами и у одного и того же эксперта (таблица 1). Согласно данным таблицы 1 среднее количество сигналов в клетке в образцах без патологии варьирует от 1,83 до 1,89 с коэффициентами вариации от 5 до 7 %. Среднее количество сигналов в локусе меньше 2, что связано с усечением ядер во время приготовления срезов (толщина среза меньше диаметра ядра).

Таблица 1. Среднее количество сигналов ERBB2 (17q12), p16 (9p21), MYC (8q24) и ZNF217 (20q13.2) в клетке и воспроизводимость результатов между экспертами и у одного и того же эксперта. А. Воспроизводимость результатов между экспертами (каждый из трех независимых экспертов пронумеровал одну и ту же группу из 4 микропрепаратов). Б. Воспроизводимость результатов у одного и того же эксперта (каждый независимый эксперт трижды пронумеровал свою группу из 4 микропрепаратов).

А.				Б.			
Зонд	Среднее количество сигналов	Воспроизводимость результатов между экспертами		Зонд	Среднее количество сигналов	Воспроизводимость результатов у одного и того же эксперта	
		Стандартное отклонение	Коэффициент вариации (%)			Стандартное отклонение	Коэффициент вариации (%)
ERBB2	1,84	0,1	5,22	ERBB2	1,86	0,05	2,56
MYC	1,89	0,05	2,44	MYC	1,93	0,05	2,54
ZNF217	1,83	0,07	3,73	ZNF217	1,89	0,05	2,44
p16	1,85	0,13	6,93	p16	1,88	0,06	3,29

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brankley SM, Wang KK, Harwood AR, et al. The development of a fluorescence in situ hybridization assay for the detection of dysplasia and adenocarcinoma in Barrett's esophagus. J Mol Diagn. 2006;8(2):260-7.
2. Fritcher EG, Brankley SM, Kipp BR, et al. A comparison of conventional cytology, DNA ploidy analysis, and fluorescence in situ hybridization for the detection of dysplasia and adenocarcinoma in patients with Barrett's esophagus. Hum Pathol. 2008;39(8):1128-35.
3. Zhang HY, Spechler SJ and Souza RF. Esophageal adenocarcinoma arising in Barrett esophagus. Cancer Lett. 2009;275(2):170-7.
4. Odze RD. Update on the diagnosis and treatment of Barrett esophagus and related neoplastic precursor lesions. Arch Pathol Lab Med. 2008;132(10):1577-85.
5. Pickens A and Orringer MB. Geographical distribution and racial disparity in esophageal cancer. Ann Thorac Surg. 2003;76(4):1367-9.
6. Pohl H and Welch HG. The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence. J Natl Cancer Inst. 2005;97(2):142-6.
7. Umar SB and Fleischer DE. Esophageal cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2008;5(9):517-26.
8. Vizcaino AP, Moreno V, Lambert R, Parkin DM. Time trends incidence of both major histologic types of esophageal carcinomas in selected countries, 1973-1995. Int J Cancer. 2002;99(6):860 -8.
9. American Cancer Society. Global Cancer Facts and Figures, 2007.
10. Pinkel D. Fluorescence In Situ Hybridization. In Introduction to Fluorescence In Situ Hydridization Principles and Clincal Applications. M. Andreeff and D. Pinkel Ed. Wiley-Liss. John Wiley & Sons, Inc.1999; 3-32.
11. Van Stedum S and King W. Basic FISH Techniques and Troubleshooting. In: Fan YS. Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 2002; 204:51-63.
12. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. Genet Med 2006;8(1):16-23.
13. ACMG Standards & Guidelines, 2008 Edition Validation requirements, Sections E9.2 and E10.2.2 standards.

Компания Эббот Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) является законным производителем: набора зондов Vysis Esophageal для FISH

Примечание: зонд LSI p16 (9p21)
Доводим до Вашего сведения, что CDKN2A (ингибитор циклин-зависимой киназы 2A) одобрен Комитетом по номенклатуре генов Международной организации по изучению генома человека (HUGO Gene Nomenclature Committee) в качестве символа гена p16.

Зонды Vysis LSI, меченные флуорофорами, и использование смесей зондов Vysis разрешены на основании европейского патента № 0 549 709 B1, приписанного компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.). Смеси зондов разрешены на основании заявок на получение европейского патента, которые находятся на рассмотрении. Использование зондов Vysis LSI осуществляется на основании европейского патента № 0

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

444 115 B1, приписанного Йельскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право.

CEP, LSI, WCP и Vysis являются зарегистрированными торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.). SpectrumGreen, SpectrumRed, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold и HYBrite являются торговыми марками компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.). Использование двухцветных перегруппировочных зондов или двухцветных разъединяющих Vysis LSI осуществляется на основании европейского патента № 0 430 402 B1, приписанного Калифорнийскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Использование зондов Vysis LSI осуществляется также на основании европейского патента № 0 444 115 B1, приписанного Йельскому университету и дающего компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) эксклюзивное право. Зонды Vysis Esophageal для FISH разрешены на основании заявок на получение европейских патентов, которые находятся на рассмотрении.

LSI, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumGold, SpectrumRed и SpectrumAqua являются зарегистрированными торговыми марками группы компаний Эбботт (Abbott Group of Companies), имеющих разную сферу полномочий.

Все другие торговые марки и зарегистрированные торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

Техническая помощь:
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в отдел Технической Службы компании Abbot Molecular Inc. по телефону +49-6122-580 или заходите на http:\\www.abbottmolecular.com.

Адрес уполномоченного представителя
ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
Телефон: +49-6122-580



CE

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA



ABBOTT
Max Plank-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2009, 2014 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
февраль 2014
30-608437/R3

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set

en

REF 08L10-002

30-608203/R3

Vysis LSI BCR/ABL Dual Color,
Dual Fusion Translocation Probe Set
08L10-002
30-608203/R3

Используемые символы

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер лота
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурный режим
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	Биологический риск
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	Использовать до (срок годности)
	См. инструкцию по применению
	Авторизованный представитель в Европейском сообществе

НАЗНАЧЕНИЕ

Данная проба флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) предназначена для определения t(9;22) (q34;q11.2) и комплекса или маскированных вариантов t(9;22) которые приводят к слиянию генов BCR/ABL. Данная проба может быть использована в отношении хромосом в метафазе или ядер в интерфазе.

Краткое описание тестирования

Филадельфийская хромосома (Ph) обусловленная реципрокными t(9;22)(q34;q11.2) является отличительным признаком почти всех случаев хронического миелолейкоза (ХМЛ). Она также встречается в некоторых случаях острого лимфолейкоза, в которых она ассоциирована с плохим прогнозом[1]

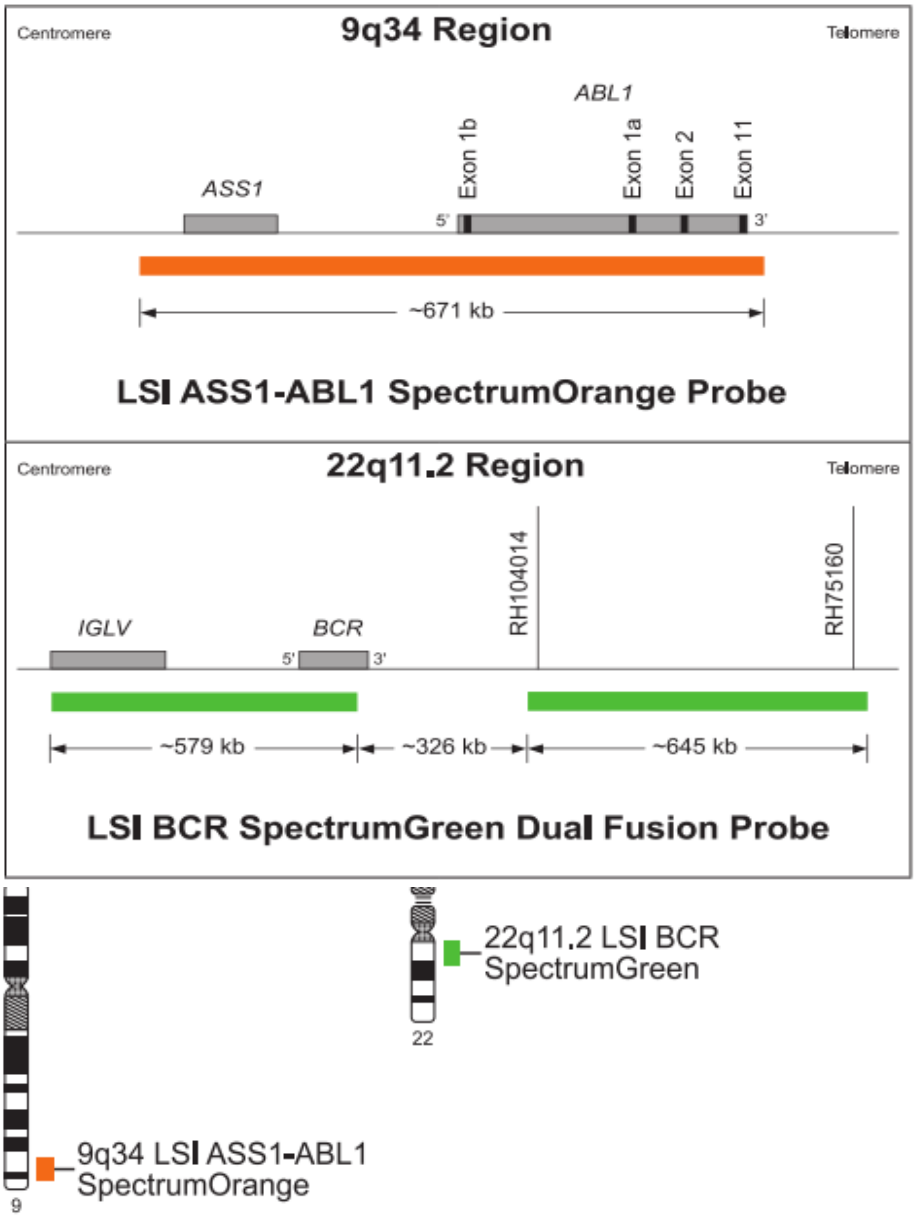
Филадельфийская хромосома редко обнаруживается при других лейкозах. Критическим молекулярным последствием t(9;22) является формирование химерного гена BCR/ABL (область локализации инициации сайта реаранжировки/вирус мышиного лейкоза Абельсона 1) производного хромосомы 22 (филадельфийской). Данный химерный ген отвечает за выработку тирозин киназы, которая является постоянной активной, в отличие

от высоко отрегулированной нормальной ABL киназы[2]. В 5 - 10% пациентов с ХМЛ, слияние гена BCR/ABL происходит в отсутствие цитогенетически определяемой филадельфийской хромосомы, в результате более комплексной реаранжировки[3]

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Описание пробы

Примерно 671 килобаз SpectrumOrange™ ABL проба протягивается от точки центромеры аргиносукцинат синтазы (ACC) до теломеры гена ABL 9 хромосомы. Проба SpectrumGreen™ BCR захватывает геномное расстояние примерно в 1.5 м.н. Она начинается в пределах вариабельных сегментов локуса IGL 22 хромосомы и заканчивается в точке 900 килобаз теломеры гена BCR. 300 килобаз теломеры гена BCR не присутствует в пробе. Обе пробы BCR и ABL захватывают типичные области локализации хромосом t(9;22) соответствующих генов.

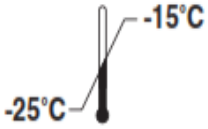


Реагенты

1. Vysis LSI BCR/ABL двухцветный, Набор пробы транслокации двойного слияния (Серия. 31-191032) (1 пробирка, 50 мкл/пробирку). 675 нг/мкл. Флуорофор-маркированная пробы ДНК и блокирующий ДНК в трис-ЭДТА буфер.

2. Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации (Серия 30-805826) (1 пробирка, 375 мкл/пробирку). Декстрана сульфат, формамид, SSC (pH 7.0).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



The Vysis LSI BCR/ABL двухцветный, Набор пробы транслокации двойного слияния и Vysis LSI/WCP Буфер гибридизации должны храниться при температуре -20°C и ниже, в защищенном от света месте.

Меры предосторожности

IVD In Vitro диагностическое медицинское устройство

Для диагностики In Vitro.

Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set



ВНИМАНИЕ: данный препарат содержит полученные от человека и/или потенциально инфекционные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может гарантировать, что продукты, полученные от человека, или инактивированные микроорганизмы не инфицированы. Поэтому все биоматериалы человека должны рассматриваться как потенциально инфекционные. Рекомендуется обращаться с этими реагентами и биоматериалами человека в соответствии со стандартом для гемоконтактных патогенов Управления США по охране труда и промышленной гигиене (OSHA Standard on Bloodborne Pathogens).[20] При работе с материалами, содержащими инфекционные агенты, следует соблюдать правила биобезопасности, уровень 2, или другие соответствующие правила биобезопасности.[19,21,22]

Эти меры включают, но не ограничиваются следующим:

- Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите, не пользуйтесь косметикой и не дотрагивайтесь до контактных линз в помещениях, где производятся работы с этими материалами.
- Вытирайте и дезинфицируйте все места, куда попадают капли образцов, туберкулецидным дезинфецирующим средством, например, 1,0% натрия гипохлорита, или другим соответствующим дезинфецирующим средством.[7]
- Деконтаминируйте и утилизируйте все потенциально все потенциально инфекционные материалы в соответствии с местными и государственными законами.[10]

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид

H360	Может причинить вред плоду ребенка в утробе матери
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

ПАСПОРТА БЕЗОПАСНОСТИ: Важная информация по безопасности, хранению, транспортировке и утилизации содержится в Паспортах Безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (MSDS) для всех реагентов, представленных в комплекте, доступны по запросу от Службы Технической поддержки Abbott Molecular.

Приготовление Реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: там, где необходимо, измеряйте pH растворов при комнатной температуре. Используйте pH – метр со стеклянным электродом, если не указано иное.

20X SSC раствор

Смешайте 132 г 20X SSC и 400 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCl. Доведите объем до 500 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2X SSC / 0,1% NP-40 промывочный раствор
Смешайте 100 мл 20X SSC (pH 5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% формамид / 2X SSC)
Смешайте 49 мл формамида, 7 мл 20X SSC (pH 5,3) и 14 мл очищенной воды в стеклянной емкости Коплина. Измерьте pH с помощью индикаторных полосок и убедитесь, что pH составляет 7,0-8,0. Хранить при температуре при 2-8°C в плотно закрытом контейнере. Использовать в течение 7 дней.
Растворы этанола (70%, 85%, 100%)
Приготовьте v/v растворы этанола методом разведений, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Использовать в течение 6 месяцев.
0,4X SSC / 0,3% NP-40 промывочный раствор
Смешайте 20 мл 20X SSC (pH 5,3) и 950 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 3 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0-7,5 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.
Хранение LSI ДНК зонда: Зонд LSI ДНК должен храниться при температуре не выше -20ºC (±5 °C) в защищенном от света месте.
Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требуется свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.

Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре, встряхните, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.
Сбор образцов и подготовка к Анализу
Клетки костного мозга культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).
Методика
Необходимые материалы:
- Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Set
- Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипет-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в этой инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата образца-мишени

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.

Приготовление раствора зондов

1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца-мишени):
   7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
   1 мкл зонда
   2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК

Гибридизация Зонда и Образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру – поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи резинового клея изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Отмывка Стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4X SSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий диапазон показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):

7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.

При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей этой инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Hyb Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества

С образцами тканей пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.

Ограничения при использовании

Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[6]

Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов.

Предполагаемые результаты

Наборы ядер или хромосом в метафазе без слияния гена BCR/ABL должныдавать 2 оранжевых (нормальная хромосома 9) и 2 зеленых (нормальная хромосома 22) сигналов. Простые реципрокные транслокации без значительных потерь центромер или теломер ДНК дают 1 оранжевый (нормальная хромосома 9), 1 зеленый (нормальная хромосома 22), и 2 оранжевых/зеленых или желтых сигналов слияния (1 на каждую аномальную 9 и 22 хромосомы). При более комплексных аномалиях, включая случаи делеции центромер ДНК, могут наблюдаться другие рисунки сигналов. Особенно в случаях атипичных рисунков интерфазной FISH, при интерпретации результатов может оказаться полезным анализ метафазной FISH[4,5].

Интерпретация результатов FISH должна быть произведена путем утилизации соответствующих контролей и аналитических техник наряду с учетов других клинических и диагностических данных тестирования[4,6].

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Увеличьте температуру 0,4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости, продолжайте увеличивать температуру до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Уменьшите температуру плавления на 2ºC.
«Тусклые» зонды	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Увеличьте время гибридизации. • Увеличьте температуру плавления. При необходимости, увеличивайте температуру до тех пор, пока морфология не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4X SSC/0,3% NP-40 при температуре от 70ºC до 73ºC.
Рассеивание сигнала (точечное)	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4X SSC/0,3% NP-40 при температуре от 73ºC до 76ºC.
Нечеткая морфология в метафазу	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Приготовление срезов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите срезы в 2X SSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3. Погрузите срезы несколько раз в очищенную воду. 4. Проведите обезвоживание срезов в серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%). 5. Просушите стекла на воздухе и продолжайте приготовление с момента «Приготовление препаратов для коденатурации». • Если нечеткая морфология сохраняется, измените характер использования прибора ThermoBrite: 1. Подготовьте 280 мкл 70% формамида/раствора для денатурации 2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл очищенной воды). 2. Запустите программу ThermoBrite Hold Temp при температуре 73ºC. 3. Поместите 10 мкл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации на каждую интересующую область и накройте покровным стеклом. 4. Когда ThermoBrite достигнет 73ºC, поместите срезы на нагревающую поверхность. Закройте крышку. 5. Извлеките срезы через 3 минуты. 6. Снимите покровное стекло. 7. Продолжите с этапа дегидратации «Приготовления препаратов для коденатурации» для процедуры анализа без использования коденатурации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Советы и решение проблем

При просмотре результатов FISH-методики убедитесь, что Ваш микроскоп нормально работает и настроен должным образом.

Приведенный ниже, в таблице, список содержит некоторые нетипичные результаты, с которыми Вы можете встретиться при использовании зондов LSI. Приведены вероятные причины рассматриваемых проблем и предложения по улучшению качества проведения анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
"Искаженная" морфология хромосомы	Срезы в процессе пробоподготовки были высушены слишком быстро.	Повысьте температуру водяной бани (увеличьте влажность) при погружении в нее срезов. Снизьте температуру столика с подогревом во время приготовления образца. Увеличьте время высушивания (как минимум – в течение ночи, затем оставьте срезы на самое меньшее 24 часа при комнатной температуре). Не подвергайте срезы воздействию высоких температур.
	Срезы подверглись избыточной денатурации.	Убедитесь, что раствор для денатурации был приготовлен согласно данной инструкции. Убедитесь, что перед погружением срезов температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC; уменьшите ее до 72 ºC. Уменьшите продолжительность погружения слайда в раствор для денатурации до 1-3 минут.
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Срезы перед денатурацией имели слишком низкую температуру.	Выдержите срезы в течение как минимум 24 часов в условиях комнатной температуры.
Высокий фон слайда	Стекла были недостаточно очищены перед приготовлением препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите насухо, используя безворсовую бумагу для промокания.
	Клеточный детрит в образце.	Промойте детрит с помощью свежего фиксирующего раствора

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		три раза и повторите для данного препарата процедуру раскапывания.
	Метафазные пластинки подвергались воздействию высоких температур или содержат цитоплазму.	Увеличьте время, в течение которого срез погружен в денатурирующий раствор, до 10 мин.
	Препарат не промыт должным образом после гибридизации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь, что pH и температура раствора требуемые. Снимите покровное стекло. Повторите процедуру отмывки.
	Промывочные растворы использовались в течение более длительного времени или хранились в неподобающих условиях.	Убедитесь, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при 4ºC. Утилизируйте их через 7 дней или после частого использования. Все остальные промывочные растворы используйте не более 1 дня. Убедитесь, что pH промывочных растворов, содержащих формамид, составляет от 7,0 до 8,0.
	Для визуализации гибридизации использованы длиннополосные пропускные фильтры.	Для уменьшения доли «фонового света» перейдите на фильтр с меньшей полосой пропускания или на многопропускные фильтры.
Отсутствие сигнала или слабые сигналы	Срез образца не денатурирован должным образом.	Перед тем, как погружать срезы в денатурирующий раствор, убедитесь, что температура раствора в емкости Коплина составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74ºC. Увеличьте время денатурации до 2-4 минут.
	Срез образца не подготовлен для FISH должным образом.	Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для того, чтобы получить протоколы подготовки образца для FISH-методики
	После нанесения образца («раскапывания») препарат не выдержан должным образом.	До проведения FISH выдержите препараты в течение 24 ч при комнатной температуре

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Со срезами был проведен GTG-бэндинг.	Использование срезов после GTG-бэндинга в FISH-методике (обработка трипсином и красителем Гимза (trypsin-Giemsa)) может потребовать изменений в протоколах бэндинга и/или гибридизации. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular. Или приготовьте новые срезы образцов.
	Не добавлен зонд.	Приготовьте новую смесь зондов, она должны медленно достичь необходимой температуры. Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени. Медленно раскапайте зонды с помощью пипетки.
	Зонды, буфер для гибридизации или смесь зондов не перемешаны перед использованием.	Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени.
	Зонды неправильно разведены для гибридизации.	Используйте указанные объемы для того, чтобы поддержать необходимые соотношения в смеси зондов (7 мкл буфера для гибридизации: 1 мкл зонда: 2 мкл очищенной воды). Убедитесь, что пипетка откалибрована. Буфер для гибридизации перед использованием должен прогреться и достичь комнатной температуры; раскапывайте медленно.
	Зонды не денатурированы должным образом.	Убедитесь, что температура водяной бани, используемой для денатурации смеси зондов, составляет 73±1ºC.
	ПРМЕЧАНИЕ: Не применимо для зондов, помещенных в буфер для гибридизации и денатурированных.	Денатурируйте смесь зондов в течение 5 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Зонды не нанесены на искомый образец непосредственно после денатурации зондов.	Планируйте так, чтобы зонды наносились сразу же после извлечения срезов из раствора EtOH 100%. Перед нанесением зонда убедитесь, что EtOH испарился. Извлеките пробирку со смесью зондов из водяной бани (73±1ºC) и сразу же положите пробирку на столик с подогревом (45-50ºC). Во время нанесения зондов на срез (раскапывание) держите пробирку на подогреваемом столике. Обрабатывайте только такое количество срезов, которое сможете исследовать и соблюдайте должную температуру и временные промежутки в соответствии с данной методикой исследования.
	Смесь зондов на срезе образца высушена слишком сильно.	Сразу же после нанесения смеси зондов накройте искомую область покровным стеклом При отмывке удаляйте покровное стекло с препарата за один прием и сразу же препарата погрузите этот препарат в промывочный раствор, до того, как снять покровное стекло со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровным стеклом появились пузырьки воздуха.	Положите покровное стекло с первого касания поверхности смеси зондов. Положите препарат с покровным стеклом на какую-либо прокладку и очень осторожно выдавите пузырьки воздуха.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что соблюдены установочные время и температура гибридизации. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. Создайте хороший изолирующий слой вокруг покровного стекла при помощи резинового клея , не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неверные условия отмывки или использование неправильных растворов.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с этой инструкцией. Убедитесь, что температуры промывочных растворов равны установочным температурам процедуры отмывки. Убедитесь, что используемые термометры и pH – метры откалиброваны должным образом. Снимите покровные стекла до погружения препаратов в промывочный раствор.
	Нарушены условия хранения зондов или срезов образцов.	Храните неразведенные зонды при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте. Храните не гибридизованные срезы высушенными, при температуре -20ºC или ниже; или при комнатной температуре в течение короткого времени. Храните гибридизованные срезы при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте максимум в течение 3 недель.
	Использован неверный флуоресцентный краситель. Флуоресцентный краситель слишком яркий.	Снимите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре: проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите и нанесите краситель снова.
	Для визуализации гибридизации используется неверный набор фильтров.	Многополосные пропускные фильтры дают меньше света, чем однополосные, поэтому сигналы от зондов при просмотре с использованием многополосных фильтров могут казаться слабее. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильные фильтры. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.
	Конфигурация микроскопа или объективов не приспособлена для визуализации результатов FISH, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем Вашего микроскопа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Низкая специфичность сигнала	Зонды разведены неверно; часто в анализируемый образец добавляется слишком большое количество зондов.	Убедитесь, что смесь зондов приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь, что в смесь зондов добавлено должное количество буфера для гибридизации.
	Температура для промывки слишком низкая.	Не помещайте в емкость Коплина больше четырех стекол одновременно, и таким образом поддерживайте необходимую температуру промывочных растворов. Убедитесь, что температура промывочного раствора равна необходимой перед тем, как промывать еще одну группу препаратов.
	Промывочный раствор слишком низкой концентрации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем концентрированнее раствор.
Яркий или тусклый флуоресцентный краситель	Краситель тусклый: срезы не обезвожены до нанесения красителя или в красителе имеются жировые капли.	Снимите покровное стекло. Погрузите срезы на 5 минут в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре; проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите на воздухе и нанесите краситель снова.
	Неверная концентрация красителя.	Если краситель слишком яркий, разведите краситель в серии растворов (Номер в списке 06J290-010) до нанесения на срез.
	ПРИМЕЧАНИЕ: DAPI I в восемь раз более концентрированный, чем DAPI II.	
	Краситель слишком старый или подвергался воздействию света в течение длительного времени	Храните красители при -20ºC или ниже, в защищенном от света месте, используйте в таких же условиях. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Библиография

1. Bloomfield CD, Goldman AI, Alimena G, et al. Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1986;67:415-20.
2. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, et al. Tyrosine kinase activity and transformation potency of *bcr-abl* Oncogene Products. *Science* 1990; 247:1079-82.
3. Chase A, Huntley BJ, Cross NC. Cytogenetics of chronic myeloid leukemia. *Best Prac Res Clin Haematol* 2001;14(3):553-71.
4. Dewald GW. Interphase FISH studies of Chronic Myeloid Leukemia. In: Fan YS, ed. *Methods in Molecular Biology, Vol 204: Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2002:311-42.
5. Primo D, Tabernero MD, Rasillo A, et al. Patterns of BCR/ABL gene rearrangements by interphase fluorescence in situ hybridization
(FISH) in BCR/ABL leukemias: incidence and underlying genetic abnormalities. *Leukemia* 2003;17:1124-29.
6. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med* 2006;8(1):16-23.
7. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition.* CLSI Document M29-A3 (ISBN 1-56238-567-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
10. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Technical Assistance:

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Использование двухцветных зондов для перегруппировки Vysis LSI или Dual Color, Break защищены европейским патентом № 0 430 402 B1, назначенным Калифорнийским университетом и распространяется исключительно на Эбботт Molecular Inc. Использование зондов Vysis LSI также охватывается европейскими Патентом № EP 0 444 115 B1, присвоенным Йельским университетом и распространяется исключительно на Эбботт Molecular Inc.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold, ThermoBrite являются зарегистрированными товарными знаками группы компаний различной юрисдикции Abbott.

Термобрайт это торговая марка Ирис Сэмпле Прцессинг, Инк.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2006, 2012 Abbott Laboratories

www.abbottmolecular.com
Март 2012
30-608203/R3

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI ETV6 (TEL)/ RUNX1 (AML1) ES Dual Color Translocation Probe Set

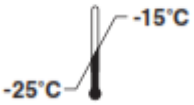
en

REF 08L66-020

30-608218/R3

Vysis LSI ETV6 (TEL)/
RUNX1 (AML1) ES Dual Color
Translocation Probe Set
REF 08L66-020
30-608218/R3

Обозначения

	Законный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20ºC (±5°C)
	Опасность
	Биологический риск
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	См. инструкцию по применению
EC REP	Уполномоченный представитель

Название
Vysis LSI ETV6 (TEL)/RUNX1 (AML1) двухцветная транслокационная проба.
Назначение

ДНК-зонд для проведения флуоресцентной in situ гибридизации используется для выявления транслокации t(12;21) (p13; q22), возникающей в результате слияния генов ETV6/RUNX1.

Краткое описание тестирования

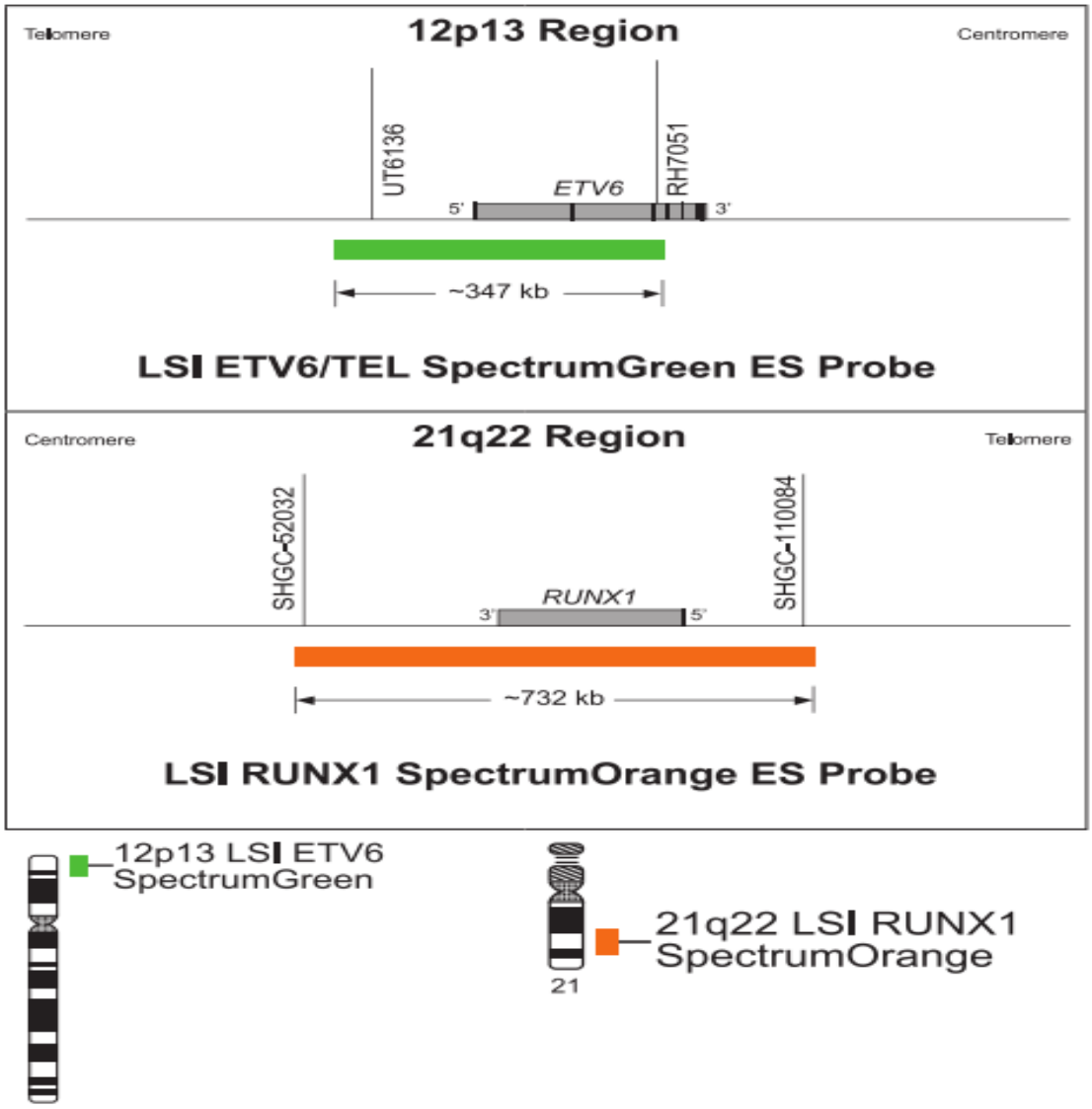
t (12;21) (p13;q22) наиболее частая хромосомная абберация, встречающаяся при остром лимфобластном лейкозе у детей (ОЛЛ). Не детектируемые методами классической цитогенетики, транслокации t(12;21), возникающие в результате слияния 5' конца гена ETV6 (TEL) на хромосоме 12p13 и почти полностью гена RUNX1(AML1), локализованного на хромосоме 21q22, встречаются в 25% случаев острого лимфобластного лейкоза.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis ETV6 (TEL)/RUNX1 (AML1) DF FISH Probe является двухцветной пробой, которая используется во многих исследованиях для выявления транслокации t(12;21), Harrison, et al, Marineau, et al, Lee, et al, Mori, et al. Эта проба также была использована для демонстрации общей делеции ETV6 зонда-мишени, которая не была вовлечена в слияние генов ETV6/RUNX1.

Описание пробы

LSI ETV6 (TEL)/RUNX1 (AML1) ES транслокационная проба с двойным соединением состоит из SpectrumGreen ETV6 пробы и SpectrumOrange RUNX1 пробы. LSI ETV6 проба начинается между экзоном 3 & 5 и продолжается к теломерному участку 12 хромосомы размером 347 kb. LSI RUNX1 проба охватывает весь ген RUNX1 и имеет размер приблизительно 732 kb.

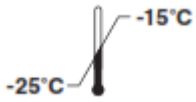


Реагенты

1. Vysis LSI ETV6 (TEL) /RUNX1(AML1) ES Dual Color Translocation Probe Set (Part № 30-191005).
1 пробирка, 20 мкл на пробирку). 450 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА.
2. Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (Part № 30-804826)
(1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC (pH 7,0).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение



Vysis ETV6 (TEL)/RUNX1 (AML1) ES транслокационная проба с двойным соединением необходимо хранить при температуре -20ºC (±5°C), в защищенном от света месте.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD Медицинские реагенты для диагностики in vitro

Предназначен только для диагностики in vitro.

Vysis LSI ETV6 (TEL) SG/RUNX1 (AML1) SO Probe

Условия транспортировки

Транспортировка зонда Vysis ETV6/RUNX1 Dual Fusion FISH Probe Kit осуществляется на сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Меры предосторожности

IVD **Медицинские изделия, предназначенные для диагностики in vitro**

Только для диагностики in vitro

Vysis ETV6 (TEL) SG/RUNX1(AML1) SO Probe

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Эти реагенты или образцы от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.
Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, не надевайте контактные линзы там, где работаете с этими материалами.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорит натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.
• Обеззараживать и утилизировать все потенциально инфекционные материалы в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP, согласно директивам ЕС, является: токсичным (T) и раздражающим (Xi) веществом. Ниже приведены характеристики риска (R) и безопасности (S):



ОПАСНОСТЬ

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P501 Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом.

Паспорта безопасности: важная информация о безопасности, транспортировке и утилизации этих продуктов содержится в паспортах безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (MSDS) для всех предоставленных наборах реагентов доступны по запросу в отделе технического обслуживания Abbott Molecular.

Подготовка реагентов:

ПРИМЕЧАНИЕ: Там, где это необходимо, измерьте pH растворов при комнатной температуре. Используйте pH–метр со стеклянным электродом, если другое не предусмотрено.

20X SSC раствор

Смешайте 132 г 20X SSC и 400 мл очищенной воды. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCI, если это необходимо. Добавьте очищенную воду и доведите объем до 500 мл. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с размером пор 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

2X SSC/0.1% NP-40 Wash Solution
Смешайте 100 мл 20XSSC (pH 5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% Формамид/2X SSC)

Смешайте интенсивно 49 мл формамида, 7 мл 20XSSC (pH 5.3) и 14 мл очищенной воды в сосудах Коплина. Померяйте pH, используя индикаторные полоски, убедитесь, что pH от 7 до 8. Между использованиями, храните от 2°C до 8°C. Утилизируйте по истечении 7 дней.

Растворы этанола (70%, 85%, 100%)

Приготовьте разведения 100% этанола, использую очищенную воду. Между использованиями храните при комнатной температуре. Утилизируйте стоковые растворы по истечению 6 месяцев.

0.4X SSC/0.3% NP-40 Промывочный раствор для быстрой процедуры отмывки
Смешайте интенсивно 20 мл 20XSSC (pH 5.3) с 950 мл очищенной воды. Добавьте 3 мл NP-40. Перемешивайте интенсивно, пока NP-40 полностью не растворится. Померяйте pH и доведите pH до 7.0 до 7.5 с помощью NaOH. Добавьте очищенную воду и доведите финальный объем до 1 л. Перемешайте и пропустите через фильтр с объемом пор 0,45 мкм. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте стоковый раствор спустя 6 месяцев после использования или раньше при его помутнении или загрязнении.

Хранение LSI ДНК-зонда. LSI ДНК-зонд должен храниться при температуре -20ºC (±5°C) в защищенном от света месте.

Деградация: Флуорохромы легко распадаются при воздействии света. Для ограничения распада работайте с растворами и слайдами, содержащими флуорохромы в защищенном от света месте. Выполняйте все шаги, во избежания попадания света, такие как отмывка, инкубация, в темноте.

Примечания по выполнению процедуры: Перед использованием, доведите все реагенты до комнатной температуры, отцентрифугируйте каждый флакон с реагентом в течении 2-3 секунд, использую стандартную микроцентрифугу.

Сбор образцов и пробоподготовка для анализа:
Клетки костного мозга культивируются, собираются, фиксируются и помещаются на слайды согласно стандартным цитогенетическим методикам.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Процедура
Необходимые материалы

Vysis LSI ETV6 (TEL) /RUNX1 (AML1) Dual Color Translocation Probe Set
Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Необходимые, но не поставляемые материалы
Лабораторные реагенты:

- 12 N HCl (для регулирования pH рабочих растворов)
- 1 N NaOH (для регулирования pH рабочих растворов)
- Сосуды Коплина
- Калибровочные термометры
- Пинцет
- Градуированные цилиндры (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Наконечники для пипетора (от 1 до 10 мкл)
- Пипетор (от 1 до 10 мкл)
- pH метр
- Чистые предметные стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вортекс
- Водяная баня (37°C и 72°C)
- Флуоресцентный микроскоп
- Инкубатор на 37°C
- 20X (SSC)
- NP-40
- Формамид, высокоочищенный
- Контркраситель DAPI II
- Горячие слайды

Подготовьте три сосуда Коплина: Налейте 70 мл 100% этанола в первый сосуд; 70 мл 85% этанола в другой, и 70 мл 70% этанола с третий сосуд. Использовать при комнатной температуре. Утилизировать по истечении 7 дней или в случае, если произошло чрезмерное разведение или испарение.

Для получения хороших результатов, убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, описанной в инструкции.

Измерьте температуру растворов внутри сосудов Коплина. Используйте калибровочные термометры, которые рекомендованы. При выполнении гибридизации, объединяющей одновременно зонды CEP и LSI, придерживайтесь общей методики LSI для проверки качества реагента.

Подготовка целевого образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Достаньте сосуды Коплина, содержащие растворы для денатурации, в комнатную температуру. Поместите сосуды на водяную баню при температуре 73±1°C приблизительно на 30 минут перед использованием для достижения нужной температуры растворов.

1. Убедитесь, что температура растворов для денатурации 73±1°C.
2. Погрузите слайды в растворы для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Погрузите не более четырех слайдов в сосуды Коплина одновременно.

3. Дегидратируйте слайды в течении 1 минуты в 70% этаноле, затем 1 минуту в 85% этаноле, и 1 минуту в 100% этаноле.

ПРИМЕЧАНИЕ: Держите слайды в 100% этаноле до тех пор, пока все слайды полностью не высохнут и нанесите смесь зондов.

Подготовка смеси зондов

Добавьте следующие компоненты для каждой исследуемой области в микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре:
7 мкл LSI/WCP Гибридизационный буфер
1 мкл пробы
2 мкл очищенной воды

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации более чем трех проб, каждая из которых мечена разными флуорохромами, добавьте 1 мкл каждой пробы. Добавьте очищенную воду, чтобы довести общий объем пробы и воды до 3 мкл.

4. Центрифугируйте пробирку в течении 3 секунд.
5. Отвортексируйте и отцентрифугируйте снова.
6. Поместите пробирки на водяную баню при 73±1°C на 5 минут.
7. Извлеките пробирку с водяной бани.
8. Поместите пробирки на нагреватель для стекол при температуре от 45 до 50°C пока они не будут готовы для нанесения пробы комплементарной таргентной ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если слайды уже готовы**,** когда проба денатурировала, вы можете нанести пробу незамедлительно к таргентной ДНК.

Гибридизация зонда к таргентному образцу.

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте влажную коробку, поместив влажное полотенце, смоченное в воде, на сторону герметичного контейнера. Поместите в инкубатор при температуре 37°C.

1. Переместите слайды из 100% этанола.
2. Высушите слайды, коснувшись нижнего края слайдов путем промокания и вытирая нижнюю часть слайдов насухо бумажным полотенцем.
3. Поместите слайды на нагреватель для стекол от 45°C до 50°C для испарения остаточного этанола.
4. Нанесите 10 мкл смеси проб к одной таргентной области и незамедлительно накройте покровным стеклом.
5. Заклейте покровное стекло с помощью резинового клея.
6. Опустите слайды в предварительно нагретую увлажненную коробку и поместите в инкубатор при 37°C от 6 до 16 часов.

Промывка слайдов: Процедура быстрой отмывки

Примечание: для образцов, выделенных из парафиновых блоков, замените 2X SSC/0.3% NP-40 промывочный раствор на 0.4X SSC/0.3% NP-40 промывочный раствор.

Подготовка промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0.4X SSC/0.3% NP-40 в сосуды Коплина. Поместите сосуды на водяную баню 73±1°C не менее чем на 30 минут перед использованием. Использовать в течении одного дня, затем утилизируйте.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0.1% NP-40 в сосуды Коплина. Используйте при комнатной температуре. Использовать в течении одного дня, затем утилизируйте.

Примечание: для поддержания необходимой температуры в 0.4X SSC/0.3% NP-40, проводите отмывку 4 слайдов одновременно. Если у Вас меньше 4 слайдов, добавьте пустые слайды, находящиеся при комнатной температуре, чтобы общее количество слайдов составляло не менее 4.

Начните отсчет времени, когда все четыре слайда будут погружены.

1. Удалите покровное стекло с одного слайда и незамедлительно погрузите слайды в 2X SSC/0.1 % NP-40. Агитируйте слайды от 1 до 3 секунд. Удалите слайды после 5 секунд или 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Высушите слайды в темноте.
2. Нанесите 10 мкл контркрасителя DAPI II на исследуемую область и накройте покровным стеклом.

Просмотрите слайды, используя оптимальный набор фильтров для флуоресцентного микроскопа.

Использование фильтров Vysis	**Одновременное возбуждение и эмиссия**
DAPI/Оранжевый	DAPI и SpectrumOrange флуорохромы
DAPI/Зеленый	DAPI и SpectrumGreen флуорохромы
Тройной – Аква, Зеленый, Оранжевый	SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорохромы
Тройной – DAPI, Оранжевый, Зеленый	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорохромы
Четверной – DAPI, Аква, Зеленый, Оранжевый	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen, SpectrumOrange флуорохромы

Хранение: слайды хранятся при -20°C (±5°C) в защищенном от света месте по крайней мере в течении 3 недель после гибридизации**.**

Использование коденатурации: Совместная денатурация позволяет упростить флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) за счет одномоментной денатурации смеси зонда и образца. Для совместной денатурации микропрепарата с образцами, зондами и покровными стеклами помещают на поверхность горячей чашки Петри или на полку сушильного шкафа или термостата, в которых поддерживается температура, необходимая для денатурации. Через 2 – 10 минут микропрепараты извлекают и помещают в термостат, где поддерживается температура, необходимая для гибридизации.

Условия (температура и время) проведения совместной денатурации варьируют в широких пределах, поэтому выбор условий зависит от области применения и вида образца. Параметры, представленные в данном документе, предназначены для системы денатурации/гибридизации Vysis HYBrite. Однако в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

зависимости от вида образца может потребоваться дополнительная оптимизация параметров. Гибридизация с использованием совместной денатурации может отличаться от простой гибридизации, при которой перед нанесением зонда происходит денатурация и дегидратация образца.

Подготовка микропрепарата к совместной денатурации

1. При температуре окружающей среды в пробирку для микроцентрифуги
добавьте:
7 мкл гибридизационного буфера LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: для одновременной гибридизации сразу трех зондов, меченных разными флуорофорами, добавьте по 1 мкл каждого зонда. Для получения раствора объемом 3 мкл добавьте нужное количество дистиллированной воды.

1. Центрифугируйте пробирку в течение 1 – 3 секунд.
2. Отвортексируйте и отцентрифугируйте снова.
3. На микропрепарат нанесите 10 мкл смеси зонда и сразу же накройте покровным стеклом.
4. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло.

Определение параметров для системы денатурации/гибридизации

Инструкции, представленные ниже, предназначены для системы денатурации/гибридизации HYBrite. Обратитесь пожалуйста к руководству пользователя HYBrite для получения дополнительной информации. Так же может быть использована система денатурации/гибридизации ThermoBrite, которая по термическим характеристикам сопоставима с системой HYBrite. Принимая во внимание тот факт, что работа системы ThermoBrite находится
под строгим контролем (± 1°C), может понадобиться коррекция условий денатурации и гибридизации. Более подробная информация представлена в
разделе, посвященном устранению проблем.

1. Для культивируемых лимфоцитов и клеток костного мозга установите температуру размораживания на 73°C, время – на 1 минуту; для образцов, залитых в парафин, - на 73°C и 5 минут.
2. Температуру гибридизации установите на 37°C, время – на 4 часа – вся ночь.
3. После завершения гибридизации промойте микропрепараты с помощью процедуры быстрого промывания.
4. Микропрепараты высушите на воздухе в темноте.
5. На исследуемый участок нанесите 10 мкл контрастирующего красителя и накройте покровным стеклом.

Контроль качества

В качестве положительных и отрицательных контролей используются образцы клеток пациента.
Интерпретация результатов FISH должна проводиться с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также с учетом других клинических и диагностических данных.
Для каждой лаборатории должны быть разработаны критерии проверки изменений при проведении теста.

Ожидаемые результаты

Предполагается, что гибридизация нормальных ядер с помощью зонда LSI ETV6/RUNX1 приведет к образованию двух сигналов – два оранжевых и два зеленых сигнала (2O2G). В ядрах, в которых произошла транслокация t(12;21) – ETV6/RUNX1 обнаруживается один зеленый (нормальная аллель гена ETV6) и один большой оранжевый (нормальная аллель гена RUNX1) сигналы, один маленький оранжевый (RUNX1 на der 12) и, может также наблюдаться слияние оранжевого/зеленого сигналов (2O1G1F). Во многих случаях, зеленый сигнал от аллели (ETV6), не вовлеченной в транслокацию, может отсутствовать из-за делеции (2O0G1F). Другие сигналы могут наблюдаться в некоторых абнормальных образцах. Интерпретация результатов FISH может быть проведена, используя соответствующие контроли и аналитические методы, а также принимая во внимание другие клинические и диагностические исследования.

Устранение проблем при анализе с использованием совместной денатурации

Морфология хромосом при гибридизации с использованием совместной денатурации может отличаться от таковой в образце, который перед нанесением зонда подвергается денатурации и дегидратации.

Проблема	**Решение**
Перекрестная Гибридизация	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одни из следующих советов:
	Увеличьте температуру раствора 0.4X SSC/0,3% NP-40 на 2°C
	При необходимости повышайте температуру до появления сигнала удовлетворительной интенсивности.
	Уменьшите температуру размораживания на 2°C.
Зонд выглядит тусклым	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов:
	Увеличьте продолжительность гибридизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	□ Увеличьте температуру размораживания. При необходимости повышайте температуру до появления приемлемой морфологии. □ Промойте микропрепарат раствором 0.4X SSC/0,3% NP40 при температуре 70-73°C.
Диффузный сигнал (образование «спеклструктур»)	Повторите анализ, воспользовавшись одним из следующих советов: □ Уменьшите температуру размораживания на 2°C. □ Уменьшите продолжительность размораживания. **ПРИМЕЧАНИЕ:** при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. □ Промойте раствором 0.4X SSC/0,3 % NP-40 при температуре 73 - 76°C.
Плохая морфология в метафазе	Повторите анализ с новым образцом, воспользовавшись одним из следующих советов: □ Уменьшите температуру размораживания на 2°C. □ Уменьшите продолжительность размораживания. ПРИМЕЧАНИЕ: при необходимости снижайте температуру или уменьшайте продолжительность размораживания до появления сигнала удовлетворительной интенсивности. □ Проведите предварительную обработку микропрепаратов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Опустите микропрепарат в раствор на 1 минуту. 3. Опустите микропрепарат в дистиллированную воду несколько раз. 4. Высушите микропрепараты. Для этого выдерживайте их по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. 5. Высушите микропрепараты на воздухе и приступите к подготовке к совместной денатурации. □ При сохранении неудовлетворительной морфологии используйте HYBrite по-другому: 1. Приготовьте 280 мкл денатурационного раствора 70% формальдегида/2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл дистиллированной воды). 2. Запустите программу поддержания температуры в системе HYBrite на уровне 73°C. 3. На каждый исследуемый участок нанесите по 10 мкл денатурационного раствора и накройте покровным стеклом. 4. Когда температуре в системе HYBrite достигнет 73°C, поместите микропрепараты на поверхность нагрева. Закройте крышку. 5. Извлеките микропрепараты через 3 минуты. 6. Удалите покровное стекло. 7. Выполните дегидратацию как при анализе с использованием обычной денатурации.

Устранение проблем, возникающих при визуализации результатов анализа

Проблема	Вероятная причина	Решение
«Искаженная» морфология хромосомы»	Микропрепараты высушены слишком быстро.	Увеличьте температуру водяной бани, которая используется при подготовке образцов, что приведет к увеличению влажности. Уменьшите температуру подогревателя микропрепаратов во время подготовки образца. Увеличьте продолжительность высушивания (как минимум, сушить всю ночь) при температуре окружающей среды, а затем выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток. Микропрепараты не следует сушить при высокой температуре.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Произошла чрезмерная денатурация образца.	Убедитесь, что денатурационный раствор приготовлен в соответствии с инструкцией. Прежде чем погружать микропрепараты убедитесь в том, что температура денатурационного раствора составляет 73±1°C; уменьшите температуру до 72°C. Уменьшите продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 1–3 минут.
	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты недостаточно высушены.	Теплые (45- 50°C) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Слишком свежие микропрепараты перед денатурацией.	Выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды не менее суток.
Фоновые помехи на микропрепаратах	Использованы недостаточно чистые предметные стекла.	Перед подготовкой образцов погрузите предметные стекла в этанол и вытрите насухо бумагой.
	В препарате присутствуют фрагменты клеток.	Промойте сгусток клеток свежим фиксатором три раза и повторно нанесите образец на предметное стекло.
	Метафазные пластинки постарели при нагревании или содержат цитоплазму.	Увеличьте продолжительность выдерживания микропрепарата в денатурационном растворе до 10 минут.
	Микропрепарат плохо промыт после гибридизации.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь в том, что промывочные растворы имеют должный pH и температуру. Удалите покровное стекло. Повторите процедуру промывания.
	Промывочные растворы использовались после истечения срока хранения или нарушены условия хранения.	Убедитесь в том, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при температуре 4°C. Срок хранения –7 дней. Срок хранения остальных промывочных растворов –1 день. Убедитесь в том, что pH промывочных растворов формамида составляет 7.0–8.0.
	Использованы широкополосные фильтры, пропускающие много света	Используйте фильтры с более узкой полосой пропускания или с несколькими полосами пропускания.
Сигнал слабый или отсутствует	Пробы денатурированы неправильно.	Прежде чем опускать микропрепараты, убедитесь в том, что температура денатурационного раствора в сосуде Коплина, составляет 73±1°C. Увеличьте температуру денатурационного раствора до 74°C. Увеличьте продолжительность погружения микропрепаратов в денатурационный раствор до 2–4 минут.
	Микропрепарат подготовлен для FISH неправильно.	Свяжитесь с отделом технического обслуживания компании Abbott Molecular и получите протоколы по подготовке образца для FISH.
	Нарушены правила выдержки микропрепаратов.	Перед FISH выдерживайте микропрепараты при температуре окружающей среды в течение суток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Перед погружением в денатурационный раствор микропрепараты высушены недостаточно.	Теплые (45- 50°C) микропрепараты выдерживайте по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле.
	Образец обработан трипсином и окрашен красителем Гимзы.	При использовании подобных образцов для FISH может возникнуть необходимость изменения протоколов бэндинга и/или гибридизации. За более подробной информацией о бэндинге перед FISH обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular или сделайте новые микропрепараты.
	Зонд не добавлен	Приготовьте новую смесь зонда. Зонд должен полностью оттаять. Встряхните или смешайте с помощью пипетки; центрифугируйте. С помощью пипетки медленно нанесите зонд.
	Перед использованием зонд, гибридизационный буфер или смесь зонда смешаны плохо.	Встряхните или смешайте реагенты с помощью пипетки; центрифугируйте.
	Перед гибридизацией зонды разведены неправильно.	Для смеси зонда используйте соответствующие объемы ингредиентов (7 мкл гибридизационного буфера:1 мкл зонда: 2 мкл дистиллированной воды). Убедитесь в том, что пипетка калибрована. Перед использованием гибридизационный буфер должен полностью оттаять и приобрести температуру окружающей среды. Капайте медленно.
	Зонд денатурирован недостаточно.	Убедитесь в то, что температура водяной бани для денатурации смеси зонда составляет 73±1°C.
	ПРИМЕЧАНИЕ: не используйте зонды, поставляемые в гибридизационном буфере, и денатурированные зонды.	Выполните денатурацию смеси зонда в течение 5 минут.
Сигнал слабый или отсутствует	Зонд нанесен на исследуемый образец через некоторое время после денатурации.	Зонд необходимо нанести на микропрепараты непосредственно после его извлечения из 100% этанола. Перед нанесением убедитесь в том, что этанол полностью испарился. Извлеките пробирку со смесью зонда из водяной бани (73±1°C) и сразу же поместите ее подогревательный столик (45–50°C). Во время нанесения зонда микропрепарат должен находиться на подогревательном столике. Обрабатывайте такое количество препаратов, какое Вы можете; соблюдайте температурный и временной режимы.
	Смесь зонда высохла на микропрепарате.	После нанесения смеси зонда микропрепарат следует сразу накрыть покровным стеклом. При промывании снимите покровное стекло с одного микропрепарата и сразу опустите его в промывочный раствор, до того, как Вы снимете другое покровное стекло.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Во время гибридизации под покровное стекло попали пузырьки воздуха.	Поместите покровное стекло на микропрепарат сразу после нанесения смеси зонда. Микропрепарат положите на писчую бумагу покровным стеклом вниз и аккуратно выдавите пузырьки воздуха.
	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в правильности температурного и временного режимов. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. С помощью резинового клея закрепите покровное стекло. Увеличьте продолжительность гибридизации.
	Неподходящие условия промывания или промывочные растворы низкого качества.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены согласно инструкции. Убедитесь в том, что температура промывочных растворов подходит для выполнения процедуры промывания. Убедитесь в правильности калибровки термометров и pH-метров. Перед погружением микропрепаратов в промывочный раствор удалите покровные стекла.
	Несоблюдение условий хранения зондов или микропрепаратов.	Неразведенный зонд следует хранить при температуре не выше -20°C и беречь от света. Высушенные негибридизованные микропрепараты можно хранить при температуре не выше -20°C (в течение длительного времени) или при температуре окружающей среды (в течение короткого периода времени). Гибридизованные микропрепараты следует хранить при температуре не выше -20°C в течение 3 недель.
Сигнал слабый или отсутствует	Неправильная контрастирующая окраска. Контрастирующая окраска слишком яркая.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Для визуализации гибридизации использован неподходящий фильтр.	Фильтр с несколькими полосами пропускания дает меньше света, чем фильтр с одной полосой пропускания, поэтому сигналы зонда могут показаться более слабыми. Для визуализации флюорофора зонда используйте правильный фильтр. Для получения более подробной информации обратитесь в отдел технического обслуживания компании Abbott Molecular.
	Форма микроскопа или объективы не подходят для визуализации результатов FISH или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с компанией-производителем микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Неправильное разведение зонда; как правило, избыток зонда.	Убедитесь в том, что смесь зонда приготовлена в соответствии с инструкцией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неподходящие условия гибридизации.	Убедитесь в том, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь в том, что к смеси зонда добавлено нужное количество гибридизационного буфера.
	Низкая температура промывочных растворов.	Поддерживайте температуру промывочных растворов на должном уровне, погружая в один сосуд Коплина не более 4 микропрепаратов одновременно и проверяя температуру перед погружением каждой следующей партии.
	Слишком жидкий промывочный раствор.	Убедитесь в том, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. **ПРИМЕЧАНИЕ:** чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40 и тем выше вязкость раствора.
Яркое или тусклое контрастирующее окрашивание	Контрастирующее окрашивание выглядит тусклым: микропрепараты не обезвожены перед окрашиванием или в красителе присутствуют капли масла.	Удалите покровное стекло. Погрузите микропрепараты в раствор 2XSSC/0,1% NP-40 на 5 минут при температуре окружающей среды. Выдерживайте микропрепараты по 1 минуте по очереди в 70% и 85% растворах этанола и 100% этаноле. Высушите на воздухе и выполните контрастирующую окраску заново.
	Неверная концентрация контрастирующего красителя.	Если контрастирующее окрашивание выглядит слишком ярким, разведите краситель в растворе, который препятствует выцветанию (список №06J29-010).
	ПРИМЕЧАНИЕ: Концентрация контрастирующего красителя DAPI I в 8 раз выше концентрации красителя DAPI II.	
	Контрастирующий краситель старый или долго находился на свету.	Контрастирующий краситель следует хранить при температуре не выше -20°C и беречь от света. Убедитесь в том, что краситель не просрочен.

Библиография

1. Romana SP, Coniat ML, Berger R. t(12;21): A New Reccurent Translocation in Acute Lymphoblastic in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;9:186-191.
2. Romana SP, Mauchauffe M, Le Coniat M, et al. The t(12;21) of Acute Lymphoblastic Leukemia Results in a tel-AML1 Gene Fusion. *Blood* 1995; 85(12):3662-3670.
3. Harrison CJ, Moorman AV, Barber KE, et al. Interphase Molecular Cytogenetics Screening for Chromosomal Abnormalities of Prognostic Significance in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia: A UK Cancer Cytogenetics Group Study. *Br J Haematol* 2005;129:520-530.
4. Martineau M, Jalali GR, Barber KE, et al. ETV6/RUNX/Fursion at Diagnosis and Relapse: Some Prognosis Indications. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;43:54-71.
5. Lee DS, Kim YR, Cho HK, et al. The presence of TEL/AML1 rearrangement and cryptic deletion of the TEL gene in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL*). Cancer Genet Cytogenet* 2005;162:176-178.
6. Mori H, Colman SM, Xiao Z, et al. Chromosome Translocations and Covert Leukemic Clones and Generated During Normal Fetal Development. PNAS 2002;99(12):8242-8247.
7. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. Genet Med. 2006;8(1):16-23.
8. US Department of Health and Human Service. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Fifth Edition.* Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
9. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administrations, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline – Third Edition.* CLSI Documents GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
11. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual, Geneva: Word Health Organization, 2004.

Техническая помощь

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в техническую службу компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) по телефону +496122-580 или заходите на http:\\www.abbottmolecular.com.

Vysis ETV6 (TEL)/RUNX1 (AML1) ES Двухцветная транслокационная проба и другие многоцветные ДНК-пробы защищены патентами США 5,663,319 и 5,491,224 принадлежащими Abbott Molecular. Флуоресцентные зонды Vysis LSI защищены патентами США RE40,494, 6,596,479, 7,115,709, 5,756,696, 6,280,929 и 6,607,877, дающего компании Abbott Molecular Inc. эксклюзивное право, приписанное Калифорнийскому университету. Методы детекции множественных сигналов одновременно в результате гибридизации защищены патентами США 6,203,977 дающего компании Abbott Molecular Inc. эксклюзивное право, приписанное Йельскому университету.

SpectrumGreen, SpectrumRed, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold, HYBrite, CEP, LSI, WCP и Vysis являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт Молекуляр Инк. в различных юрисдикциях.

Термобрайт это торговая марка Ирис Сэмпле Прцессинг, Инк.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2007, 2011 Abbott Laboratories

www.abbottmolecular.com
February 2012
30-608218/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis EGR1 FISH Probe Kit–
SC (Specimen Characterization)

en

REF 04N37-001

30-608500/R3

Vysis EGR1 FISH Probe Kit–
SC (Specimen Characterization)

REF 04N37-001
30-608500/R3

ПРИМЕЧАНИЕ: Изменения выделены

Используемые символы

REF	Номер списка
LOT	Номер лота
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
GTIN	Глобальный номер товара
	Использовать до (срок годности)
	Температурный режим
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	Биологический риск
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам
	См. инструкцию по применению
Σ	Количество достаточно для <n> тестов
	Официальный производитель
EC REP	Авторизованный представитель в Европейском сообществе

Обслуживание клиентов: 1-800-553-7042

МЕЖДУНАРОДНАЯ СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ: ПОЗВОНИТЕ ВАШЕМУ РЕГИОНАЛЬНОМУ ПРЕДСТАВИТЕЛЮ.

НАЗВАНИЕ

Набор Vysis EGR1 FISH Probe Kit (Характеристика образца) состоит из пробы Vysis LSI EGR1 SpectrumOrange/D5S23, D5S721 SpectrumGreen пробы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Vysis EGR1 FISH Probe Kit (Характеристика образца) детектирует мишень LSI EGR1 FISH Probe на хромосоме 5q в образцах костного мозга. Набор Vysis EGR1 FISH Probe Kit (Характеристика образца) результаты анализа характеризуют образцы костного мозга у пациентов с острым миелоидным лейкозом и миелодиспластическим синдромом. Результаты анализа используются для интерпретации квалифицированным патологом или цитогенетиком.

Данный метод не предназначен для использования в условиях повышенного риска таких как выбор терапии, прогнозирование терапевтического ответа или скрининг заболевания. Использование этого продукта для диагностики, мониторинга или оценки риска не было опубликовано.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Абберации 5 хромосомы являются наиболее частыми абберациями при миелодиспластическом синдроме и остром миелоидном лейкозе.[1] Обычно удаляемый сегмент на хромосоме 5q31 идентифицируется как и ген ответа раннего роста (EGR1) среди генов-кандидатов в этом сегменте[2]. Проведенные исследования предполагают, что гаплоидная недостаточность гена EGR1 может играть роль в развитии лейкоза[3]. Специфичная для локуса Vysis (LSI) проба EGR1 SpectrumOrange/D5S23, D5S721 SpectrumGreen, компоненты набора Vysis EGR1 FISH Probe были использованы при проведении нескольких исследований для детекции делеции гена EGR1[4-8]. Исследования, сравнивающие пробу Vysis LSI EGR1 SpectrumOrange/D5S23, D5S721 SpectrumGreen в метафазной цитогенетике для детекции потери длинного плеча на 5 хромосоме, как в случаях острого миелоидного лейкоза так и в случаях миелодиспластического синдрома, завершились, в то время как цитогенетики детектировали большинство случаев делеции длинного плеча 5 хромосомы методом флуоресцентной in situ гибридизации (FISH), что было особенно полезно в случаях с субоптимальным ростом и EGFR1 FISH методом обнаруживает делецию длинного плеча 5 хромосомы в широком разнообразии миелоидных новооброзований[8]. Исследования, изучающие также моносомию 5 хромосомы, идентифицируемую методом G-бэндига при кариотипировании, действительно в 28 случаях острого миелоидного лейкоза и миелодисплатического синдрома, выявили делецию длинного плеча 5 хромосомы в 24 случаях и моносомию 5 хромосомы только в 3 случаях. В данном исследовании был сделан вывод, что детекция гена EGR1 методом FISH с использованием пробы Vysis LSI EGR1 SpectrumOrange/D5S23, D5S721 SpectrumGreen, может дополнять обычную цитогенетику и улучшать определение кариотипа[1]. Исследование, проведенное в рамках Клинических исследований Восточной онкологической группы показало, что детекция методом FISH специфических абберраций с использованием наборов Vysis FISH, включающие пробы Vysis LSI EGR1 SpectrumOrange/D5S23, D5S721 SpectrumGreen, сильно коррелировала с цитогенетическим открытием этих же абберраций у пациентов с острым миелоидным лейкозом[4].

Набор Vysis EGR1 FISH Probe Kit - с использованием технологии FISH DNA предназначен для детекции мишени на гене LSI EGR1 и проба LSI D5S23, D5S721 используется как контроль.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ПРОЦЕДУРЫ

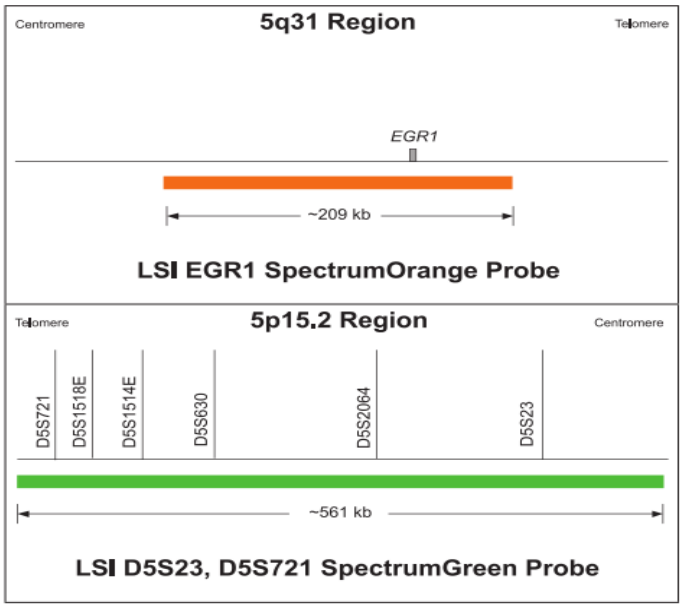
Описание ДНК пробы

Vysis LSI EGR1 SpectrumOrange/D5S23, D5S721 SpectrumGreen проба

Меченая флуорохромом проба LSI EGR1, размером приблизительно 209 kb (chr:137654208-137862738; Февраль 2009; Assembly; UCSC Human Genome Browser[9]) локализуется на хромосоме 5q31 и включает в себя полностью ген EGR1.

Меченая флуорохромом проба LSI D5S23, D5S721, размером приблизительно 561 kb (chr5:9397109-9958407; Февраль 2009; Assembly; UCSC Human Genome Browser[9]) локализуется на хромосоме 5p15.2.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ РЕАГЕНТОВ

Vysis LSI/WCP Гибридизационный буфер

Vysis LSI / WCP Гибридизационный буфер состоит из сульфата декстрана, формамида и стандартного цитрат натрия (SSC), который используется для инициирования быстрой специфической гибридизации.

Контркраситель DAPI II

DAPI II Counterterstain содержит DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол•2HCl) (ДНК-специфический флуорофор) и 1,4-фенилендиамин (антифад соединения, используемое для уменьшения тенденции флуорофоров в уменьшении интенсивности) в глицероле и забуференной фосфатом физиологической смеси.

NP-40

NP-40 представляет собой неионное поверхностно-активное вещество, которое используется в водном промывочном растворе после гибридизации.

20X Стандартная соль цитрата натрия (SSC)

20X SSC - это соль, состоящая из хлорида натрия и цитрата натрия. Она используется для приготовления 20X раствора SSC и последующих разведений при приготовлении моющих растворов.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Метод FISH - это уникальная технология, которая позволяет визуализировать специфические сиквенсовые последовательности внутри клеточной популяции. В частности, FISH-метод включает в себя точный отжиг одноцепочечной, меченой флуорохромом ДНК-пробы, комплементарной сиквенсовой мишени. Гибридизация зонда с клеточной ДНК видима путем прямой детекции с использованием флуоресцентного микроскопа. Интерпритация результатов FISH проводится с использованием соответствующих контролей и аналитических методов, а также принимая во внимание рассмотрение других данных клинических и диагностических исследований.

Клетки костного мозга наносятся на предметные стекла микроскопа с использованием стандартных цитогенетических процедур. Полученный образец ДНК денатурируется до одноцепочечной что впоследствии позволяет гибридизоваться с пробами LSI EGR1 и LSI D5S23, D5S721. После гибридизации несвязавшаяся проба удаляется путем серии отмывок, и ядра прокрашиваются конткрасителем DAPI, ДНК-специфическое окрашивание, которое светится голубым цветом. Гибридизация проб LSI EGR1 и LSI D5S23, D5S721 визуализируется с использованием флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами возбуждения и эмиссии, позволяющими визуализировать оранжевые и зеленые флуоресцентные сигналы. В клетке с типичным количеством копий LSI EGR1 и LSI D5S23, D5S721 для пробы-мишени, ожидается 2 оранжевых сигнала (LSI EGR1) и два зеленых сигнала (LSI D5S23, D5S721).

В клетках с делецией длинного плеча 5 хромосомы ожидается один оранжевый сигнал (LSI EGR1) и два зеленых сигнала (LSI D5S23, D5S721).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Подсчет оранжевых сигналов EGR1 и зеленых сигналов LSI D5S23, D5S721 обеспечивается механизмом для определения абсолютного количества копий к мишени и присутствия атипичных интересующих сигналов.

РЕАГЕНТЫ

Необходимые материалы

Набор содержит 5 реагентов, достаточных для проведения 20 исследований. Анализ определяется как одна 22 мм×22 мм LSI EGR1/D5S23, D5S721 ДНК-проба гибридизационная область.

Vysis LSI EGR1 SpectrumOrange/D5S23, D5S721 SpectrumGreen проба

Номер партии	30-804813
Количество	1 флакон, 20 мкл на флакон (100 и 300 нг/мкл)
Хранение	-20°C (±5°C) в защищенном от света месте
Состав	Меченые флуорохромом ДНК-пробы SpectrumOrange и SpectrumGreen

Vysis LSI/WCP Гибридизационный буфер

Номер партии	30-804813
Количество	1 флакон, 150 мкл на флакон
Хранение	-20°C (±5°C)
Состав	Сульфат декстрана, формамид, и SSC

Контркраситель DAPI II

Номер партии	30-804811
Количество	1 флакон, 600 мкл на флакон (125 нг/мл)
Хранение	-20°C (±5°C) в защищенном от света месте
Состав	DAPI (4 ', 6-диамидино-2-фенилиндол • 2HCl) в фенилендиамин дигидрохлорид, глицерин и буфер

NP-40

Номер партии	30-804810
Количество	2 флакона, 2000 мкл на флакон
Хранение	-25°C до 30°C
Состав	Хлорид натрия и цитрат натрия

ИНСТРУКЦИЯ ПО ХРАНЕНИЮ И ОБРАЩЕНИЮ С РЕАГЕНТАМИ



Vysis EGR1 FISH Probe Kit –SC должен храниться при -20°C (±5°C) в защищенном от света месте, если не используется.



NP-40 и SSC соль должны храниться отдельно в защищенном от света месте.

- Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики

Внимание:

- Результаты анализа предназначены для интерпретации только квалифицированным патологом или цитогенетиком
- Vysis EGR1 Probe Kit – SC проба не предназначена для использования в условиях повышенного риска при выборе терапии, прогнозировании терапевтического ответа или скрининга заболевания.
- Использование данного продукта для диагностики, мониторинга или оценки риска не было установлено.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

**ВНИМАНИЕ:** Федеральный закон ограничивает продажу этого устройства приказом врача или другого практикующего лица, лицензированного в соответствии с законом государства, в котором он практикуется, использовать или заказать использование данного устройства.

Меры безопасности
Vysis LSI EGR1 SpectrumOrange/D5S23, D5S721 SpectrumGreen Probes

**Внимание:** Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.

Дезактивации и утилизации всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид.

**ОПАСНОСТЬ**

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

NP-40

**ОПАСНОСТЬ**

Определяющие опасность компоненты маркировки: Полиэтиленгликоль октилфениловый эфир

H302	Опасно при проглатывании
H315	Может вызвать повреждение кожи
H318	Вызывает повреждения глаз
H411	Вызывает вредные воздействие для водных организмов с долгосрочными последствиями
P280	Надевайте защитные перчатки, защитную одежду, защиту для глаз
P264	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P273	Избегайте попадания в окружающую среду.
P305+	При попадании в глаза: Тщательно промойте водой в течении нескольких минут.
P351+	Снимите контактные линзы, если они есть и продолжайте промывать.
P338	При попадании на кожу: Обратитесь за медицинской помощью/внимание
P301+P312	При проглатывании: Позвоните в центр токсикологии или врачу при плохом самочувствии

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P302+P352	При попадании на кожу: Тщательно промойте водой.
P332+P313	При попадании на кожу: Обратитесь за медицинской помощью/внимание
P330	Прополощите рот
P362	Снимите загрязненную одежду и вымойте ее перед повторным использованием
P501	Материалы или контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом.

ПАСПОРТА БЕЗОПАСНОСТИ: Важная информация по безопасности, хранению, транспортировке и утилизации содержится в Паспортах Безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (MSDS) для всех реагентов, представленных в комплекте, доступны по запросу от Службы Технической поддержки Abbott Molecular.

Меры предосторожности при использовании:

- Vysis EGR1 FISH Probe Kit – SC может использоваться только с образцами, которые были обработаны и хранятся в соответствии с инструкцией внутри упаковки.
- Не использовать Vysis EGR1 FISH Probe Kit –SC по истечению срока годности, использовать до указанного срока.
- При выполнении методики следуйте указаниям инструкций внутри упаковки. Несоблюдение инструкций внутри упаковки могут привести к ошибочным результатам теста.

Лабораторные меры предосторожности

- Все биологические образцы должны рассматриваться как потенциально опасные инфекционные агенты. Поскольку зачастую невозможно знать, какой из агентов является потенциально опасным, все биологические образцы должны быть обработаны с соблюдением универсальных мер предосторожности.
- Следует избегать взаимодействия образцов с кислотами, сильными основаниями, или действию высоких температур. Такие условия могут привести к разрушению ДНК и к неправильным результатам FISH исследования.
- Невыполнение всех процедур денатурации, гибридизации и детекции могут привести к неприемлемым или ошибочным результатам.
- Конткраситель DAPI II содержит DAPI и 1,4-фенилендиамин.
- DAPI является возможным мутагеном, основанным на положительных генотоксических эффектах. Избегайте вдыхания, проглатывания или контакта с кожей. Обратитесь к паспортам безопасности для конкретных рекомендаций.
- Флуорофоры легко распадаются под действием света. Для предотвращения этого распада, храните слайды и пробы в темноте, и обработка всех слайдов и наборов зондов должна осуществляться в защищенном от света месте. Выполните все шаги, которые не требуют света (периоды инкубации, отмывки и т.д.) в темноте или при минимальном освещении.
- Vysis EGR1 FISH Probe Kit –SC содержит формамид, являющийся тератогеном. Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
- Калибровочные термометры предназначены для измерения температуры растворов, водяных бань и инкубаторов.
- Все опасные материалы должны быть утилизированы в соответствии с правилами утилизации опасных веществ.
- Перед использованием пробы Vysis EGR1 FISH Probe Ki t- SC рекомендуется проверить верхний контрольный предел.

АНАЛИЗ

Необходимые материалы

- Vysis EGR1 FISH Probe Kit – SC (Каталожный номер – 04N37-001)

Необходимые, но не поставляемые материалы

Лабораторные реагенты:

- Имерсионное масло для флуоресцентной микроскопии
- 100% этанол. Хранить при комнатной температуре
- Очищенная вода
- Клей
- 12 NHCl
- 1 N NaOH

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Лабораторное оборудование:

- Чистые силанизированные или положительно заряженные предметные стекла
- Покровные стекла 22 мм x 22 мм
- Пипеттор (1 – 10 мкл) и стерильные наконечники
- Таймер
- Микроцентрифуга
- Градуированные цилиндры (от 100 мл до 1000 мл)
- Водяная баня (70°C to 80 C)
- Водяная баня (37°C)
- Пинцет
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Одноразовые наконечники (от 5 мл до 20 мл)
- Сосуды Коплина/рекомендуемый тип: вертикальный сосуд
- Флуоресцентные микроскопы с рекомендуемыми фильтрами
- Калибровочные термометры
- Слайды для микроскопа в коробке с крышкой осушителем внутри
- Магнитная мешалка
- pH метр
- Вортекс
- Фильтры 0,45 μm
- Нагреватель для слайдов (54 до 58°C)
- ThermoBrite
- Карты влажности для ThermoBrite
- Сушильная камера или вытяжной шкаф
- Микроцентрифужные пробирки
- Фиксатор метанол/уксусная кислота
- Фазово-контрастный микроскоп

Микроскоп и дополнительные устройства

Микроскоп: для визуализации результатов гибридизации требуется флуоресцентный микроскоп с освещением объекта сверху. При наличии флуоресцентного микроскопа необходимо убедиться в том, что он сможет обеспечить оптимальную визуализацию микропрепаратов с флуоресцентной гибридизацией in situ. Обычные красители для ДНК, например, DAPI, пропидиум йодид и хинакрин могут не подойти для FISH.

Рекомендуется периодически приглашать представителя технического отдела фирмы-производителя микроскопа для очистки и проверки его работы, особенно для регулировки ртутной лампы.

Возбуждающий источник света**:** В качестве источника возбуждающего света рекомендуется ртутная лампа на 100 ватт или другая лампа аналогичной интенсивности и спектральным выходом. Технический представитель производителя должен произвести консультацию, для того, чтобы убедиться, что система флуоресцентного освещения подходит для просмотра образцов для анализа FISH. Посчитайте количество часов использования лампы и замените лампу, если время превышает расчетное. Убедитесь, что лампа выровнена, если это необходимо.

Объективы Используйте масляные иммерсионные флуоресцентные объективы с числовой апертурой ≥ 0,75 при использовании микроскопа с ртутной лампой в 100 ватт или другую лампу с похожей интенсивностью и спектральным выходом. Для сканирования образцов выбранных регионов для подсчета подходит объектив с 40-кратным увеличение и окуляры с 10-кратным увеличением. Для подсчета FISH сигналов, удовлетворительные сигналы могут быть получены с помощью 60/63X или 100X масляных иммерсионных объективов ахроматического типа.

Иммерсионное масло Иммерсионное масло, используемое в масляных иммерсионных объективах, должно быть пригодным для низкой аутофлуоресценции и, особенно, для использования в флуоресцентной микроскопии.

Фильтры Гибридизация пробы Vysis LSI EGR1 SpectrumOrange/D5S23, D5S721 Spectrum/Green к регионам-мишеням ДНК характеризуется оранжевой и зеленой флуоресценцией соответственно. ДНК, которая не гибридизуется с пробами будет флуоресцировать голубым цветом как результат окраски контркрасителем DAPI II.

Рекомендуемые фильтры для использования с зондами Vysis EGR1 FISH Probe Kit – SC - тройной фильтр - DAPI, Зеленый и Оранжевый фильтры; двойной фильтр – Зеленый/Оранжевый, Одиночный фильтр – Зеленый фильтр и Одиночный Оранжевый фильтр или аналоги.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОТОКОЛ ТЕСТА
До подготовки образцов см. раздел данной инструкции «Предупреждение и меры предосторожности».

Приготовление рабочих растворов

Растворы спиртов (70%, 85%, и 100%)
Приготовьте разведения спиртов 70% и 85% этанола, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните подготовленные растворы при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Удалите стоковые растворы после 6 месяцев или раньше, если раствор окажется мутным и загрязненным. Растворы в сосудах Коплина можно использовать в течении недели, если не происходит испарение или раствор не становится чрезмерно разбавленным из-за многократного использования.

20X SCC Раствор
Растворите 66 г 20X SCC соли используя 200 мл очищенной воды в подходящем сосуде. Имерьте pH при комнатной температуре с использованием pH метра и доведите pH до 5.3, используя 12 N HCl, при необходимости. Перенесите раствор в градуированный цилиндр и добавьте очищенной воды, пока финальный объем не станет 250 мл. Перемешайте и отфильтруйте приготовленный раствор через фильтры с диаметром пор 0.45 мкм. Храните подготовленный стоковый раствор при комнатной температуре. Удалите стоковый раствор после 6 месяцев или раньше, если раствор окажется мутным или загрязненным.

2X SCC Раствор
Тщательно перемешайте 100 мл 20X SSC с 850 мл очищенной воды в подходящем сосуде. Измерьте pH при комнатной температуре с использованием pH метра, pH должна быть 7.0±0.2. При необходимости отрегулируйте pH, используя 1N NaOH. Добавьте очищенной воды, чтобы довести финальный объем раствора до 1 л. Перемешайте и отфильтруйте приготовленный раствор через фильтры с диаметром пор 0.45 мкм. Храните приготовленный стоковый раствор при комнатной температуре. Удалите стоковые растворы после 6 месяцев или раньше, если раствор окажется мутным и загрязненным.

0.4X SSC/0.3% NP-40 Промывочный раствор
Смешайте интенсивно 20 мл 20XSSC с 950 мл очищенной воды в подходящем сосуде. Добавьте 3 мл NP-40. Перемешивайте интенсивно, пока NP-40 полностью не раствориться. Померяйте pH и доведите pH до 7.0 до 7.5 с помощью 1N NaOH. Добавьте очищенную воду и доведите финальный объем до 1 л. Перемешайте и пропустите через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Хранить при комнатной температуре. Утилизируйте стоковый раствор спустя 6 месяцев после использования или раньше при его помутнении или загрязнении. Утилизируйте использованные для анализа растворы в конце каждого дня.

2X SCC/0.1% NP-40 Промывочный раствор
Используя подходящие сосуды, тщательно перемешайте 100 мл раствора SSC с 850 мл очищенной воды. Добавьте 1 мл NP-40, перемешивайте интенсивно, пока NP-40 полностью не раствориться. Измерьте pH при комнатной температуре, с использованием pH метра, отрегулируйте pH до 7.0±0.2 с использованием 1N NaOH. Добавьте очищенной воды, чтобы довести финальный объем раствора до 1 л. Перемешайте и пропустите через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Храните приготовленный стоковый раствор при комнатной температуре. Утилизируйте стоковый раствор спустя 6 месяцев после использования или раньше при его помутнении или загрязнении. Утилизируйте использованные для анализа растворы в конце каждого дня.

СБОР, ОБРАБОТКА, ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА СЛАЙДОВ
Сбор и обработка образцов
Сбор костного мозга следует проводить в соответствии с Руководством лаборатории. Пособие содержит рекомендации по сбору образцов и культивированию. В руководстве упоминается, что приемлемо собирать костный мозг либо в гепаринизированную натриевую транспортную среду либо в гепаринизированную натрием пробирку для забора крови, такая как BD вакутайнер. В мануале также приведены рекомендации, что образцы должны транспортироваться в цитогенетическую лабораторию и незамедлительно культивироваться. Костный мозг не должен замораживаться до культивирования. Собранные образцы костного мозга должны незамедлительно использоваться для приготовления слайдов или их необходимо хранить в фиксаторе при температуре -20°C.
Гемолизированные образцы могут помешать культивированию для стандартного цитогенетического анализа. Воздействие на образцы кислот, сильных оснований или высоких температур следует избегать. Такие условия могут привести к разрушению ДНК и могут привести к неудачному FISH-анализу.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Подготовка слайдов из фиксированного клеточного осадка

Для представленных слайдов **в ОСОБЕННОМ ИСПОЛНЕНИИ, ХАРАКТЕРИСТИКИ** раздела этого документа, используется следующий метод подготовки слайдов:

1. Центрифугирование фиксированного клеточного осадка при 1100 rpm в течении 8 минут при комнатной температуре (от 15 до 30°C).
2. Удалить супернатант в пределах от 0.5 до 1.0 мл от клеточного осадка, стараясь его не задеть.
3. Ресуспензировать осадок в оставшемся 0.5 до 1.0 мл супернатанта осторожно перемешивая флакон.
4. Для оптимальных результатов распределения хромосом, может быть использована цитогенетическая сушильная камера. Предварительно прогрейте устройство до температуры 28±2°C с относительной влажностью 35±2%. Если цитогенетическая сушильная камера недоступна, вытяжной шкаф может быть использован как альтернатива.
5. Перед приготовлением предметного стекла, убедитесь, что образец правильно перемешан. Используя трансферную пипетку, удалите 3 капли клеточной суспензии вдоль длины предварительно очищенного влажного предметного стекла (если хранилось в холодной воде), удерживая предметное стекло под углом предварительно 45° и промокнув нижний край бумажным полотенцем.
6. Позвольте слайду полностью высохнуть перед тем как удалить его из сушильной камеры или с вытяжного шкафа.
7. Пометьте каждый слайд соответствующим образом.
8. Используя фазово-контрастный микроскоп, изучите число интерфазных ядер в поле зрения под малым увеличением (10x объективы). Минимально 100 клеток на поле низкой мощности предполагается для оптимального результата анализа. Отрегулируйте суспензию клеточного образца с помощью фиксатора Карное для достижения рекомендуемого числа интерфазных ядер.

ВНИМАНИЕ: Оптимальный образец будет содержать немного дебриса/или цитоплазмы.

9. После получения оптимального количества клеточной суспензии и подготовки слайдов, добавьте от 2 до 5 мл свежего 3:1 метанол/уксусная кислота к оставшемуся клеточному осадку перед хранением.
10. Оставьте слайды на нагревателе для слайдов при температуре 56±2°C в течении 30 минут или при комнатной температуре на всю ночь.

Хранение слайдов и фиксированного клеточного осадка

Поместите подготовленные слайды в закрытую коробку для слайдов. Запечатайте коробку для слайдов полиэтиленовым пакетом, содержащим приблизительно одну столовую ложку осушителя. Хранить при температуре -20°C (±10°C) до гибридизации или до перехода к процедуре **Целевой подготовки образца.**

ВНИМАНИЕ: Фиксированные слайды стабильны при -20°C (±10°C) в течении 12 месяцев. Храните оставшийся фиксированный осадок при -20°C (±10°C) до 1 месяца в случае подготовки дополнительных слайдов при необходимости.

Целевая подготовка образца

ВНИМАНИЕ: Инициирование автоматической процедуры Денатурации/Гибридизации пробы до завершения шага 4 этого раздела, чтобы обеспечить для материалов необходимое время для оттаивания.

1. Перенесите 2X SSC раствор в Сосуды Коплина
2. Перенесите 2X SSC раствор в сосуде Коплина на водяную баню приблизительно на 30 минут перед использованием, чтобы убедиться, что растворы достигают температуры 37±1°C.
3. Убедитесь, что температура 2X SSC раствора 37±1°C, используя калибровочные термометры.
4. Погрузите предварительно выдержанные образцы слайдов в 2X SSC раствор на 30 минут при 37±1°C.

ВНИМАНИЕ: Погружайте не более 4 слайдов одновременно в каждый сосуд Коплина

5. Используя щипцы, извлеките образцы слайдов из 2X SSC раствора, незамедлительно перенесите образцы слайдов в Сосуды Коплина, содержащие 70% этанол минимум на две минуты и поболтайте образцы слайдов внутри сосудов Коплина от 1 до 3 секунд. После 70% этанола, перенесите в 80% этанол минимум на две минуты и затем в 100% этанол минимум на две минуты.
6. Высушите слайды
7. После дегидратации в этаноле, поместите слайды на нагреватель при 56±2°C в течении двух минут для того, чтобы обеспечить полное высыхания слайда до нанесения пробы.

ВНИМАНИЕ: Держите образцы слайдов в 100% этаноле, пока не высушите все слайды и нанесите пробу.

Автоматическая Денатурация/Гибридизация пробы

1. Включите питание на приборе Денатурации/Гибридизации ThermoBrite.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВНИМАНИЕ: Главный выключатель питания расположен на задней панели. Прибор подаст звуковой сигнал, сообщив, что прибор включен. Главное меню будет отображаться, когда прибор достигнет температуры 37°C.

2. Настройте программу на приборе ThermoBrite по следующим параметрам:

- Время денатурации: 2 минуты
- Температура денатурации: 73°C
- Время гибридизации: от 12 до 18 часов
- Температура гибридизации: 37°C

3. Извлеките пробы, LSI/WCP гибридизационный буфер и очищенную воду и дайте время, чтобы реагенты достигли комнатной температуры.
4. Отвортексируйте пробы и LSI/WCP гибридизационный буфер в течении 2-3 секунд.
5. Отцентрифугируйте в течении 2-3 секунд.
6. Перенесите 7 мкл LSI/WCP гибридизационного буфера, 2 мкл очищенной воды и 1 мкл пробы в эппендорф объемом 1,5 мл.
7. Отвортексируйте и отцентрифугируйте смесь снова тщательно.
8. Используя пиппетор, нанесите 10 мкл смеси пробы на таргетный образец и незамедлительно покройте покровным стеклом, избегая появления пузырей.
9. Заклейте покровное стекло, используя шприц, заполненный клеем.
10. Перед добавлением образцов слайдов, вставьте 2 полоски влажности в прибор ThermoBrite в положение слотов под крышкой прибора. Позвольте вкладкам внутри крышки поддержать полоски. Обратитесь к Руководству ThermoBrite для получения инструкций относительно повторного использования карт влажности в последующих прогонах.
11. После того, как карты влажности вставлены, насытите полоски дистилированной водой. Добавьте от 8 до 10 мл дистилированной или деонизированной воды к каждой полоске для первого прогона.
12. При появлении запроса, поместите образцы слайдов на нагревательную поверхность прибора ThermoBrite. Аккуратно протолкните образцы слайдов в направлении к середине пластины, вставляя край слайда в отмеченные позиции на указателе слайдов. Матовый край слайда должен находится над краем поверхности нагрева. Убедитесь, что слайды лежат ровно и правильно выровнены по отмеченным позициям.

ВНИМАНИЕ: Если гибридизуете одновременно менее 12 слайдов, используйте пустые слайды, чтобы общее количество стало 12.

13. Закройте крышку прибора ThermoBrite. Курсор должен выделить «Выполнить PGM». Нажмите кнопку «Ввод для подтверждения».

ПРОЦЕДУРА ПРОМЫВКИ

1. Перенесите достаточный объем 0.4X SSC/0.3% NP-40 и 2X SSC/0.1% NP-40 в отдельный сосуд Коплина, чтобы покрыть слайды. Перенесите сосуд Коплина, содержащий 0.4X SSC/0.3% NP-40 на водяную баню. Нагревайте, пока температура не раствора 0.4X SSC/0.3% NP-40 не достигнет 73±1°C. Подтвердите температуру растворов используя калибровочные термометры. Используйте 2X SSC/0.1% NP-40 при комнатной температуре. Используйте растворы только один день, затем утилизируйте.
2. Достаньте образцы слайдов из прибора ThermoBrite.
3. Снимите покровное стекло с одного слайда и незамедлительно погрузите слайды в 0.4X SSC/0.3% NP-40. Помешайте слайды внутри сосуда Коплина в течении 1-3 секунд. Повторите процесс с другими слайдами, чтобы количество достигло 4 слайдов. Засеките время, когда 4 слайд будет погружен.

ВНИМАНИЕ: Для поддержания необходимой температуры 0.4X SSC/0.3% NP-40, промывайте 4 слайда одновременно. Если у Вас меньше 4 слайдов, добавьте пустые слайды комнатной температуры, чтобы общее количество слайдов составило 4.

4. Удалите слайды по истечении 3,5 минут.
5. Погрузите слайды в сосуд Коплина, содержащий 2X SSC/0.1% NP-40. Помешайте слайды внутри сосуда Коплина в течении 3-5 секунд.
6. Достаньте слайды из 2X SSC/0.1% NP-40 после того, как слайды были погруженными в течении 5-60 секунд.

ВНИМАНИЕ: Если промываете дополнительные слайды, убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1 °C перед промывкой.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

1. Высушите каждый слайд, касаясь нижнего края бумажным полотенцем (или эквивалент) и вытирая нижнюю сторону (сторона, не содержащая образец).
2. Высушите слайды в темноте, на длинном крае слайда, чтобы облегчить испарение и предотвратить накопление 2X SSC/0.1% NP-40 в течении максимум 2 часов.
3. Извлеките Контркраситель DAPI II из места хранения и позвольте реагентам достигнуть комнатной температуры.
4. Отвортексируйте DAPI II в течении 2-3 секунд.
5. Отцентрифугируйте флакон в течении 2-3 секунд.
6. Используя пиппетор, нанесите 10 мкл конткрасителя DAPI II к каждому образцу на таргетную зону и накройте покровным стеклом.
7. Дождитесь приблизительно 10 минут до исследования под микроскопом.

ПРОЦЕДУРА АРХИВИРОВАНИЯ

Храните гибридизованные слайды при -20°C в защищенном от света месте. При этих условиях, слайды могут храниться в течении 3 недель после нанесения конткрасителя DAPI II без потери интенсивности флуоресцентного сигнала.

ОЦЕНКА СЛАЙДОВ

Просмотр слайдов производится с учетом использования подходящего фильтра на флуоресцентном микроскопе. Следующие наборы оптических фильтров используются при визуализации флуорофоров при гибридизации.

Использование фильтров Vysis	**Одновременное возбуждение и эмиссия**
Одиночный зеленый	SpectrumGreen флуорохром
Одиночный оранжевый	SpectrumOrange флуорохром
Двойной оранжевый/зеленый	SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорохромы
Тройной–DAPI, Green, Orange	DAPI, SpectrumGreen, SpectrumOrange флуорохромы

Рутинное исследование проводится с тройных и двойных фильтров. Для отдельных ядер, если конкретные сигналы зондов кажутся слабыми при использовании тройных и двойных фильтров, рекомендуется использовать одиночный зеленый и одиночный оранжевый для облегчения подсчета сигналов.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Контроль качества

Оценка адекватности слайда

- Оценка адекватности слайда используется по следующим критериям. Если критерии не встречаются, образцы слайдов не должны оцениваться. Ядерная морфология: Границы ядер должны быть хорошо различимы и не повреждены.
- Общая информация: Фон, который возникает, должен быть темный или черный и относительно свободный от люминисцентных частиц и помутнения.
- Интенсивность сигнала пробы: Сигнал должен быть ярким, компактным, округлой или овальной формы, отличимым и легко оцениваемым.

ПОДСЧЕТ СИГНАЛОВ

Инструкция по подсчету сигналов основана на 6% верхнего диапазона границ, принятыми Vance и др.
Используя соответствующие фильтры, описанные выше, 2 исследователя подсчитывают по 100 ядер для каждой гибридизационной мишени, подсчитывая количество оранжевых и зеленых сигналов, присутствующих в каждом ядре. Первый исследователь считает ядра на левой стороне гибридизуемой мишени (которая определяется лучше) и второй исследователь считает ядра на правой стороне гибридизуемой мишени (которая определяется лучше). Обратитесь к рисунку **№1 Руководство по подсчету Двойных сигналов.**

- Выберите только неповрежденные ядра, которые не свернуты, не перекрыты и не завалены омертвевшими клетками.
- Избегайте подсчета слайдов или площадей внутри слайдов, которые имеют чрезмерно неспецифическую гибридизацию или много ядер, которые имеют чрезмерно много или чрезмерно мало сигналов.
- Избегайте подсчета ядер со сгустками или облаками сигналов.
- Сигналы одного цвета, которые соприкасаются, независимо от размера, считаются одним сигналом.

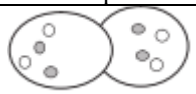
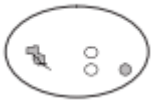
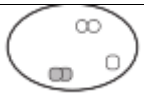
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Сигналы одного цвета, которые соприкасаются, независимо от размера, считаются одним сигналом. Если есть небольшая цепь сигналов, соединяющих раздельные сигналы, считаются как один сигнал
- Сигналы одинакового цвета могут не быть одной интенсивности в данном ядре. Таким образом, возникает необходимость использовать соответствующий одиночный фильтр и/или приспособить фокальную плоскость.
- Если есть какие-либо сомнения подсчитывать клетки или нет, не подсчитывайте.
- Если образец имеет общую низкую интенсивность сигнала и малое количество клеток с атипичным сигналом FISH (1R2G и/или 1R1G), используйте соответствующие рекомендованные одиночные фильтры. Невыполнение данной рекомендации может привести к неточностям при идентификации сигналов.
- Сигналы одного цвета не могут быть одинаковой интенсивности в данном ядре. Поэтому может возникнуть необходимость использовать соответствующие одиночные фильтры и/или корректировку фокальной плоскости.
- Если есть какие-либо сомнения должны ли подсчитываться клетки, не подсчитывайте.

Рисунок 1. Руководство по подсчету Двойных сигналов

Зеленый сигнал

Оранжевый сигнал

1. 	Если ядра перекрываются, не подсчитывать сигналы.
2. 	Считать как два оранжевых и два зеленых сигнала. Один оранжевый сигнал диффузный.
1. 	Считать как один оранжевый и один зеленый сигнал. Один оранжевый сигнал слитный.
4. 	Считать как один оранжевый и два зеленых сигнала. Один зеленый сигнал слитный и один оранжевый сигнал слитный.
5. 	Считать как два оранжевых и один зеленый сигнал.

После подсчета сигналов, от каждого исследователя учитывается число 1R1G и/или 1R2G атипичных паттернов сигналов и следующие шаги применяются для подсчета финального количества - 200 ядер. Обратитесь к **Таблице 2 Правила комбинированного подсчета и привлечение третьего исследователя,** которые основываются 6% верхнем диапазоне границ. Для подробного объяснения правил в **Таблице 2,** смотрите текст, следующий за таблицей.

Таблица 2 Правила комбинированного подсчета и привлечение третьего исследователя

Число	Правило	Да	Нет
1	Один считается как на или ниже 6, а другой считается выше 6?	Перейти к 6	Перейти к 2
2	Два подсчета отличаются на 5 или меньше?	Перейти к 5	Перейти к 3
3	Считается ли один из двух подсчетов 12 или меньше?		
4	Отличаются ли два подсчета больше, чем на 15?	Перейти к 6	Перейти к 4
5	Объедините 2 подсчета для окончательного решения	Перейти к 6	Перейти к 5
6	Третий исследователь определяет 1R2G на 100 подсчитываемых ядер. Двое ближайших из трех подсчитываемых объединяют 200 ядер для финального подсчета. Если все три подсчета равноудалены, финальный подсчет вдвое больше.		

- Если исследователь насчитал 1R2G сигналов, или ниже 6 и другой исследователь при этом насчитал 1R2G сигналов выше 6, третий исследователь получит 100 ядер внутри гибридизационной мишени. Из трех подсчетов, 2 подсчета, тесно лежащие друг к другу, будут объединены, чтобы сгенерировать счет для 200 ядер. Если все три подсчета эквивалентны, среднее значение удваивается и используется как оценка.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Если значения 1R2G, определенные двумя исследователями, отличаются на 5 или меньше чем на 100 оцененных ядер, добавляются два балла вместе, чтобы создать счет для 200 ядер на образец.
- Если значения 1R2G, определенные двумя исследователями, отличаются на 5 или меньше чем на 100 оцененных ядер, то решение принимается на основе близости числа 1R2G к 12.

• Если один из двух исследователей насчитывает 1R2G сигналов или менее 12 или если два подсчета отличаются более чем на 5 из 100 оцененных ядер, третий исследователь будет подсчитывать 100 ядер внутри гибридизационной мишени. Из трех подсчетов, 2 подсчета, тесно лежащие друг к другу, будут объединены, чтобы сгенерировать счет для двух ядер. Если все три подсчета эквивалентны, среднее значение удваивается и используется как оценка.

• Если каждый из двух исследователей насчитывает 1R2G сигналов больше, чем 12 и, если эти числа различаются на 15 или менее на 100 ядер, баллы будут объединены для генерации подсчета для 200 ядер. Если два исследователя насчитывают 1R2G сигналов больше чем 15 на 100 обследуемых ядер, тогда третий будет подсчитывать 100 ядер внутри гибридизационной мишени. Из трех подсчетов, 2 подсчета, тесно лежащие друг к другу, будут объединены, чтобы сгенерировать счет для 200 ядер. Если все три подсчета эквивалентны, среднее значение удваивается и используется как оценка.

Интерпретация результатов

Ожидаемые значения

Ожидаемые сигналы паттернов в клетке с типичными паттернами для LSI EGR1 зонда это 2 оранжевых и два зеленых сигнала (2R2G). Значения, используемые для определения верхнего контрольного предела 6% было число наблюдаемых паттернов на 200 подсчитываемых ядер. Обратитесь к **Таблице 3.**

Таблица 3. Верхний контрольный предел

Проба/Цвет	**Атипичные сигналы FISH**	**Верхний контрольный предел Число сигналов на 200 ядер**
LSI EGR1/orange (R) D5S23, D5S721/green (G)	1R2G	>12

• Отдельные лаборатории должны проверить, что верхний референсный предел (6%) подходит для пациентов лаборатории

• Один оранжевый и 2 зеленых сигнала это ожидаемые сигналы в атипичных клетках с потерей копии таргетного региона гена LSI EGR1 и сохранение обоих копий региона генов LSI D5S23, D5S721. Цитируемая публикуемая литература показала следующий диапазон значений для 5q образцов с 1R2G атипичными сигналами:

Публикации	Заболевание	5q- (1R2G)	Номер образца	Общее число протестированных образцов
Vance[4]	ОМЛ	45-91%	8	181
Galvan[1]	МДС	35-81.5%	6	28
	t-МДС	25-75%	3	28
	t-МДС & ММ	76%	1	28
	ОМЛ	20-99%	13	28

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз, МДС – миелодисплатический синдром, t-MDS – связанный с терапией миелодиспластический синдром, ММ- множественная миелома.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO

• Проба Vysis EGR1 FISH Probe Kit – SC – может использоваться в комбинации с дополнительными биомаркерами, морфологией, и другой клинической информацией.

• Если образец имеет низкую интенсивность сигнала FISH и низкий уровень клеток с атипичными сигналами (1R22G), используйте рекомендуемые соответствующие одиночные фильтры для подтверждения сигналов. Невыполнение этой рекомендации может привести к неверной идентификации сигналов.

• Могут возникать другие атипичные сигналы и метафазный анализ может помочь в характеристике таких сигналов.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИНТЕНСИВНОСТИ

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определяется как процент сигналов, которые гибридизуются с правильным локусом, а не в другом положении. Аналитическая специфичность Vysis EGR1 SpectrumOrange/D5S23, D5S721 SpectrumGreen пробы для соответствующих локусов-мишеней была установлена с использованием метафазных хромосомных препаратов из образцов периферической крови 5 кариотипически нормальных

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

мужчин, которые были объединены прежде чем их нанесли на предметные стекла. Положение гибридизации каждого сигнала FISH на 100 хромосомах последовательных метафазных ядер оценивалось одним исследователем в общей сложности на 200 таргетных локусов.
Для каждой пробы или образца, было подсчитано число гибридизованных FISH сигналов с неправильными локусами на метафазных хромосомах. Аналитическая специфичность каждой пробы была посчитана как число FISH сигналов, гибридизованных с правильным локусом на метафазных хромосомах, разделенное на общее число гибридизованных FISH сигналов на метафазных хромосомах и умноженное на 100 для получения процента.
Аналитическая специфичность Vysis EGR1 SpectrumOrange/D5S23, D5S721 SpectrumGreen пробы была 100%, как показано в **Табл. 4.**

Табл. 4 Аналитическая специфичность

	Номер сигнала метафазных хромосом				
Проба	**Правильный таргетный локус**	**Число гибридизованных правильных таргетных локусов**	**Общее число гибридизованных сигналов**	**Аналитическая специфичность (%)**	**95% Доверительный интервал**
D5S23, D5S721	5p15.2	200	200	100	(98, 100)
EGR1	5q31	200	200	100	(98,100)

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ
Аналитическая чувствительность определяется как процент подсчитываемых интерфазных ядер с ожидаемыми типичными сигналами. Ожидаемые типичные интерфазные сигналы для проб Vysis EGR1 FISH Probe Kit – SC это 2R2G на ядра.
Аналитическая чувствительность Vysis EGR1 SpectrumOrange/D5S23, D5S721 SpectrumGreen пробы была опубликована с использованием интерфазных ядер, приготовленных из 25 образцов костного мозга, которые были либо кариотипически нормальными, либо 5p15 и 5q31 без делеции. Оранжевые и зеленые сигналы ядер для 25 образцов были подсчитаны двумя исследователями. Каждый исследователь посчитал 100 ядер на образец для общего количества 200 ядер на образец и 5000 подсчитываемых ядер от 25 образцов.
Аналитическая чувствительность была посчитана как процент подсчитываемых интерфазных ядер с ожидаемыми 2R2G сигналами.
Vysis EGR1 FISH Probe Kit – SC аналитическая чувствительность составила 99,6% как показано в **Таблице 5.**

Таблица 5. Аналитическая чувствительность

Проба	**Число сигналов интерфазных хромосом**		**Аналитическая чувствительность**	
	С ожидаемыми сигналами	**Подсчитываемые сигналы**	**Точка оценки**	**95% доверительный интервал**
LSI EGR1/D5S23, D5S721	4979	5000	99.6	(99.4, 99.7)

ВЕРИФИКАЦИЯ ВЕРХНЕГО КОТРОЛЬНОГО ПРЕДЕЛА
Верхний контрольный предел определяется как максимальное количество считаемых ядер с атипичными сигналами от кариотипически нормальных образцов или 5p15.2 и 5q31 без делеции. Верхний контрольный предел выражается через процент или актуальное число атипичных ядерных сигналов FISH на стандартное число тестируемых ядер.
Верхний контрольный предел для этого исследования составляет 6% или 12 1R2G сигналов на 200 подсчитываемых интерфазных ядер. Образцы, превышающие 12 1R2G атипичные FISH сигналы на 200 подсчитываемых ядер, рассматриваются как с потерей мишени пробы Vysis EGR1 на хромосоме 5q. Анализ был проведен на интерфазных ядрах от 25 кариотипически нормальных образцов костного мозга или 5p15.2 или 5q31 образцов без делеции. Сигналы от 200 ядер были оценены путем подсчета числа оранжевых и зеленых сигналов. Каждый из двух исследователей оценивал 100 ядер на образец. Среди 25 образцов, ни один из них не продуцировал сигналы 1R2G выше или на уровне 6%.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Два повторных анализа были проведены на двух высокопозитивных и двух низкопозитивных и двух отрицательных участниках панели на трех сайтах в пять разных дней. Положительные участники панели для исследования «сайт к сайту» были получены путем смешивания положительных клеток костного мозга с нормальными клетками костного мозга для получения желаемого уровня позитивности. Результаты в **Таблице 6** показывают общее согласие с отрицательным/положительным статусом участников тестовой панели. Все сайты получили 100% согласие с известным статусом всех участников 6 панелей за все 5 дней, кроме одного сайта, у которого был один несовпадающий результат для участника отрицательной панели.

Таблица 6. Общее соглашение, сайт к сайту

ЧИСЛО

Категория	Согласие	Несогласие	Общее	Процент согласий
Высоко позитивные	60	0	60	100
Низко позитивные	60	0	60	100
Негативные	59	1	60	98

Было посчитано значение и стандартное отклонение процента клеток с сигналами 1R2G.
Анализ дисперсионных компонентов для изучения сайт к сайту показан в **Таблице 7.**

Таблица 7. Анализ вариаций компонентов Сайт к Сайту

Образец	Номер	Значение	В день CO	Между днями CO	Между сайтами CO	Общее CO
Высокопозитивный 1	30	70.0	3.28	4.01	5.44	7.51
Высокопозитивный 2	30	47.6	5.56	0.00	0.74	5.61
Низкопозитивный 1	30	18.1	3.00	3.82	1.03	4.97
Низкопозитивный 2	30	14.9	3.25	1.54	0.00	3.59
Негативный 1	30	0.7	0.71	0.00	0.68	0.99
Негативный 2	30	0.9	0.66	1.42	0.22	1.59

[a] Процент клеток с 1R2G сигналами
[b] CO = стандартное отклонение

С использованием участников одинаковой панели при изучении сайта к сайту, четыре повторных анализа были проведены на 2 высокопозитивных, двух низкопозитивных и двух негативных участников панели с использованием трех различных лотов пробы к одиночному сайту.

Полное соглашение с известным негативным/позитивным статусом теста участников панели показано в **Таблице 8.** Все повторения с использованием трех лотов проб для каждого их шести участников панели привели к соглашениям с известным статусом участников панели.

Таблица 8. Общее соглашение, Лот к лоту

ЧИСЛО

Категория	Согласие	Несогласие	Общее	Процент согласий
Высоко позитивные	24	0	24	100
Низко позитивные	24	0	24	100
Негативные	24	0	24	100A

Анализ вариаций компонетов для исследований Лот к лоту показаны в **Таблице 9.**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 9. Анализ вариаций компонентов Сайт к Сайту

Образец	Номер	Значение	Внутри лота CO[b]	Между лотом CO	Общее CO
Высокопозитивный 1	12	66.2	7.19	0.00	7.19
Высокопозитивный 2	12	47.4	3.69	3.04	4.78
Низкопозитивный 1	12	12.7	4.29	0.00	4.29
Низкопозитивный 2	12	12.3	1.84	1.12	2.15
Негативный 1	12	0.0	0.00	0.00	0.00
Негативный 2	12	0.1	0.14	0.20	0.25

[a]- Процент клеток с 1R2G сигналами

[b]- SD – Среднеквадратичное отклонение

В этих исследованиях воспроизводимости, 84 исследования были проведены на участниках низкопозитивной панели. Ни один из 84 низкопозитивных не привел к результату сигнала 1R2G или ниже 6%.

Краткое изложение результатов цитируемой опубликованной литературы

В публикуемой цитируемой литературе, может обсуждаться использование устройства, которое не было одобрено или одобрено FDA.

Ссылка на литературу	Изучение популяции	Число и тип образцов	Используемое устройство	Наблюдаемые результаты EGR1
Sun et al[8]	Известная делеция (5q), имеющая миелодиспластический синдром и острый миелоидный лейкоз	51 образец костного мозга	Vysis LSI EGR1/D5S23, D5S721 пробы	В целом - делеция (5q) была детектирована в 49/51 образцов • 8/8 5q- синдром • 6/6 рефрактерная цитопения с множественной дисплазией • 8/8 рефрактерная анемия с избытком бластных клеток • 1/1 миелодиспластический синдром, не классифицируется • 1/1 миелодиспластический синдром, связанный с терапией • 5/6 миелодиспластический синдром/MDP перекрывающийся синдром, не классифицируемый • 20/21 острый миелоидный лейкоз
Sun et al[8]	Известный или ожидаемый миелодиспластический синдром или острый миелоидный лейкоз	269 образцов костного мозга	Vysis LSI EGR1/D5S23, D5S721 пробы	В целом – делеция (5q) была детектирована в 17/17 образцах с цитогенетической идентификацией делеции (5q). С помощью метода FISH была детектирована делеция (5q) в 5 образцах, не детектируемых метафазной цитогенетикой – 3 случая без метафазного анализа и два случая с меньшими, чем необходимо метафазами.
Galvan et al[1]	Миелодиспластический синдром, связанный с терапией миелодиспластический синдром и пациенты с ОМЛ	28 образцов костного мозга	Vysis LSI EGR1/D5S23, D5S721 пробы	В целом 1R2G сигналы FISH, ассоциированные с делецией (5q) были обнаружены в 23/28 образцах • 6 МДС • 3 связанных с терапией МДС • 1 связанный с терапией МДС • 13 ОМЛ **ВНИМАНИЕ: Атипичные сигналы (1R3G) больше, чем один оранжевый, 2 зеленых сигнала, обнаружены в 2 образцах.**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vance et al[4]	ОМЛ	181 образец костного мозга*	Vysis LSI EGR1/D5S23, D5S721 пробы	В целом 1R2G FISH сигналы ассоциированы с делецией 5q были детектированы в 8/181 образцах **ВНИМАНИЕ: Атипичные сигналы другие, чем 1 оранжевый, 2 зеленых FISH сигнала были обнаружены в двух образцах.**

* Основаны на неопубликованных данных

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Galvan AB, Mallo M, Arenillas L, et al. Does monosomy 5 really exist in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia? *Leuk Res* 2010;34: 1242-1245.
2. Lai F, Godley LA, Joslin J, et al. Transcript map and comparative analysis of the 1.5-Mb commonly deleted segment of human 5q31 in malignant myeloid diseases with a del (5q). *Genomics.* 2001; 71(2):235-45.
3. Joslin JM, Fernald AA, Tennant TR, et al. Haploinsufficiency of EGR1, a candidate gene in the del (5q), leads to the development of myeloid disorders. *Blood.* 2007; 110(2):719-26.
4. Vance GH, Kim H, Hicks GA, et al. Utility of interphase FISH to stratify patients into cytogenetic risk categories at diagnosis of AML in an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) clinical trial (E1900). *Leuk Res.* 2007;31: 605-9.
5. Herry A, Douet-Guilbert N, Morel F, et al. Redefining monosomy 5 by molecular cytogenetics in 23 patients with MDS/AML. *Eur JHaematol.* 2007;78: 457-67.
6. Bram S, Swolin B, Rodjer S, et al. Is monosomy 5 an uncommon aberration? Fluorescence in situ hybridization reveals translocations and deletions in myelodysplastic syndromes or acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003;142: 107-14.
7. Bram S, Rodjer S, Swolin B. Several chromosomes involved in translocations with chromosome 5 shown with fluorescence in situ hybridization in patients with malignant myeloid disorders. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004; 155:74-8.
8. Sun Y, Cook JR. Fluorescence in situ hybridization for del(5q) in myelodysplasia/acute myeloid leukemia: Comparison of EGR1 vs. DSF1R probes and diagnostic yield over metaphase cytogenetics alone. *Leuk Res* 2010; 34: 340-343.
9. Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz. The UCSC Genome Browser. © The Regents of the University of California. Available at: http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?hgsid =185806115&clade=mammal&org=Human&db=hg18. Accessed [February 9, 2011].
10. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med.* 2006; 8:16-23.
11. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. *Type* > www.cdc.gov, *search* > BMBL5 > *look up* sections III and IV.]
12. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens*.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
14. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
15. The Association of Genetic Technologists. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Third edition. Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL, eds. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers; 1997.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в техническую службу компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) по телефону +496122-580 или заходите на http:\\www.abbottmolecular.com.

Abbott Molecular Inc. является легальным производителем зонда Vysis EGR1 FISH Probe Kit – SC.
Патенты: abbott.us/patents.
Vysis, LSI и WCP являются торговыми марками группы компании Abbott в различных юрисдикциях
Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany

© 2011, 2016 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

June 2016
30-608500/R3

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color DF FISH Probe Kit

en

REF 05N54-050

30-608908/R3

Vysis BCR/ABL1/ASS1
Tri-Color DF FISH Probe Kit

REF 05N54-050
30-608908/R3

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Хранить при температуре -20°C (±10°C)
	Обратитесь к сопроводительным документам
	Биологический риск
	Опасность
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis BCR/ABL/ASS1 Tri-Color DF FISH Probe набор используется для детекции t (9;22) (q34; q11.2) рицепрокной транслокации, включающей регионы генов BCR и ABL1 с использованием технологии флуоресцентной in situ гибридизации (FISH).

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА

Транслокация (9;22), вызванная слияние гена BCR на хромосоме 22q11.2 и гена ABL1 на хромосоме 9q34 выявляется цитогенетиками в больше, чем у 80% пациентов с хронической миелоидной лейкемией. В случаях с хронической миелоидной лейкемией, отсутствует цитогенетически детектируемая транслокация, слияние генов BCR/ABL1 почти всегда можно детектировать методом FISH или другими молекулярными методами. Слияние генов BCR/ABL также встречается в части случаев острого лейкоза и более редко при остром миелоидном лейкозе.

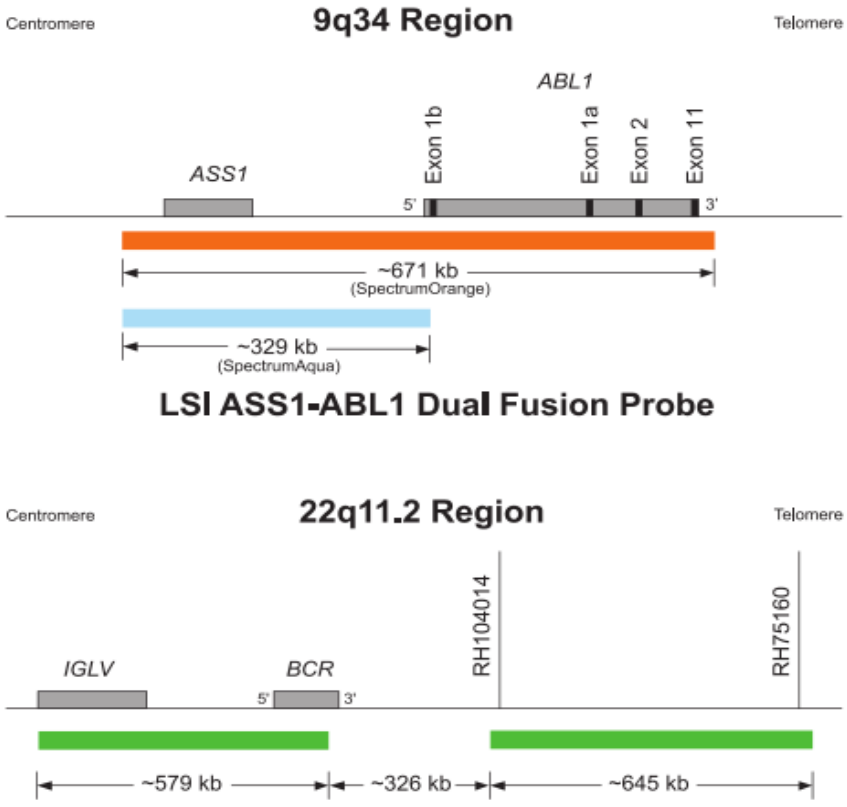
Примерно в 15-20% случаев хронической миелоидной лейкимии, t(9;22) приводит к потере генетического материала, затрагивающего гены BCR и/или ABL1 в точках разрыва на 9 хромосоме. Эта потеря может препятствовать образованию высокоспецифичных двойных сигналов, возникающих от слияния двойных проб и сбалансированных транслокаций. Если оба таргетных гена BCR/ABL1 удаляются на 9 хромосоме, низкий

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

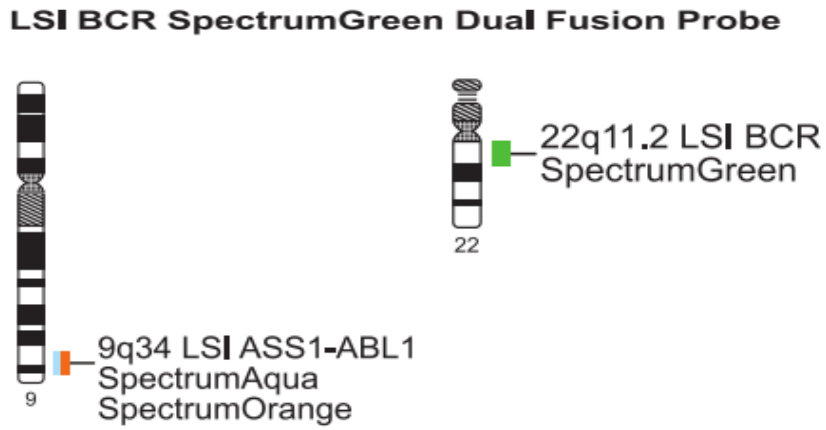
уровень случайного перекрытия оранжевого и зеленого сигналов внутри нормальных клеток (производят один оранжевый, один зеленый и один слитный сигнал) нельзя отличить от низкого уровня слияния генов BCR/ABL1, производящих одинаковые сигналы). Для этого теста используется Трехцветная проба с третьим цветом (голубой) на центромерной стороне точки разрыва гена ABL1, которая совмещается с оранжевым сигналом в результате случайного слияния оранжевого/зеленого сигналов, но отсутствует при истинном молекулярном слиянии BCR/ABL1 на 22 хромосоме.
Зонды из этого набора использовались в публикациях для обнаружения низких уровней позитивных клеток у пациентов с хронической миелоидной лейкемией, которые получали терапию и у которых отмечена делеция сигналов FISH на хромосоме 9.

ОПИСАНИЕ ПРОБЫ

Размером приблизительно 671 кб (chr9: 132255025-132926107; Март 2006, UCSC Геномный браузер) SpectrumOrange LSI ABL1 охватывает гены ABL1 и ASS1 на хромосоме 9q34. Размером приблизительно 329 кб (chr9: 132255025-132584487; Март 2006, UCSC Геномный браузер) SpectrumAqua перекрывает часть участка, покрываемого пробой SpectrumOrange, охватывает ген ASS1 и находится в центромерной области гена ASS1.
SpectrumGreen LSI BCR проба состоит из двух проб, локализованных на хромосоме 22q11.2. Центромерная часть SpectrumGreen пробы размером приблизительно 579 кб (chr22:21382633-21962088 Март2006 и содержит последовательности гена BCR. Теломерная область пробы SpectrumGreen размером приблизительно 645 кб (chr22:222882188-22932815; Март 2006) и локализуется в теломерной области гена BCR. Разрыв между двумя пробами составляет приблизительно 326 кб.



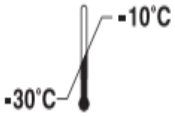
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



РЕАГЕНТЫ

1. **Vysis LSI BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color Dual Fusion Probes (Номер партии 31-231046)** (1 флакон, 50 мкл на флакон). 1065.5 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА.
2. **Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30-804824)** (1 пробирка, 375 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC (pH 7,0). Таблицы с Данными о Безопасности Материалов (MSDS) всех предоставленных реагентов можно получить в технической службе компании Abbott Molecular.

ХРАНЕНИЕ



Vysis BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color DF FISH Probe Kit необходимо хранить при температуре -20ºC (±10) , в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортировка зонда Vysis BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color DF FISH Probe Kit осуществляется на сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis LSI BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color Dual Fusion Probes

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.

Дезактивации и утилизации всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer
Определяющие опасность компоненты маркировки:

- Формамид.

Применяются следующие предупреждения:



ОПАСНОСТЬ

H360	Может влиять на плод ребенка
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

ПРИМЕЧАНИЕ: там, где необходимо, измеряйте pH растворов при комнатной температуре. Используйте pH – метр со стеклянным электродом, если не указано иное.

20X SSC раствор
Смешайте 132 г 20X SSC и 400 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCI. Доведите объем до 500 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0,1% NP-40 промывочный раствор
Смешайте 100 мл 20X SSC (pH 5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% формамид / 2X SSC)
Смешайте 49 мл формамида, 7 мл 20X SSC (pH 5,3) и 14 мл очищенной воды в стеклянной емкости Коплина. Измерьте pH с помощью индикаторных полосок и убедитесь, что pH составляет 7,0-8,0. Хранить при температуре при 2-8°C в плотно закрытом контейнере. Использовать в течение 7 дней.

Растворы этанола (70%, 85%, 100%)
Приготовьте v/v растворы этанола методом разведений, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Использовать в течение 6 месяцев.

0,4X SSC / 0,3% NP-40 промывочный раствор
Смешайте 20 мл 20X SSC (pH 5,3) и 950 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 3 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0-7,5 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Хранение LSI ДНК зонда: Зонд LSI ДНК должен храниться при температуре не выше -20ºC (±5 °C) в защищенном от света месте.
Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требуется свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.
Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре, встряхните, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СБОР ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА АНАЛИЗА

Клетки костного мозга культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).

МЕТОДИКА

Необходимые материалы

- Vysis LSI BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color Dual Fusion Probes
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипет-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в этой инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата образца-мишени

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА ЗОНДОВ

1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца-мишени):

7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

ГИБРИДИЗАЦИЯ ЗОНДА И ОБРАЗЦА

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру – поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи резинового клея изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

ОТМЫВКА СТЕКОЛ

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.
- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4X SSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ГИБРИДИЗАЦИИ

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

ХРАНЕНИЕ

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОДЕНАТУРАЦИИ

Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий диапазон показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):

7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.

При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей этой инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Установите Hyb Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область и накройте покровным стеклом.

МЕТОДИКИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

С образцами пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Ожидаемые нормальные паттерны сигналов для пробы Vysis BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color DF FISH Probe Kit это два оранжевых, два голубых и два зеленых сигнала. Ожидаемые атипичные паттерны для пробы Vysis BCR/ABL1/ASS1 Tri-Color DF FISH Probe Kit будут зависеть от делеционного статуса мишени, перекрываюшего точки разрыва как результат изменений на хромосоме 9.

- При сбалансированной транслокации t(9;22) без каких-либо делеций мешени на хромосоме 9, ожидается 1 оранжевый, один зеленый и два слитных сигнала. Один оранжевый сигнал (нормальная 9 хромосома) и один из двух слитных (делеция 9 хромосомы) каждый из них ассоциирован с голубым сигналом.
- Если мишень гена ABL1 на 9 хромосоме отсутствует из-за делеции, ожидаемые сигналы паттернов один оранжевый два зеленых и один слитный.
- Если оба гена-мишени ABL1 и BCR имеют делецию на 9 хромосоме, то ожидаемые паттерны сигналов один оранжевый, один зеленый и один слитный. Снова, если один оранжевый сигнал (нормальная 9 хромосома) будет ассоциирован с голубым сигналом.

Во всех случаях, истинное слияние сигналов генов BCR/ABL1 не ассоциировано с голубым сигналом т.к. аква проба располагается в центромерной области гена ABL1 и т.о. не вовлечены в слияние онкогенов. Этот факт является основанием для отличия истинного 5' BCR/3' ABL слияния от других оранжевого/зеленого сигналов, являющимися результатом делеции 9 хромосомы или случайного перекрытия нормальных сигналов на хромосоме. Могут возникать другие абнормальные паттерны сигналов, и метафазный анализ может быть полезен в характеристике таких сигналов. Публикации Smoley и др. и Siu и др. использование пробы, содержащиеся в этом наборе и продемонстрировали абнормальные паттерны сигналов, наблюдаемые у пациентов с делецией 9 хромосомы.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ

Для интерфазного использования, отдельные лаборатории должны публиковать аналитически нормальное отсечение для абнормальных паттернов сигналов с использованием подходящей технологии, такой, как была описана Wiktor и др.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Ошибочные результаты коденатурации

Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Увеличьте температуру 0,4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости, продолжайте увеличивать температуру до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Уменьшите температуру плавления на 2ºC.
«Тусклые» зонды	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Увеличьте время гибридизации. • Увеличьте температуру плавления. При необходимости, увеличивайте температуру до тех пор, пока морфология не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4X SSC/0,3% NP-40 при температуре от 70ºC до 73ºC.
Рассеивание сигнала (точечное)	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4X SSC/0,3% NP-40 при температуре от 73ºC до 76ºC.
Нечеткая морфология в метафазу	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Приготовление срезов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите срезы в 2X SSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3. Погрузите срезы несколько раз в очищенную воду. 4. Проведите обезвоживание срезов в серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%). 5. Просушите стекла на воздухе и продолжайте приготовление с момента «Приготовление препаратов для коденатурации». • Если нечеткая морфология сохраняется, измените характер использования прибора ThermoBrite: 1. Подготовьте 280 мкл 70% формамида/раствора для денатурации 2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл очищенной воды). 2. Запустите программу ThermoBrite Hold Temp при температуре 73ºC. 3. Поместите 10 мкл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации на каждую интересующую область и накройте покровным стеклом. 4. Когда ThermoBrite достигнет 73ºC, поместите срезы на нагревающую поверхность. Закройте крышку. 5. Извлеките срезы через 3 минуты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	6. Снимите покровное стекло. 7. Продолжите с этапа дегидратации «Приготовления препаратов для коденатурации» для процедуры анализа без использования коденатурации.

Советы и решение проблем

При просмотре результатов FISH-методики убедитесь, что Ваш микроскоп нормально работает и настроен должным образом.

Приведенный ниже, в таблице, список содержит некоторые нетипичные результаты, с которыми Вы можете встретиться при использовании зондов LSI. Приведены вероятные причины рассматриваемых проблем и предложения по улучшению качества проведения анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
"Искаженная" морфология хромосомы	Срезы в процессе пробоподготовки были высушены слишком быстро.	Повысьте температуру водяной бани (увеличьте влажность) при погружении в нее срезов. Снизьте температуру столика с подогревом во время приготовления образца. Увеличьте время высушивания (как минимум – в течение ночи, затем оставьте срезы на самое меньшее 24 часа при комнатной температуре). Не подвергайте срезы воздействию высоких температур.
	Срезы подверглись избыточной денатурации.	Убедитесь, что раствор для денатурации был приготовлен согласно данной инструкции. Убедитесь, что перед погружением срезов температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC; уменьшите ее до 72 ºC. Уменьшите продолжительность погружения слайда в раствор для денатурации до 1-3 минут.
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Срезы перед денатурацией имели слишком низкую температуру.	Выдержите срезы в течение как минимум 24 часов в условиях комнатной температуры.
Высокий фон слайда	Стекла были недостаточно очищены перед приготовлением препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите насухо, используя безворсовую бумагу для промокания.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Клеточный детрит в образце.	Промойте детрит с помощью свежего фиксирующего раствора три раза и повторите для данного препарата процедуру раскапывания.
	Метафазные пластинки подвергались воздействию высоких температур или содержат цитоплазму.	Увеличьте время, в течение которого срез погружен в денатурирующий раствор, до 10 мин.
	Препарат не промыт должным образом после гибридизации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь, что pH и температура раствора требуемые. Снимите покровное стекло. Повторите процедуру отмывки.
	Промывочные растворы использовались в течение более длительного времени или хранились в неподобающих условиях.	Убедитесь, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при 4ºC. Утилизируйте их через 7 дней или после частого использования. Все остальные промывочные растворы используйте не более 1 дня. Убедитесь, что pH промывочных растворов, содержащих формамид, составляет от 7,0 до 8,0.
	Для визуализации гибридизации использованы длиннополосные пропускные фильтры.	Для уменьшения доли «фонового света» перейдите на фильтр с меньшей полосой пропускания или на многопропускные фильтры.
Отсутствие сигнала или слабые сигналы	Срез образца не денатурирован должным образом.	Перед тем, как погружать срезы в денатурирующий раствор, убедитесь, что температура раствора в емкости Коплина составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74ºC. Увеличьте время денатурации до 2-4 минут.
	Срез образца не подготовлен для FISH должным образом.	Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для того, чтобы получить протоколы подготовки образца для FISH-методики
	После нанесения образца («раскапывания») препарат не выдержан должным образом.	До проведения FISH выдержите препараты в течение 24 ч при комнатной температуре

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Со срезами был проведен GTG-бэндинг.	Использование срезов после GTG-бэндинга в FISH-методике (обработка трипсином и красителем Гимза (trypsin-Giemsa)) может потребовать изменений в протоколах бэндинга и/или гибридизации. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular. Или приготовьте новые срезы образцов.
	Не добавлен зонд.	Приготовьте новую смесь зондов, она должны медленно достичь необходимой температуры. Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени. Медленно раскапайте зонды с помощью пипетки.
	Зонды, буфер для гибридизации или смесь зондов не перемешаны перед использованием.	Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени.
	Зонды неправильно разведены для гибридизации.	Используйте указанные объемы для того, чтобы поддержать необходимые соотношения в смеси зондов (7 мкл буфера для гибридизации: 1 мкл зонда: 2 мкл очищенной воды). Убедитесь, что пипетка откалибрована. Буфер для гибридизации перед использованием должен прогреться и достичь комнатной температуры; раскапывайте медленно.
	Зонды не денатурированы должным образом.	Убедитесь, что температура водяной бани, используемой для денатурации смеси зондов, составляет 73±1ºC.
	ПРМЕЧАНИЕ: Не применимо для зондов, помещенных в буфер для гибридизации и денатурированных.	Денатурируйте смесь зондов в течение 5 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Зонды не нанесены на искомый образец непосредственно после денатурации зондов.	Планируйте так, чтобы зонды наносились сразу же после извлечения срезов из раствора EtOH 100%. Перед нанесением зонда убедитесь, что EtOH испарился. Извлеките пробирку со смесью зондов из водяной бани (73±1ºC) и сразу же положите пробирку на столик с подогревом (45-50ºC). Во время нанесения зондов на срез (раскапывание) держите пробирку на подогреваемом столике. Обрабатывайте только такое количество срезов, которое сможете исследовать и соблюдайте должную температуру и временные промежутки в соответствии с данной методикой исследования.
	Смесь зондов на срезе образца высушена слишком сильно.	Сразу же после нанесения смеси зондов накройте искомую область покровным стеклом При отмывке удаляйте покровное стекло с препарата за один прием и сразу же препарата погрузите этот препарат в промывочный раствор, до того, как снять покровное стекло со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровным стеклом появились пузырьки воздуха.	Положите покровное стекло с первого касания поверхности смеси зондов. Положите препарат с покровным стеклом на какую-либо прокладку и очень осторожно выдавите пузырьки воздуха.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что соблюдены установочные время и температура гибридизации. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºC. Создайте хороший изолирующий слой вокруг покровного стекла при помощи резинового клея , не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Неверные условия отмывки или использование неправильных растворов.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с этой инструкцией. Убедитесь, что температуры промывочных растворов равны

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		установочным температурам процедуры отмывки. Убедитесь, что используемые термометры и pH – метры откалиброваны должным образом. Снимите покровные стекла до погружения препаратов в промывочный раствор.
	Нарушены условия хранения зондов или срезов образцов.	Храните неразведенные зонды при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте. Храните не гибридизованные срезы высушенными, при температуре -20ºC или ниже; или при комнатной температуре в течение короткого времени. Храните гибридизованные срезы при температуре -20ºC или ниже, в защищенном от света месте максимум в течение 3 недель.
	Использован неверный флуоресцентный краситель. Флуоресцентный краситель слишком яркий.	Снимите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре: проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите и нанесите краситель снова.
	Для визуализации гибридизации используется неверный набор фильтров.	Многополосные пропускные фильтры дают меньше света, чем однополосные, поэтому сигналы от зондов при просмотре с использованием многополосных фильтров могут казаться слабее. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильные фильтры. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.
	Конфигурация микроскопа или объективов не приспособлена для визуализации результатов FISH, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем Вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Зонды разведены неверно; часто в анализируемый образец добавляется слишком большое количество зондов.	Убедитесь, что смесь зондов приготовлена в соответствии с инструкцией.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь, что в смесь зондов добавлено должное количество буфера для гибридизации.
	Температура для промывки слишком низкая.	Не помещайте в емкость Коплина больше четырех стекол одновременно, и таким образом поддерживайте необходимую температуру промывочных растворов. Убедитесь, что температура промывочного раствора равна необходимой перед тем, как промывать еще одну группу препаратов.
	Промывочный раствор слишком низкой концентрации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем концентрированнее раствор.
Яркий или тусклый флуоресцентный краситель	Краситель тусклый: срезы не обезвожены до нанесения красителя или в красителе имеются жировые капли.	Снимите покровное стекло. Погрузите срезы на 5 минут в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре; проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите на воздухе и нанесите краситель снова.
	Неверная концентрация красителя.	Если краситель слишком яркий, разведите краситель в серии растворов (Номер в списке 06J290-010) до нанесения на срез.
	ПРИМЕЧАНИЕ: DAPI I в восемь раз более концентрированный, чем DAPI II.	
	Краситель слишком старый или подвергался воздействию света в течение длительного времени	Храните красители при -20ºC или ниже, в защищенном от света месте, используйте в таких же условиях. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Smoley SA, Brockman SR, Paternoster SF, et al. A novel tricolor, dual-fusion fluorescence in situ hybridization method to detect BCR/ABL fusion in cells with t(9;22)(q34;q11.2) associated with deletion of DNA on the derivative chromosome 9 in chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;148(1):1-6.
2. Primo D, Tabernero MD, Rasillo A, et al. Patterns of BCR/ABL gene rearrangements by interphase fluorescence in situ hybridization
(FISH) in BCR/ABL leukemias: incidence and underlying genetic abnormalities. *Leukemia.* 2003;17(6):1124-9

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Siu L, Ma E, Wong WS, et al. Application of tri-colour, dual fusion fluorescence in situ hybridization (FISH) system for the characterization of BCR-ABL1 fusion in chronic myelogenous leukaemia (CML) and residual disease monitoring. *BMC Blood Disord*. 2009;9:4.
4. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;12(6):996-1006.
5. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med*. 2006;8(1):16-23.
6. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline –Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
9. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Адрес уполномоченного представителя (AR)
ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Вейсбаден
Германия
Телефон: +49-6122-580

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

/Логотип/
Набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH)

RU

ИСХ. № 04N02-022
30-608527/R2

Набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH)
Исх. № 04N02-022
30-608527/R2

Описание используемых символов

ИСХ. №	Исходный номер
ПАРТИЯ	Номер партии
Диагностика in-vitro	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Использовать до
	Ограничение температур
	Внимание, см. сопроводительные документы
	См. руководство по эксплуатации
	Содержит достаточное количество тестов
In Vitro Test	Тест в лабораторных условиях (in vitro)
PRODUCT OF USA	Сделано в США
For In Vitro Diagnostic Use	Для использования при диагностике in vitro
GTIN	Глобальный номер предмета торговли
	Только для использования по назначению
	Опасность
	Опасность
	Опасность
	Опасность
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе
	Производитель

НАЗВАНИЕ
Набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизации ХЛЛ in situ (FISH)

ПРЕДУСМОТРЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ
Набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизации ХЛЛ in situ (FISH) предназначен для обнаружения делеции мишеней зондов LSI TP53, LSI ATM и LSI D13S319 и увеличения последовательности D12Z3 в образцах периферической крови пациентов с В-клеточным хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ). Этот анализ может быть использован для дихотомии ХЛЛ (группа 13q-, +12 или нормального генотипа по сравнению с группой 11q или 17p) и может быть использован в качестве вспомогательного средства при определении прогноза заболевания в сочетании с дополнительными биомаркерами, морфологией и другой клинической информацией.
Данный тест предназначен только для использования по назначению.

ОБЗОР ТЕСТА И ПОЯСНЕНИЯ
Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) - наиболее распространенная форма лейкоза у взрослых в развитых странах. Приблизительно у 1 из 202 мужчин и женщин будет диагностирован ХЛЛ в течение их жизни. [1] Средний возраст на момент постановки диагноза составляет приблизительно 70 лет. Показатели заболеваемости выше у мужчин (6,44 на 100 000 населения), чем у женщин (3,51 на 100 000 населения).1 Заболеваемость лейкемией наиболее высока среди белых нелатиноамериканского происхождения (13,6 на 100 000 населения); самая низкая заболеваемость - среди жителей азиатских и тихоокеанских островов (7,4 на 100 000 населения), а также коренных американских индейцев и жителей Аляски (7,3 на 100 000 населения).[2] Было выявлено, что белок-супрессор опухолевого роста p53 играет решающую роль в онкогенезе и реакции на химиотерапию при различных видах рака человека. У человека ген TP53 находится на коротком плече хромосомы 17 (17p13)[3] и, как сообщается, подавляется или мутирует в большом количестве человеческих раковых заболеваний.[4] Делеции области 17p, приводящие к аномалиям белка-супрессора опухолевого роста p53, были идентифицированы как один из самых неблагоприятных прогностических факторов для ХЛЛ, поскольку он предсказывает короткое время до прогрессирования заболевания, короткую продолжительность реакции, отсутствие реакции на терапию и краткосрочную общую выживаемость (ОВ).[5,6]
Делеция 17p чаще наблюдается у пациентов, прошедших лечение, чем у пациентов до лечения; ее частота увеличивается в течение заболевания, причем до 50% пациентов с рецидивирующим или рефрактерным заболеванием имеют эту делецию.[6] Примерно у 8–12% пациентов с ХЛЛ в терапии первого ряда наблюдаются del 17p.[6] Широко признано, что результаты лечения у пациентов с del 17p являются неблагоприятными.[7,8] Как только пациенты отторгают химиоиммунотерапию на основе аналога пурина, последующие методы лечения обеспечивают более краткосрочную выживаемость без прогрессирования заболевания (ВБПЗ).[8] На исход лечения сильно влияют несколько молекулярно-биологических особенностей и несколько неслучайных цитогенетических изменений и онкогенов. В частности, была определена группа сверхвысокого риска пациентов с ХЛЛ, имеющих делецию короткого плеча хромосомы 17 (del 17p) со средней продолжительностью жизни менее 2–3 лет.[8] В настоящее время большинство пациентов с диагнозом ХЛЛ имеют раннюю стадию заболевания (стадия по методу RAI: 0 или 1). Пациенты с ранней стадией ХЛЛ представляют собой гетерогенную группу; примерно 30–50% из них подвержены высокому риску ускоренного прогрессирования заболевания, а остальные могут жить десятилетиями и, возможно, никогда не будут нуждаться в терапии. Недавние исследования биологических характеристик лейкозных В-клеток привели к открытию новых прогностических инструментов (статус мутации гена тяжелой цепи с переменной областью иммуноглобулина, цитогенетические аномалии, оцениваемые методом флуоресцентной гибридизации in situ [FISH], и экспрессия белка протеинкиназы 70 Z-цепи), которые могут способствовать идентификации пациентов с ранней стадией заболевания, подверженных высокому риску раннего прогрессирования заболевания.[9] Профилактический анализ кариотипа выявляет хромосомные аберрации, связанные с ХЛЛ, только в 40–50% случаев. Использование FISH и других технологий позволило выявить геномные аномалии более чем в 80% случаев ХЛЛ.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Наиболее распространенными геномными аберрациями являются трисомия 12 и делеции 13q, 17p и 11q.[10-12]
Несколько опубликованных исследований показывают, что некоторые из этих хромосомных аномалий могут быть связаны с различными параметрами заболевания.[5,13-15] Набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизации ХЛЛ in situ (FISH) использует технологию ДНК-зондирования для определения статуса делеции зондовых мишеней для локус-специфического идентификатора (LSI) TP53 (содержащий p53 ген опухолевого белка, расположенный на хромосоме 17p), LSI ATM (содержащий ген мутантного при атаксии-телангиэктазии белка, расположенный на хромосоме 11q), и LSI D13S319 (содержащий маркер D13S319, расположенный на хромосоме 13q), а также для определения трисомии 12 с CEP12 (D12Z3 альфа-сателлитная ДНК, которая расположена на хромосоме 12).
Набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизации ХЛЛ in situ (FISH) включает в себя LSI 13q34 (содержащий лизосомально-ассоциированный ген мембранного белка 1, расположенный на хромосоме 13q) в качестве контрольного зонда.
Согласно практическому руководству Национальной комплексной онкологической сети США (NCCN) по неходжкинским лимфомам (V.2. 2015), которое представляет собой консенсусные рекомендации ведущих американских онкологических экспертов, флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) (включая аномалии, проверенные этим набором) является информативной как для прогнозирования, так и для определения терапии. Практическое руководство рекомендует использовать набор для флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) во время постановки диагноза, а также проводить повторную оценку с помощью набора FISH во время рецидива для прямых вариантов лечения (включая аномалии, проверенные с помощью этого набора).[16]

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОЦЕДУРЫ

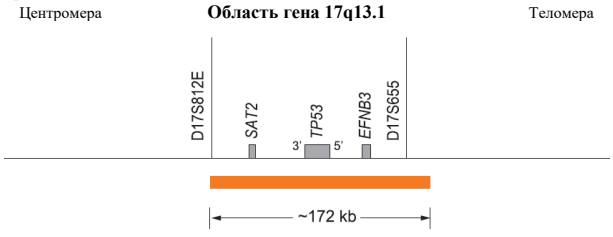
Описание ДНК-зонда

ДНК-зонды Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen

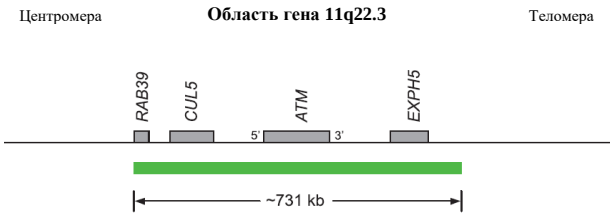
Зонд SpectrumOrange - меченый зонд LSI TP53 длиной примерно 172 т.н. (хр.17:7494395-7666098; февраль 2009
Калифорнийский университет в Санта Круз [UCSC] Браузер генома человека[17]) расположен в 17p13.1 и содержит полный ген TP53.
Зонд SpectrumGreen - меченый зонд LSI ATM длиной примерно 731 т.н. (хр.11:107801007-108531514; февраль 2009;
Калифорнийский университет в Санта Круз [UCSC] Браузер генома человека) расположен в 11q22.3 и содержит ген ATM.

ДНК-зонды Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/ CEP 12 SpectrumGreen

Зонд SpectrumOrange - меченый зонд LSI D13S319 длиной примерно 135 т.н. (хр.13:50602368-50737301; февраль 2009;
Калифорнийский университет в Санта Круз [UCSC] Браузер генома человека) расположен в 13q14.3.
Зонд SpectrumAqua - меченый зонд LSI 13q34 длиной примерно 612 т.н. (хр.13:113691322-114303435; февраль 2009;
Калифорнийский университет в Санта Круз [UCSC] Браузер генома человека) расположен в 13q34.
Зонд SpectrumGreen - меченый зонд CEP 12 расположен в центромере хромосомы 12.



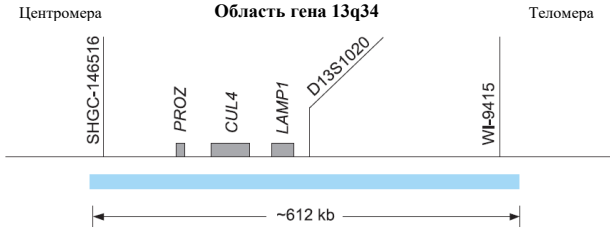
Зонд LSI TP53 SpectrumOrange



Зонд LSI ATM SpectrumGreen



Зонд LSI D13S319 SpectrumOrange



Зонд LSI 13q34 SpectrumAqua

Описание общих реагентов

Вещество для контрастного окрашивания DAPI II

Вещество для контрастного окрашивания DAPI II состоит из DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид) (ДНК-специфический флуорофор) и 1,4-фенилендиамина (средства, препятствующего выгоранию флуоресценции, используемого для уменьшения тенденции флуорофоров уменьшаться по степени выраженности) в глицериновой и фосфатной буферной солевой смеси.

NP-40

NP-40 - это неионное поверхностно-активное вещество, которое используется в водном постгибридизационном промывочном растворе.

20X Стандартная соль цитрата натрия (SSC)

20X SSC - это соль, состоящая из хлорида натрия и цитрата натрия. Используется для приготовления раствора 20X SSC и последующих разведений для денатурирования и растворов для промывки.

Описание техники

Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) - это метод, позволяющий визуализировать специфические последовательности нуклеиновых кислот в клеточном препарате. В частности, флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) включает в себя точный отжиг одноцепочечного, меченного флуорофором ДНК-зонда до последовательности-мишени комплементарного гена. Гибридизация зонда с центром клеточной ДНК видна при прямом обнаружении с помощью флуоресцентной микроскопии. Периферическая кровь пациентов с ХЛЛ прикрепляется к предметным стеклам микроскопа при помощи стандартных цитогенетических процедур. Полученные образцы ДНК денатурируют до одноцепочечной формы, а затем позволяют гибридизировать при помощи зондов из набора зондов Vysis для флуоресцентной гибридизации ХЛЛ in situ (FISH). После гибридизации свободный зонд удаляется серией промывок, а ядра окрашиваются при помощи DAPI, ДНК-специфичным окрашивающим средством, которое флуоресцирует синим цветом. Гибридизация зондов Vysis LSI TP53 SpectrumOrange, LSI ATM SpectrumGreen, LSI D13S319 SpectrumOrange, LSI 13q34 SpectrumAqua и CEP 12 SpectrumGreen рассматривается, используя флуоресцентный микроскоп, оснащенный соответствующими фильтрами возбуждения и эмиссионными фильтрами, позволяющий визуализировать оранжевый, зеленый и аква-флуоресцентный сигналы.
В одной клетке с нормальным числом копий целей зондов Vysis LSI TP53 SpectrumOrange и Vysis LSI ATM SpectrumGreen, ожидается два оранжевых и два зеленых сигнала. В одной клетке с нормальным числом копий целей зондов Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange и CEP 12 SpectrumGreen, ожидается два оранжевых и два зеленых сигнала. Перечисление сигналов зондов Vysis LSI TP53 SpectrumOrange, LSI ATM SpectrumGreen, LSI D13S319 SpectrumOrange и CEP12 SpectrumGreen обеспечивает механизм определения абсолютного числа копий мишеней зонда и наличия интересующих аберраций. Зонд LSI 13q34 SpectrumAqua функционирует как орган контроля процесса анализа и более подробно описан в разделе об органах контроля качества далее в этом документе.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РЕАГЕНТЫ

Предоставляемые материалы

Этот набор содержит пять реагентов, достаточных для обработки 20 анализов. Анализ определяется как одна область гибридизации зонда Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen размером 22мм x 22мм и одна область гибридизации зонда Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/CEP 12 SpectrumGreen размером 22 мм x 22 мм.

ДНК-зонды Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen

№ детали:	30-241051
Количество	1 флакон, 200 мкл/флакон (300 и 200 нг/10 мкл)
Хранение	-20°C (± 5°C), в защищенном от света месте
Состав	SpectrumOrange и SpectrumGreen - меченый флуорофором ДНК-зонды в гибридизационном буфере

ДНК-зонды Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/ CEP 12 SpectrumGreen

№ детали:	30-241050
Количество	1 флакон, 200 мкл/флакон (200, 400 и 25 нг/10 мкл)
Хранение	-20°C (± 5°C), в защищенном от света месте
Состав	SpectrumOrange, SpectrumAqua, and SpectrumGreen - меченый флуорофором ДНК-зонды в гибридизационном буфере

Вещество для контрастного окрашивания DAPI II

№ детали:	30-804811
Количество	1 флакон, 600 мкл/флакон (125 нг/мл)
Хранение	-20°C (± 5°C), в защищенном от света месте
Состав	DAPI (4',6-диамидино-2-фениндол дигидрохлорид) и 1,4-фенилендиамин в глицериновой и фосфатной буферной солевой смеси

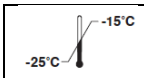
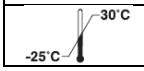
NP-40

№ детали:	30-804810
Количество	2 флакона, 2 000 мкл/флакон
Хранение	от -25°C до 30°C
Состав	NP-40 (неионный детергент)

Соль 20X SSC

№ детали:	30-804812
Количество	1 бутылка, 66 г
Хранение	от -25°C до 30°C
Состав	Хлорид натрия и цитрат натрия

ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ И ОБРАЩЕНИЮ С РЕАГЕНТАМИ

	Набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизации ХЛЛ in situ (FISH) должен храниться при температуре -20°C (± 5°C) в защищенном от света месте, когда он не используется.
	NP-40 и соль 20X SSC можно хранить отдельно при комнатной температуре.

Условия отгрузки

Набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизации ХЛЛ in situ (FISH) поставляется на сухом льду.

Если Вы получаете реагенты, которые находятся в состоянии, противоречащем рекомендациям этикетки, или которые повреждены, обратитесь в техническую службу компании Abbott Molecular.

ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Диагностика in vitro Медицинское изделие для диагностики in vitro.

Предназначено исключительно для диагностики in vitro.



ВНИМАНИЕ: Федеральное законодательство Соединенных Штатов ограничивает продажу и распространение данного устройства врачом или по его заказу, или клинической лабораторией; использование ограничено врачом или по его заказу.

Меры предосторожности



ВНИМАНИЕ: Этот препарат содержит компоненты человеческого происхождения и/или компоненты потенциальных возбудителей. Ни один известный метод испытаний не может дать полной гарантии того, что продукты, полученные от человека, или инактивированные микроорганизмы не передадут инфекцию. Эти реагенты и человеческие образцы должны обрабатываться как инфекционные с использованием безопасных лабораторных процедур, описанных в разделе «Биологическая безопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях»,[18] стандартах OSHA по переносимым с кровью патогенам,[19] документе Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) M29-A3, [20] и других соответствующих практических руководствах по биологической безопасности.[21] Поэтому все материалы, полученные от человека, должны считаться инфекционными.

Сюда входят следующие меры предосторожности, но не ограничиваясь ими:

- При работе с образцами или реагентами надевайте перчатки.
- Не пипетировать ртом.
- Не есть, не пить, не курить, не наносить косметику и не пользоваться контактными линзами в тех местах, где используются данные материалы.
- Очистите и продезинфицируйте розливы образцов, используя туберкулоцидное дезинфицирующее средство, такого как 1,0% гипохлорит натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[18]
- Обеззараживайте и утилизируйте все потенциальные возбудители инфекции в соответствии с местными, государственными и федеральными нормами.[21]

Компоненты маркировки, определяющие опасность:

- Формамид
- Полиэтиленгликоль октилфениловый эфир

Применяются следующие предупреждения:



Опасность

H302	Опасно при проглатывании.
H315	Вызывает раздражение кожи
H318	Вызывает серьезное повреждение глаз.
H411	Токсично для водных организмов. Последствия будут продолжительными.
P280	Надевать защитные перчатки/защитную одежду/ средства защиты глаз.
P264	После использования тщательно мыть руки.
P273	Не допускать попадания в окружающую среду.
P305+ P351+ P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промывайте водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы при их наличии и при возможности. Продолжайте промывать.
P310	Немедленно позвоните в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР/врачу.
P301+ P312	ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: При плохом самочувствии обратитесь в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР/ к врачу.
P302+P352	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: Промыть большим количеством воды.
P332+P313	При появлении раздражения кожи: Обратитесь к врачу.
P330	Прополощите рот.
P362	Снимите загрязненную одежду.
P501	Утилизируйте содержимое / контейнер в соответствии с местными нормативами.



Опасность

H360	Может повлиять на фертильность или навредить нерожденному ребенку.
P201	Перед использованием получите специальные инструкции.
P202	Не используйте устройство до тех пор, пока не будут прочитаны и изучены все меры предосторожности.
P280	Надевать защитные перчатки/защитную одежду/ средства защиты глаз.
P308+P313	При воздействии или потенциальном воздействии: Обратиться к врачу.
P405	Хранить под замком.
P501	Этот материал и его контейнер должны быть утилизированы безопасным способом.

Паспорт безопасности: Важная информация, касающаяся безопасного обращения, транспортировки и утилизации данного продукта, содержится в Паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорт безопасности вещества (ПБВ) для всех реагентов, входящих в комплект поставки, предоставляются по запросу из отдела технического обслуживания компании Abbott Molecular.

Предосторожность при обращении

- Набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизации ХЛЛ in situ (FISH) предназначен только для использования с образцами, которые были обработаны и сохранены в соответствии с описанием в этом вкладыше в упаковке.
- Не используйте набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизации ХЛЛ in situ (FISH) после истечения его срока годности.
- Необходимо следовать инструкциям во вкладыше в упаковке. Несоблюдение инструкций из вкладыша в упаковке может привести к ошибочным результатам.

Меры предосторожности в лаборатории

- Все биологические образцы должны рассматриваться как способные передавать возбудителей инфекции. Поскольку зачастую невозможно определить, какой из них может быть заразным, все человеческие образцы должны быть обработаны с соблюдением универсальных предосторожностей.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Гемолизированные образцы могут препятствовать получению правильной культуры для проведения стандартного цитогенетического анализа. Следует избегать воздействия на образцы кислот, сильных оснований или очень высоких температур. Такие условия, как известно, повреждают ДНК и могут привести к сбою анализа флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).
- Несоблюдение всех процедур денатурации, гибридизации и обнаружения стекол может привести к неприемлемым или ошибочным результатам.
- Вещество для контрастного окрашивания DAPI II содержит DAPI и 1,4-фенилендиамин.
- DAPI - это возможный мутаген, основанный на положительных генотоксических эффектах. Избегайте вдыхания, проглатывания или контакта с кожей. См. ПБВ для получения информации об особых предупреждениях.
- 1,4-фенилендиамин является известным кожным сенсибилизатором и возможным респираторным сенсибилизатором. Избегайте вдыхания, проглатывания или контакта с кожей. См. ПБВ для получения информации об особых предупреждениях.
- Флуорофоры легко обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы ограничить эту деградацию, храните стекла и наборы зондов в темноте и обрабатывайте все стекла и наборы зондов, содержащие флуорофоры, при уменьшенном освещении. Сюда входят все шаги, связанные с использованием гибридизированного стекла. Выполняйте все действия, не требующие освещения для манипуляций (инкубационные периоды, промывки и т. д.) в темноте или при пониженной освещенности.
- Набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизации ХЛЛ in situ (FISH) содержит формамид, тератоген. Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
- Калиброванные термометры необходимы для измерения температуры растворов и водяных ванн.
- Всегда проверяйте температуру промывочных растворов перед каждым использованием, измеряя температуру раствора в емкости Коплина с помощью калиброванного термометра.
- Все опасные материалы должны быть утилизированы в соответствии с руководящими документами учреждения по утилизации опасных отходов.

МЕТОДИКА АНАЛИЗА

Предоставляемые материалы

- Набор ДНК-зондов Vysis для флуоресцентной гибридизации ХЛЛ in situ (FISH) (Список № 04N02-022)

Требуемые, но не предоставляемые материалы

- Иммерсионное масло, подходящее для флуоресцентной микроскопии
- Этанол (100%). Хранить при комнатной температуре.
- Метанол
- Ледяная уксусная кислота
- Вода очищенная
- Каучуковый клей
- 12 н. раствор хлористоводородной кислоты (HCl)
- 1 н. или 2 н. раствор гидроксида натрия (NaOH)
- Формамид, высокой очистки
- Хлорид калия 0,075 М (KCl)

Лабораторное оборудование

- Стеклянные предметные стекла микроскопа, предварительно очищенные
- Покровное стекло 22мм x 22мм
- Микролитровая пипетка (от 1 до 10 мкл) и стерильные наконечники
- Таймеры
- Микроцентрифуга
- Клиническая центрифуга, способная достигать 250 x g и вмещать центрифужную пробирку объемом 15 мл
- Коническая пробирка 15 мл
- Градуированные цилиндры (от 100 мл до 1 000 мл)
- Водяные ванны (от 70 до 80°C)
- Водяная ванна (37°C)
- Пинцеты
- Одноразовый шприц
- Одноразовые пипетки (от 5 мл до 20 мл)
- Емкости Коплина / Вертикальные сосуды для окрашивания
- Флуоресцентный микроскоп оснащен рекомендуемыми фильтрами (см. раздел **«Оборудование и принадлежности для микроскопа»**)
- Калиброванный термометр
- Коробка с предметными стеклами с крышкой
- Магнитное перемешивающее устройство
- pH-метр
- индикаторные pH полоски способны считывать уровень pH от 7,0 до 8,0
- Вихревая мешалка
- Фильтрационные установки 0,45 мкм
- Инкубатор 37°C
- Увлажненная камера
- Столик с подогревом (45–50°C)
- Цитогенетическая сушильная камера (опционально)
- Микроцентрифужные пробирки
- Фазово-контрастный микроскоп
- Печь способная нагреваться до 90°C или эквивалент

Микроскопическое оборудование и принадлежности

Микроскоп Для просмотра результатов гибридизации необходим флуоресцентный микроскоп с осветителем отраженного света. Микроскоп должен быть проверен, чтобы убедиться, что он работает правильно, чтобы обеспечить оптимальный осмотр образцов при анализе флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) Микроскоп, используемый для обнаружения общих следов ДНК, таких как DAPI, йодид пропидия и квинакрин, может работать неправильно для анализов флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Рекомендуется регулярная очистка микроскопа и периодическое техническое обслуживание, особенно выравнивание лампы, техническим представителем изготовителя.

Источник света возбуждения Рекомендуемым источником возбуждения является 100-ваттная ртутная лампа или другая лампа с аналогичной интенсивностью и спектральной выходной мощностью. Следует проконсультироваться с техническим представителем изготовителя, чтобы убедиться в том, что система флуоресцентного освещения подходит для просмотра образцов анализа флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Регистрируют количество часов, в течение которых использовалась лампа, и заменяют ее до того, как номинальное время работы будет превышено. Убеждаются, что лампа правильно выровнена.

Объективы Используют масляные иммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥ 0,75 при использовании микроскопа со 100-ваттной ртутной лампой или другой лампой с аналогичной интенсивностью и спектральной выходной мощностью. Объектив с 40-кратным увеличением в сочетании с 10-кратными окулярами подходит для сканирования образца с целью выбора областей для определения числа частиц. Удовлетворительные результаты для определения числа сигналов FISH могут быть получены с помощью масляного погружного ахроматического объектива с 60/63 - кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло Иммерсионное масло, используемое с масляными иммерсионными объективами, должно быть предназначено по составу для низкой автофлуоресценции и специально для использования в флуоресцентной микроскопии.

Фильтры Гибридизация с зондами Vysis LSI TP53 SpectrumOrange, LSI ATM SpectrumGreen, LSI D13S319 SpectrumOrange, LSI 13q34 SpectrumAqua и CEP 12 SpectrumGreen областей ДНК целей отмечена оранжевой, аквамариновой и зеленой флуоресценцией. ДНК, которая не гибридизовалась с зондами, будет флуоресцировать синим цветом в результате окраски веществом для контрастного окрашивания DAPI II. Рекомендуемыми фильтрами для использования с набором зондов Vysis для флуоресцентной гибридизации ХЛЛ in situ (FISH) являются двухдиапазонный зеленый/оранжевый фильтр V2 Vysis, однодиаазонный фильтр DAPI Vysis, однодиаазонный оранжевый фильтр Vysis, однодиаазонный аква-фильтр Vysis и однодиаазонный зеленый фильтр Vysis или аналоги.

ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Перед подготовкой образцов обратитесь к разделу **ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ** данного вкладыша упаковки.

Подготовка рабочих реактивов

Растворы этанола (70%, 85% и 100%)

Готовят разведения 70% и 85% (об/об) этанола, используя 100% этанол и очищенную воду. Хранят готовые растворы при комнатной температуре в плотно укупоренных емкостях. Утилизируют исходный раствор через 6 месяцев или раньше, если раствор кажется мутным или загрязненным. Разведения в емкостях Коплина можно использовать до одной недели, если только не происходит испарения или раствор не становится разжиженным или мутным из-за чрезмерного использования.

Раствор 20X SSC

Используя 200 мл очищенной воды, растворяют 66 г солевого раствора 20X SSC в подходящем сосуде. Измеряют уровень pH при комнатной температуре с помощью pH-метра и при необходимости корректируют уровень pH до 5,3 ± 0,2 с помощью 12 н. раствора HCl. Переливают раствор в градуированный цилиндр и прибавляют очищенную воду до достижения конечного объема 250 мл. Смешивают и фильтруют приготовленный раствор через фильтрационную установку с размером пор 0,45 мкм. Хранят приготовленный базовый раствор при комнатной температуре. Утилизируют исходный раствор через 6 месяцев или раньше, если раствор кажется мутным или загрязненным.

Раствор 2X SSC

Тщательно смешивают 100 мл 20X SSC с 850 мл очищенной воды в подходящем сосуде. Измеряют уровень pH при комнатной температуре с помощью pH-метра, чтобы убедиться, что pH составляет 7,0 ± 0,2. При необходимости корректируют уровень pH с помощью 1 н. или 2 н. раствора гидроксида натрия. Прибавляют очищенную воду, чтобы довести конечный объем раствора до 1 л. Перемешивают и фильтруют с помощью фильтрационной установки с размером пор 0,45 мкм. Хранят приготовленный базовый раствор при комнатной температуре. Утилизируют исходный раствор через 6 месяцев или раньше, если раствор кажется мутным или загрязненным. Утилизируют раствор, используемый в анализе, в конце каждого дня.

Денатурационный раствор (70% формамид / раствор 2X SSC)

Тщательно перемешивают 49 мл формамида, 7 мл раствора 20X SSC и 14 мл очищенной воды. Измеряют уровень pH при комнатной температуре с помощью индикаторных полосок pH, чтобы убедиться, что pH составляет 7,0–8,0. Хранят приготовленный исходный раствор при температуре от 2 до 8°C. Перед каждым использованием необходимо с помощью индикаторной полоски pH убедиться, что уровень pH составляет от 7,0 до 8,0. Утилизируют раствор через неделю.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Промывочный раствор 0,4X SSC / 0,3% NP-40
Тщательно смешивают 20 мл раствора 20X SSC и 950 мл очищенной воды в подходящем сосуде. Прибавляют 3 мл NP-40 и тщательно перемешивают до полного растворения NP-40. Измеряют уровень pH при комнатной температуре с помощью pH-метра и корректируют уровень pH до 7,4 ± 0,1 с помощью 1 н. или 2 н. раствора гидроксида натрия. Прибавляют очищенную воду, чтобы довести конечный объем раствора до 1 л. Перемешивают и фильтруют с помощью фильтрационной установки с размером пор 0,45 мкм. Хранят приготовленный базовый раствор при комнатной температуре. Утилизируют исходный раствор через 6 месяцев или раньше, если раствор кажется мутным или загрязненным. Утилизируют раствор, используемый в анализе, в конце каждого дня.
Промывочный раствор 2X SSC / 0,1% NP-40
Используя подходящий сосуд, тщательно смешивают 100 мл раствора 20X SSC с 850 мл очищенной воды. Прибавляют 1 мл NP-40 и тщательно перемешивают до полного растворения NP-40. Измеряют уровень pH при комнатной температуре с помощью pH-метра и корректируют уровень pH до 7,0 ± 0,2 с помощью 1 н. или 2 н. раствора гидроксида натрия. Прибавляют очищенную воду, чтобы довести конечный объем до 1 л. Перемешивают и фильтруют с помощью фильтрационной установки с размером пор 0,45 мкм. Хранят приготовленный базовый раствор при комнатной температуре. Утилизируют исходный раствор через 6 месяцев или раньше, если раствор кажется мутным или загрязненным. Утилизируют раствор, используемый в анализе, в конце каждого дня.
Отбор и транспортировка образцов
Забор периферической крови должен проводиться в соответствии с руководящими принципами лаборатории. Инструкция по проведению лабораторных работ AGT Cytogenetics содержит рекомендации по сбору и обработке образцов.[22] В ней говорится, что допустимо собирать образцы периферической крови в пробирку для сбора крови с гепарином натрия. Для проведения анализа требуется один (1) мл периферической крови. Образцы могут быть обработаны немедленно или отправлены в холодных упаковках на хранение при температуре от 2 до 8°C до 96 часов до начала пробоподготовки. Образцы никогда не должны быть покрыты льдом или заморожены. Образцы, которые свернулись или не были отгружены подобающим образом, не должны использоваться.
Обработка образцов
ПРИМЕЧАНИЕ: Следует готовить свежий фиксатор (3:1 или 2:1 метанол:ледяная уксусная кислота) ежедневно.
1. Прибавляют 1 мл периферической крови в коническую центрифужную пробирку объемом 15 мл.
2. Медленно прибавляют 10 мл 0,075 М хлорида калия. Аккуратно перемешивают, перевернув пробирку несколько раз. Опционально: инкубируют пробирку(-и) в течение 10–20 минут при комнатной температуре или 37°C.
3. Медленно прибавляют 2 мл закрепляющего состава к взвеси отмытых клеток. Аккуратно перемешивают, перевернув пробирку несколько раз.
4. Центрифугируют от 8 до 12 минут при 1 000 – 1 200 об/мин (225–250 x g).
5. Извлекают и утилизируют все, кроме приблизительно 0,5–1,0 мл надосадочной жидкости, осторожно, не нарушая клеточной массы. Ресуспендируют клеточную массу, осторожно взбалтывая пробирку.
6. Медленно прибавляют 10 мл закрепляющего состава к взвеси отмытых клеток. Аккуратно, перевернув пробирку несколько раз.
7. Центрифугируют от 8 до 12 минут при 1 000 – 1 200 об/мин (225–250 x g).
8. Повторяют промывание фиксатора (шаги 5–7) еще два раза или до тех пор, пока фиксатор не станет прозрачным.
9. Ресуспендируют клеточную массу в фиксаторе. Регулируют объем клеточной суспензии до плотности, соответствующей приготовлению предметного стекла. При желании подготавливают тестовое стекло для проверки плотности клеток.
10. Дают образцу постоять в фиксаторе при комнатной температуре (от 15 до 30°C) не менее 10 минут, прежде чем приступить к приготовлению стекла.
11. Переходят к подготовке стекол, или, при необходимости, фиксированный сгусток можно хранить при температуре -20°C (± 5°C) до 24 месяцев. При необходимости, особенно после длительного хранения, промывают сгустки фиксатором перед приготовлением стекла.

Подготовка стекла
12. Для достижения оптимальных результатов можно использовать цитогенетическую сушильную камеру. Устанавливают прибор на температуру от 20 до 30°C с относительной влажностью воздуха от 30 до 50%. При отсутствии цитогенетической камеры могут быть использованы другие способы достижения оптимальной температуры и влажности для подготовки мишени.
13. Маркируют каждый слайд соответствующим образом.
14. Перед подготовкой предметного стекла убеждаются, что образец должным образом перемешан. Используя переносящую пипетку, вытесняют от 5 до 25 мкл клеточной суспензии на левую половину предварительно очищенного предметного стекла микроскопа, а от 5 до 25 мкл клеточной суспензии — на правую половину предметного стекла, образуя две области гибридизации. Дают предметному стеклу высохнуть.
15. Используя фазово-контрастный микроскоп, исследуют количество межфазных ядер в поле зрения под малым увеличением (объектив с 10-кратным увеличением). Для получения оптимальных результатов анализа рекомендуется использовать не менее 100 клеток в поле зрения под малым увеличением. Доводят клеточную суспензию до рекомендуемого количества межфазных ядер.
ПРИМЕЧАНИЕ: Оптимальный образец будет содержать мало или вообще не будет содержать дебриса и/или цитоплазмы. Ядра должны быть темными, серыми, плоскими и не преломляющими. Регулируют температуру, влажность и объем для достижения оптимальной морфологии ядер.
16. Выполняют термообработку стекол при температуре 90°C в течение 10 минут (опционально).

Подготовка цели образца
ПРИМЕЧАНИЕ: Начинают ручную процедуру денатурации зонда до завершения шага 19 этого раздела, чтобы гарантировать, что материалы имеют достаточно времени для оттаивания.
17. Переносят денатурационный раствор и раствор 2X SSC в отдельные емкости Коплина или удаляют ранее подготовленный денатурационный раствор из хранилища (от 2 до 8°C).
18. Переносят емкость(и) Коплина с денатурационным раствором на водяную баню. Нагревают до тех пор, пока внутренняя температура денатурационного раствора не составит 73 ± 1°C.
19. Переносят емкость(и) Коплина с раствором 2X SSC на водяную баню. Нагревают до внутренней температуры 37 ± 1°C. Подвергают стекла с образцами старению в растворе 2X SSC в течение 30 минут при температуре 37 ± 1°C. В качестве альтернативы стекла можно выдерживать в течение 2 минут в растворе 2X SSC, нагретом до 73°C ± 1°C.
ПРИМЕЧАНИЕ: Подтверждают температуру растворов с помощью калиброванного термометра. Погружают не более 4 стекол одновременно в каждую емкость Коплина.
20. Удаляют предметные стекла из раствора 2X SSC и немедленно переносят их в емкость(и) Коплина, содержащую 70% этанола, минимум на 1 минуту. После 70%-ного этанола необходимо перейти на 85%-ный этанол минимум на 1 минуту, а затем на 100%-ный этанол минимум на 1 минуту.
21. После обезвоживания в этаноле погружают предметные стекла с образцом в денатурационный раствор при температуре 73 ± 1°C на 5 минут. Начинают отсчет времени с момента добавления стекла в емкость Коплина.
ПРИМЕЧАНИЕ: Чтобы поддерживать надлежащую температуру в денатурационном растворе, денатурируют 4 стекла одновременно. Если стекол меньше 4, добавляют пустые стекла, которые находятся при комнатной температуре, чтобы довести общее количество до 4.
22. Удаляют стекла с образцами из денатурационного раствора и немедленно переносят их в емкость Коплина, содержащую 70% этанола, минимум на 1 минуту. После 70%-ного этанола необходимо перейти на 85%-ный этанол минимум на 1 минуту, а затем на 100%-ный этанол минимум на 1 минуту.
ПРИМЕЧАНИЕ: Держат предметные стекла в 100% этаноле до тех пор, пока не будут готовы высушить все предметные стекла и нанести зондовую смесь.

Денатурация зонда
23. Извлекают предварительно сформованные зондовые смеси из хранилища и дают реагентам достичь комнатной температуры.
24. Центрифугируют зонды в течение 2–3 секунд. Перемешивают и снова центрифугируют смеси в течение непродолжительного времени.
25. Помещают пробирки при температуре 73 ± 1°C на 5 минут.
26. Центрифугируют пробирки в течение 2–3 секунд.
27. Помещают пробирки на подогревательный столик с температурой 45–50°C до тех пор, пока не будут готовы применить зонд к целевому образцу.
ПРИМЕЧАНИЕ: Если стекла с образцами готовы к моменту денатурации зондов, немедленно применяют зонды к областям гибридизации на предметном стекле(ах).

Гибридизация
28. Извлекают предметные стекла из 100%-ного этанола.
29. Высушивают каждое стекло, прикладывая его нижним краем к бумажному полотенцу (или его эквиваленту) и вытирая нижнюю сторону (сторону, которая не содержит образец).
30. Переносят стекла на нагревательный столик с температурой 45–50°C на срок до 2 минут, чтобы выпарить оставшийся этанол.
31. Используя микролитровую пипетку, наносят 10 мкл зонда Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen на одну целевую область и накрывают покровным стеклом без введения пузырьков. Повторяют процедуру для зондовой смеси Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/CEP 12 SpectrumGreenю
32. Герметизируют покровные стекла с помощью шприца, наполненного резиновым клеем.
33. Помещают стекла в предварительно нагретую влажную камеру, плотно закрывают крышкой и инкубируют при температуре 37°C ± 1°C в течение 6–24 часов. В качестве альтернативы можно использовать влажный инкубатор с температурой 37°C.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Процедура промывки

34. Переносят достаточный объем 0,4 X SSC/0,3% NP-40 и 2X SSC/0,1% NP-40 в отдельные емкости Коплина, чтобы покрыть стекла. Переносят емкость(и) Коплина, содержащую 0,4 X SSC/0,3% NP-40, на водяную баню. Нагревают до тех пор, пока внутренняя температура раствора 0,4X SSC/0,3% NP-40 не составит 73 ± 1°C. Подтверждают температуру раствора с помощью калиброванного термометра. Используют 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре. Используют растворы только в течение 1 дня, а затем утилизируют.
35. Снимают покровные стекла с одного предметного стекла и немедленно погружают его в раствор 0,4 X SSC/0,3% NP-40. Перемешивают предметные стекла с образцом в емкости Коплина в течение 1–3 секунд. Повторяют процесс с другими стеклами (в общей сложности до 4 стекол). Начинают отсчет времени после погружения четвертого слайда.
    ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания надлежащей температуры в 0,4 X SSC/0,3% NP-40 промывают четыре предметных стекла одновременно. Если стекол меньше четырех, добавляют пустые стекла, которые находятся при комнатной температуре, чтобы довести общее количество до четырех.
36. Извлекают стекла через 2 минуты ± 30 секунд.
37. Погружают стекло(а) в емкость Коплина, содержащую 2X SSC/0,1% NP-40. Перемешивают предметные стекла с образцом в емкости Коплина в течение 1–3 секунд.
38. Извлеките слайд(ы) из раствора 2X SSC/0,1% NP-40 после того, как слайды были погружены в течение 5-60 секунд.

ПРИМЕЧАНИЕ: Перед промывкой дополнительных стекол убеждаются, что температура раствора 0,4 X SSC/0,3% NP-40 составляет 73 ± 1°C.

Процедура контрастного окрашивания

39. Высушивают каждое стекло, прикладывая его нижним краем к бумажному полотенцу (или его эквиваленту) и вытирая нижнюю сторону (сторону, которая не содержит образец).
40. Высушивают слайды на воздухе в темноте, под углом, чтобы облегчить испарение и предотвратить накопление раствора 2X SSC/0,1% NP-40, в течение максимум 2 часов.
41. Извлекают вещество для контрастного окрашивания DAPI II из хранилища и дают реагенту достичь комнатной температуры.
42. Перемешивают вещество для контрастного окрашивания DAPI II в течение 2–3 секунд.
43. Центрифугируют пробирку в течение 2–3 секунд.
44. С помощью микролитровой пипетки наносят 10 мкл вещества для контрастного окрашивания DAPI II на целевую область каждого образца на стекле и накрывают покровным стеклом. Повторяют для каждого стекла.
45. Оставляют минимум на 10 минут до начала микроскопического наблюдения.

Процедура архивирования

Хранят гибридизированные стекла при температуре -20°C (± 5°C) в защищенном от света месте. В этих условиях, стекла могут храниться в течение до 3 недель после нанесения контрастирующего вещества DAPI II без существенных потерь в интенсивности флуоресценции сигнала.

Изучение стекол

Просмотр стекол с помощью подходящего фильтра, установленного на оптимально работающем флуоресцентном микроскопе. Следующие наборы оптических фильтров позволят визуализировать флуорофоры, используемые при гибридизации.

Использование этого фильтра Vysis (или его эквивалента)...	**Позволяет добиться возбуждения и выделения...**
Однодиапазонный зеленый	Флурофор SpectrumGreen
Однодиапазонный аква	Флурофор SpectrumAqua
Однодиапазонный оранжевый	Флурофор SpectrumOrange
Отдельный DAPI	DAPI (4,6-Диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид)
Двухдиапазонный зеленый /оранжевый фильтр v2	Флуорофоры SpectrumOrange и SpectrumGreen

Штатная оценка стекол и определение числа частиц проводятся с использованием двухдиапазонного фильтра. Для отдельного ядра, если определенные зондирующие сигналы оказываются слабыми при использовании двухдиапазонного фильтра, рекомендуется использовать однодиапазонный фильтр для помощи в определении числа частиц.

Интерпретация и отчет о результатах

Контроль качества

Зонды, входящие в набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH), используются в качестве внутреннего органа контроля. Наличие по крайней мере одного сигнала гибридизации для зондов в каждой зондовой смеси гарантирует, что зонды функционируют правильно в условиях анализа, за исключением нуллисомии D13S319, когда обе копии мишени D13S319 удаляются. Зонд LSI 13q34 SpectrumAqua функционирует как контроль состояния делеции D13S319, дискриминации зондовой смеси и общего качества гибридизации.

Оценка соответствия цели

Оценка соответствия цели гибридизации выполняется с использованием следующих критериев. Если эти критерии не соблюдаются, то предметное стекло не должно оцениваться.

- **Морфология ядра:** Границы ядер клеток, как правило, должны быть различимыми и неповрежденными.
- **Фон:** Фон должен быть темным или черным и относительно свободным от флуоресцентных частиц или туманности.
- **Интенсивность зондирующего сигнала:** Сигналы должны быть яркими, компактными, круглой или овальной формы, четкими и легко оцениваемыми.

Подтверждение цели зонда

Непосредственно перед подсчетом числа сигналов каждой области гибридизации используют флуоресцентный микроскоп с осветителем отраженного света с объективом с 60/63-кратным или 100-кратным увеличением и аква-фильтром для определения и регистрации наличия или отсутствия аква-сигналов в области гибридизации. Это служит мерой контроля качества, гарантирующей, что правильный зонд был применен к области гибридизации и что правильная гибридизация типа LSI произошла даже тогда, когда обе копии мишени зонда Vysis LSI D13S319 отсутствуют (нет оранжевых сигналов). Аква-сигнал будет присутствовать только в области гибридизации зонда Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/CEP 12 SpectrumGreen, если появятся соответствующие условия гибридизации. В области гибридизации зонда Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen не должно быть никаких аква-сигналов.

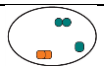
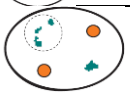
Подсчет сигналов

Используя соответствующие фильтры, перечисленные выше, каждый из двух технологов (считывателей) определяют и записывают образец сигнала, присутствующий в каждом из 100 ядер для обеих целей гибридизации. Первый считыватель оценивает ядра на половине мишени гибридизации (максимально точно определенной), а второй считыватель оценивает ядра на другой половине мишени гибридизации (максимально точно определенной). Руководство по подсчету двухцветных сигналов см. в Таблице 1.

- Отбирают только неповрежденные ядра, которые не свернуты, не перекрываются и не закупорены дебрисом.
- Избегают подсчета стекол или областей внутри стекол, которые имеют чрезмерную неспецифическую гибридизацию или большое количество ядер, которые имеют слишком мало или вообще не имеют сигналов.
- Не считают ядра со сгустками или помутнениями сигналов.
- Сигналы одного и того же цвета, которые соприкасаются, независимо от размера, считаются одним сигналом. Если небольшая нить сигнала соединяет разделенные сигналы, также считают, что это один сигнал.
- В области сигнала, если сигналы одного цвета не имеют промежутков больше ширины сигнала, считают их одним сигналом. Однако, если два сигнала одного цвета четко выражены, компактны, имеют одинаковые размер и интенсивность, четко разделены, при этом не видно ни одной соединительной нити сигнала, считают их двумя сигналами, даже если расстояние между сигналами меньше ширины сигнала.
- Сигналы одного и того же цвета могут быть разной интенсивности в данном ядре. Поэтому может возникнуть необходимость использовать соответствующий однопроходный фильтр и/или отрегулировать фокальную плоскость.
- Если есть какие-либо сомнения относительно того, следует ли считать клетку, то клетку не считают.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1. Руководство по учету двухцветных сигналов

Условные обозначения:	= Зеленый = Оранжевый
1 	Накладывающиеся ядра не считать.
2 	Считать как два оранжевых сигнала и два зеленых сигнала. Один оранжевый сигнал рассеян.
3 	Считать как два оранжевых сигнала и два зеленых сигнала. Один оранжевый сигнал разделен.
4 	Считать как один оранжевый сигнал и два зеленых сигнала. Один зеленый сигнал разделяется, и оранжевый сигнал разделяется.
5 	Считать как два оранжевых сигнала и один зеленый сигнал.
6 	Область сигнала определяется пунктирным кругом. В верхней области сигнала отсутствуют пробелы, превышающие интактную ширину зеленого сигнала, верхний сигнал считается как один зеленый. Считать как 2 оранжевых и 2 зеленых.
7 	Два близких оранжевых сигнала компактны и имеют одинаковую интенсивность и размер; считать как два оранжевых сигнала и два зеленых сигнала.

После записи результатов исследуется количество аномальных образцов сигналов, представляющих интерес для каждого считывателя, а также применяются следующие пошаговые правила для определения окончательного количества частиц 200 ядер. Правила комбинирования подсчетов и использования третьего считывателя приведены на Рисунке 1, а пороговые значения для включения третьего считывателя для аномального образца сигнала - в Таблицах 2 и 3.

Определение потребности в третьем считывателе

Количество аномальных оранжевых и зеленых образцов сигналов от каждого считывателя исследуется и сравнивается с пороговыми значениями, приведенными в таблице 2 и таблице 3.

Таблица 2. Нормальные пороговые значения для включения в третий считыватель для зонда Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen

Зонд/Цвет	Отклонение образца	Нормальное пороговое значение на 100 ядер	Отсутствие нормы
ДНК-зонд Vysis LSI TP53 SpectrumOrange	1 оранжевый сигнал (1R)[a]	7	17p-
Vysis LSI ATM SpectrumGreen	1 зеленый сигнал (1G)[b]	6	11q-

[a] Образец аномального сигнала для делеции TP53 - 1R. Любой образец, содержащий единичный сигнал R, независимо от количества сигналов G, считается аномальным образцом для делеции TP53.

[b] Образец аномального сигнала для делеции ATM - 1G. Любой образец, содержащий единичный сигнал G, независимо от количества сигналов R, считается аномальным образцом для делеции ATM.

Таблица 3. Нормальные пороговые значения для включения в третий считыватель для зонда Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/CEP 12 SpectrumGreen

Зонд/Цвет	Отклонение образца	Нормальное пороговое значение на 100 ядер[c]	Отсутствие нормы
Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange	1 оранжевый сигнал (1R)[a]	5,5	13q- (моносомия)
Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange	ноль оранжевых сигналов (0R)[a]	1,5	13q- (нуллисомия)
Vysis CEP 12 SpectrumGreen	3 зеленых сигнала (3G)[b]	2,5	+12

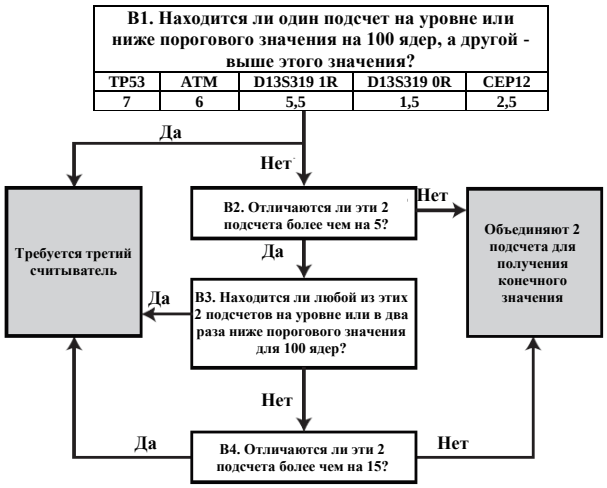
[a] Аномальные образцы сигналов для делеции D13S319 составляют 1R (моносомия) или 0R (нуллисомия). Любой образец, содержащий сигналы 1R или 0R, независимо от количества сигналов G, считается аномальным образцом для делеции D13S319.

[b] Аномальный образец сигнала для увеличения CEP 12 - 3G (трисомия). Любой образец, содержащий сигналы 3G, независимо от количества сигналов R, считается аномальным образцом для увеличения CEP 12.

[c] Значение составляет половину нормального порогового значения на 200 ядер (см. таблицы 4 и 5).

См. описание правил определения потребности в третьем считывателе на рис. 1.

Рисунок 1. Правила комбинирования подсчетов и использования третьего считывателя для каждого интересующего образца аномального сигнала



Для определения того, требуется ли третий считыватель, правила подсчета должны применяться к каждому маркеру зонда по отдельности. Подсчеты третьего считывателя используются только для конкретного маркера зонда, который требует третьего считывателя. Нормальное/ненормальное определение для других маркеров зонда выполняется с использованием подсчетов, выполненных первыми двумя считывателями.

Третий считыватель подсчитывает количество частиц 100 ядер в мишени гибридизации, если применимо любое из следующих условий:

- Один считыватель имеет ненормальное количество образцов сигнала на уровне или ниже порогового значения для 100 ядер, а другой считыватель имеет количество выше этого значения.
- Количество аномальных образцов сигналов, определяемых двумя считывателями, отличается более чем на 5 на 100 оцениваемых ядер, и любой из двух считывателей имеет количество аномальных образцов сигналов, меньшее или равное удвоенному предельному значению.
- Эти два считывателя имеют подсчеты аномальных образцов сигналов, которые отличаются более чем на 15 на 100 оцененных ядер.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Результаты
Количество наблюдаемых оранжевых и зеленых образцов сигналов от каждого из двух считывателей суммируется вместе, чтобы получить подсчет частиц для 200 ядер на образец. Когда для завершения оценки используется третий считыватель, две наиболее близкие друг к другу оценки будут объединены для получения подсчета для 200 ядер. Если любые два количества равноудалены от третьего количества, медианное значение удваивается и используется в качестве подсчета для 200 ядер.

Интерпретация результатов

Нормальное/ненормальное определение Нормальное/ненормальное определение выполняется для каждого образца путем сравнения количества ядер с наблюдаемыми аномальными образцами на 200 измеряемых ядер с заданным нормальным пороговым значением (таблица 4 и таблица 5). Если число ядер с определенным аномальным образцом сигнала превышает соответствующее ему нормальное пороговое значение, то результат является аномальным. Если число таких ядер меньше или равно нормальному пороговому значению, то результат считается нормальным.

Таблица 4. Нормальные пороговые значения для определения нормального/аномального значений для зонда Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen

Зонд	Отклонение образца	Нормальное пороговое значение на 200 ядер (%)	Отсутствие нормы
Vysis LSI TP53 SpectrumOrange	1 оранжевый сигнал (1R)	14 (7,0%)	17p-
Vysis LSI ATM SpectrumGreen	1 зеленый сигнал (1G)	12 (6,0%)	11q-

Таблица 5. Нормальные пороговые значения для определения нормального/аномального значений для зонда Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/CEP 12 SpectrumGreen

Зонд	Отклонение образца	Нормальное пороговое значение на 200 ядер (%)	Отсутствие нормы
Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange	1 оранжевый сигнал (1R)	11 (5,5%)	13q- (моносомия)
Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange	ноль оранжевых сигналов (0R)	3 (1,5%)	13q- (нуллисомия)
Vysis CEP 12 SpectrumGreen	3 зеленых сигнала (3G)	5 (2,5%)	+12

Определение классификации Деннера
См. таблицу 6, чтобы определить класс по классификации Деннера каждого
образца на основании обнаруженных отклонений от нормы.5

Таблица 6. Классификация Деннера

13q- (моносомия или нуллисомия) как единственное отклонение от нормы
Отсутствие цитогенетической аномалии
+12 без 17p- или 11q-
11q- без 17p-
17p-

Определение прогностической категории
См. таблицу 7 для определения прогностической категории (по действующему
руководству NCCN[16]) каждого образца.

Таблица 7. Определение прогностической

цитогенетической аномалии	Прогностическая категория
del(11q)	Неблагоприятная
del(17p)	Неблагоприятная
Нормальная	Нейтральная
+12	Нейтральная
del(13q) (как единственная аномалия)	Благоприятная

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) предназначен для использования в сочетании с дополнительными биомаркерами, морфологией и другой клинической информацией.
- Могут возникать и другие образцы сигналов, и метафазный анализ может быть полезен для характеристики таких образцов.
- Если образец имеет низкоуровневый аномальный образец FISH, рекомендуется использовать соответствующий однопроходный фильтр(ы) для подтверждения этого образца. Несоблюдение этой рекомендации может привести к неточному определению образцов сигналов.

ОСОБЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая специфичность
Аналитическая специфичность определяется как процент сигналов, которые гибридизуются к правильному локусу и к никаким другим местам. Этот тест является наглядной демонстрацией того, что каждый зонд гибридизуется именно к ожидаемому расположению хромосом.
Аналитическая специфичность зондов в наборе зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) для соответствующих хромосомных локусов-мишеней была установлена с использованием метафазных хромосом, полученных из культур периферической крови пяти кариотипически нормальных особей мужского пола на предметных стеклах микроскопа. Место гибридизации каждого сигнала FISH на хромосомах 20 последовательных метафазных ядер на каждом из 5 стекол было оценено одним технологом в общей сложности для 200 целевых локусов.
Для каждого зонда и образца было подсчитано количество сигналов FISH метафазной хромосомы, гибридизированных к правильному локусу, и количество сигналов FISH метафазной хромосомы, гибридизированных к неправильному локусу. Специфичность каждого зонда рассчитывали как количество сигналов FISH метафазной хромосомы, гибридизованных к правильному локусу, деленное на общее количество гибридизованных сигналов FISH метафазной хромосомы и умноженное на 100 для определения процента.
Аналитическая специфичность для каждого зонда из набора зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) составила 100% (200/200) (см. таблицу 8).

Таблица 8. Аналитическая специфичность

Зонд	Правильная цитогенетическая цель	Количество метафазных хромосомных сигналов: Гибридизируется к правильному локусу-мишени	Количество метафазных хромосомных сигналов: Всего гибридизированных сигналов	Специфичность (%)	Доверительный интервал для доверительной вероятности 0,95 (%)
Vysis LSI TP53 SpectrumOrange	17p13.1	200	200	100	(98,17, 100)
Vysis LSI ATM SpectrumGreen	11q22.3	200	200	100	(98,17, 100)
Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange	13q14.3	200	200	100	(98,17, 100)
Vysis LSI 13q34 SpectrumAqua	13q34	200	200	100	(98,17, 100)
Vysis CEP 12 SpectrumGreen	12p11.1-q11	200	200	100	(98,17, 100)

Аналитическая чувствительность
Аналитическая чувствительность определяется как процентное соотношение измеряемых межфазных ядер к ожидаемому нормальному образцу сигнала. Ожидаемый нормальный образец межфазного сигнала для всех зондов в наборе зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) составляет 2 сигнала на ядро.
Аналитическая чувствительность зондов в наборе зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) для соответствующих хромосомных локусов-мишеней была установлена с использованием межфазных ядер, полученных из культур периферической крови 25 кариотипически нормальных пациентов. Для каждого образца образцы сигналов 200 ядер оценивались путем подсчета количества оранжевых и зеленых сигналов, присутствующих для каждой мишени зонда. Каждый технолог оценивал 100 ядер на образец, в общей сложности 200 ядер на образец и 5000 измеряемых ядер нормальных образцов.
Чувствительность (с доверительными интервалами для доверительной вероятности 0,95, основанными на биномиальном распределении) рассчитывалась как процентное соотношение измеряемых межфазных ядер с ожидаемым образцом сигнала 2 сигнала на ядро. Таблица 9 показывает, что набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) имеет чувствительность 97,98% для зонда LSI TP53 SpectrumOrange, 98,68% для зонда LSI ATM SpectrumGreen, 98,60% для зонда LSI D13S319 SpectrumOrange и 98,94% для зонда CEP 12 SpectrumGreen.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Количество межфазных ядер		Чувствительность	
Зонд	С предполагаемым образцом сигнала	Подсчитываемые сигналы	Процент (%)	Доверительный интервал для доверительной вероятности 0,95 (%)
Vysis LSI TP53 SpectrumOrange	4899	5 000	97,98	97,55, 98,35
Vysis LSI ATM SpectrumGreen	4934	5 000	98,68	98,32, 98,98
Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange	4 930	5 000	98,60	98,23, 98,91
Vysis CEP 12 SpectrumGreen	4947	5 000	98,94	98,62, 99,21

Аналитическая характеристика нормальных значений отсечения

Нормальное пороговое значение, связанное с ДНК-зондами FISH, определяется как максимальный процент регистрируемых межфазных ядер с определенным аномальным образцом сигнала, при котором образец считается нормальным для данного образца сигнала. Нормальное пороговое значение выражается в процентах или фактическом количестве аномальных FISH образцов ядер на стандартное число испытанных ядер. Критерии, используемые для классификации ядра как пригодного для оценки, находятся в разделе **«Интерпретация и отчет о результатах»** данного вкладыша упаковки. Разделы **«Контроль качества»** и **«Подсчет числа сигналов»**, а также **Руководство по подсчету двухцветных сигналов (Таблица 1)** инструктируют конечного пользователя по процедуре определения того, является ли все стекло подходящим для подсчета числа сигналов и какие типы клеток/сигналов могут быть подсчитаны.

Нормальные пороговые значения зондов в наборе зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) для соответствующих хромосомных локусов-мишеней были установлена с использованием межфазных ядер, полученных из культур периферической крови 25 кариотипически нормальных пациентов. Для каждого образца образцы сигналов 200 ядер оценивались путем подсчета количества оранжевых и зеленых сигналов, присутствующих для каждой мишени зонда. Ожидаемый нормальный образец межфазного сигнала для всех зондов в наборе зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) составлял два сигнала на ядро. Поскольку популяция образцов не соответствует гауссовскому распределению, нормальное пороговое значение было рассчитано с использованием обратной бета-функции.[23] Было показано, что набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) имеет нормальные пороговые значения 14 из 200 ядер, оцененных (7,0%) для зонда LSI TP53 SpectrumOrange (1 сигнал), 12 из 200 ядер, оцененных (6,0%) для зонда LSI ATM SpectrumGreen (1 сигнал), 11 из 200 ядер, оцененных (5,5%) для зонда LSI D13S319 SpectrumOrange (1 Сигнал), 3 из 200 ядер, оцененных (1,5%) для зонда LSI D13S319 SpectrumOrange (0 сигналов) и 5 из 200 ядер, оцененных (2,5%) для зонда CEP 12 SpectrumGreen (3 сигнала). См. таблицу 10.

Таблица 10. Аналитическая характеристика нормальных значений отсечения

Зонд (Аномальный образец интересующего сигнала)	Количество оцениваемых ядер (n)	Максимальное количество ложноположительных образцов	Нормальное пороговое значение (на 200 ядер)	Нормальное пороговое значение (%)
ДНК-зонд Vysis LSI TP53 SpectrumOrange (1 сигнал)	200	8	14	7,0 (14/200)
Vysis LSI ATM SpectrumGreen (1 сигнал)	200	6	12	6,0 (12/200)
Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange (1 сигнал)	200	5	11	5,5 (11/200)
Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange (0 сигналов)	200	0	3	1,5 (3/200)
Vysis CEP 12 SpectrumGreen (3 сигнала)	200	1	5	2,5 (5/200)

Точность

Точность зондов в наборе зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) была установлена с использованием межфазных ядер, полученных из 2 отдельных образцов периферической крови, в которых отсутствовали del(17p13.1), del (11q22.3), del (13q14.3) и трисомия 12, а также 8 дополнительных образцов, из которых по крайней мере 2 образца имели одну из перечисленных аномалий (исследование точности 1).

Эта маскированная панель со стеклами от 10 представителей, состоящая как из негативных, так и из позитивных образцов, была использована для того, чтобы испытать 3 партии зондов Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen и Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/CEP 12 SpectrumGreen каждые 2 дня, а 1 из 3 партий - на третий день.

Для каждого образца образцы сигналов FISH 200 ядер оценивались путем подсчета количества оранжевых и зеленых сигналов, присутствующих для каждой мишени зонда.

Точность анализировалась отдельно для каждого образца на зонд, используя процент аномальных клеток с представляющим интерес образцом(ами) сигнала. Маскированная панель, созданная из 8 уникальных образцов, была протестирована с использованием трех различных партий ДНК-зондов FISH в течение 3 дней (исследование точности 2). Анализы точности для оспаривания нормальных пороговых значений проводился с использованием процента клеток с образцом интересующего сигнала и анализировались отдельно для каждого номера панели.

Средние и стандартные отклонения наблюдаемых процентов аномальных клеток отрицательных, положительных образцов и образцов, близких к пороговому значению, исследования точности 1 и исследования точности 2 показаны в таблицах 11–15.

Таблица 11. Анализ точности процентов аномальных образцов сигналов для зонда Vysis LSI TP53 SpectrumOrange [del(17p13.1)(1 сигнал)][a]

Исследование	Образец	Класс	n	Среднее значение	Компонент СО в разные дни (разных партий)	Компонент СО разных партий	Общее СО[b]
1	1	Отрицательный	7	2,6	1,23	0,00	1,23
1	2	Отрицательный	7	2,9	1,58	1,11	1,94
1	3	Отрицательный	7	3,8	3,48	0,00	3,48
1	4	Отрицательный	7	3,1	2,00	0,00	2,00
1	5	Отрицательный	7	2,7	0,76	0,65	1,00
1	6	Отрицательный	7	2,4	2,90	0,00	2,90
1	7	Отрицательный	7	2,1	1,38	0,00	1,38
1	8	Отрицательный	7	2,8	1,29	0,00	1,29
1	9	Положительный	7	29,8	5,15	4,54	6,87
1	10	Положительный	7	73,2	5,29	0,00	5,29
2	7	Положительный [c]	9	13,6	3,11	0,00	3,11
2	8	Положительный [c]	9	16,9	3,90	0,00	3,90

[a] Среднее и стандартное отклонения представлены в процентах отклонения образцов сигнала от нормы.

b Общая дисперсия - это сумма других компонентов дисперсии.

с Положительный образец почти у порогового значения.

Таблица 12. Анализ точности процентов аномальных образцов сигналов для зонда Vysis LSI ATM SpectrumGreen [del(11q22.3) (1 сигнал)][a]

Исследование	Образец	Класс	n	Среднее значение	Компонент СО в разные дни (разных партий)	Компонент СО разных партий	Общее СО[b]
1	1	Отрицательный	7	1,6	0,54	0,59	0,80
1	2	Отрицательный	7	1,8	0,59	0,00	0,59
1	3	Отрицательный	7	2,6	0,81	1,54	1,74
1	4	Отрицательный	7	2,1	2,25	1,08	2,50
1	5	Отрицательный	7	2,9	1,71	1,64	2,37
1	6	Отрицательный	7	1,1	1,34	0,00	1,34
1	7	Положительный	7	64,1	3,18	0,00	3,18
1	8	Положительный	7	13,7	4,31	5,10	6,68
1	9	Отрицательный	7	1,6	0,99	0,00	0,99
1	10	Отрицательный	7	1,5	1,51	0,00	1,51
2	1	Положительный [c]	9	8,4	3,12	0,91	3,25
2	2	Положительный [c]	9	7,8	3,00	1,89	3,55

[a] Среднее и стандартное отклонения представлены в процентах отклонения образцов сигнала от нормы.

[b] Общая дисперсия - это сумма других компонентов дисперсии.

[c] Положительный образец почти у порогового значения.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 13. Анализ точности процентов аномальных образцов сигналов для зонда Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange [del(13q14.3) (1 сигнал)][a]

Исследование	Образец	Класс	n	Среднее значение	Компонент CO в разные дни (разных партий)	Компонент CO разных партий	Общее CO[b]
1	1	Отрицательный	7	3,5	1,12	1,10	1,57
1	2	Отрицательный	7	2,2	1,69	0,00	1,69
1	3	Положительный	7	66,1	6,13	0,00	6,13
1	4	Положительный	7	20,1	4,88	0,00	4,88
1	5	Отрицательный	7	0,6	0,83	0,00	0,83
1	6	Отрицательный	7	0,4	0,64	0,00	0,64
1	7	Положительный	7	84,9	4,14	0,00	4,14
1	8	Отрицательный	7	0,6	0,97	0,00	0,97
1	9	Отрицательный	7	2,3	2,08	0,00	2,08
1	10	Положительный	7	53,6	8,57	0,00	8,57
2	5	Положительный [c]	9	5,8	2,49	0,00	2,49
2	6	Положительный [c]	9	14,9	2,46	1,15	2,72

[a] Среднее и стандартное отклонения представлены в процентах отклонения образцов сигнала от нормы.
[b] Общая дисперсия - это сумма других компонентов дисперсии.
[c] Положительный образец почти у порогового значения.

Таблица 14. Анализ точности процентов аномальных образцов сигналов для зонда Vysis LSI D13S319 SpectrumOrange [del(13q14.3) (0 сигналов)][a]

Исследование	Образец	Класс	n	Среднее значение	Компонент CO в разные дни (разных партий)	Компонент CO разных партий	Общее CO[b]
1	1	Отрицательный	7	0,0	0,00	0,00	0,00
1	2	Отрицательный	7	0,0	0,00	0,00	0,00
1	3	Отрицательный	7	0,2	0,21	0,38	0,44
1	4	Отрицательный	7	0,1	0,40	0,00	0,40
1	5	Отрицательный	7	0,0	0,00	0,00	0,00
1	6	Отрицательный	7	0,0	0,00	0,00	0,00
1	7	Отрицательный	7	0,2	0,32	0,00	0,32
1	8	Отрицательный	7	0,0	0,00	0,00	0,00
1	9	Отрицательный	7	0,0	0,00	0,00	0,00
1	10	Положительный	7	18,4	6,32	0,87	6,38
2	8	Положительный [c]	9	19,8	2,53	0,00	2,53

[a] Среднее и стандартное отклонения представлены в процентах отклонения образцов сигнала от нормы.
[b] Общая дисперсия - это сумма других компонентов дисперсии.
[c] Положительный образец почти у порогового значения.

Таблица 15. Анализ точности процентов аномальных образцов сигналов для зонда Vysis CEP 12 SpectrumGreen [трисомия 12 (3 сигнала)][a]

Исследование	Образец	Класс	n	Среднее значение	Компонент CO в разные дни (разных партий)	Компонент CO разных партий	Общее CO[b]
1	1	Отрицательный	7	0,2	0,42	0,00	0,42
1	2	Отрицательный	7	0,2	0,60	0,00	0,60
1	3	Отрицательный	7	0,0	0,00	0,00	0,00
1	4	Отрицательный	7	0,1	0,40	0,00	0,40
1	5	Положительный	7	21,6	6,07	0,00	6,07
1	6	Положительный	7	70,7	4,06	1,07	4,19
1	7	Отрицательный	7	0,0	0,00	0,00	0,00
1	8	Положительный	7	67,3	4,84	0,00	4,84
1	9	Отрицательный	7	0,0	0,00	0,00	0,00
1	10	Отрицательный	7	0,1	0,20	0,00	0,20
2	3	Положительный [c]	9	8,3	2,77	0,00	2,77
2	4	Положительный [c]	9	3,6	3,05	0,00	3,05

[a] Среднее и стандартное отклонения представлены в процентах отклонения образцов сигнала от нормы.
[b] Общая дисперсия - это сумма других компонентов дисперсии.
[c] Положительный образец почти у порогового значения.

Воспроизводимость I

Три отдельные лаборатории испытали маскированную панель со стеклами от 20 представителей, состоящую из образцов, представляющих пять классификаций Деннера (см. **таблицу 7**). Анализ проводился с использованием 10 стекол в день в течение 2 дней, что привело в общей сложности к 6 испытаниям по 3 испытательным площадкам. В каждой лаборатории были испытаны одинаковые партии зондов Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/ATM SpectrumGreen и LSI D13S319 SpectrumOrange/13q34 SpectrumAqua/CEP 12 SpectrumGreen. Результаты, приведенные в **таблице 16**, показывают общую согласованность с образцами, представляющими каждую из 5 классификаций Деннера.

Таблица 16. Общее согласование, от центра к центру при помощи зонда

Зонд (Отсутствие нормы)	Не согласуются[a]			В целом		
	Центр 1	Центр 2	Центр 3	Кол-во согласующихся[a]	Кол-во испытанных	Процент согласования
TP53 (17p-)	0	0	0	20	20	100
ATM (11q-)	2	0	0	18	20	90
CEP 12 (+12)	0	0	0	20	20	100
D13S319 1x (13q-)	2	0	0	18	20	90
D13S319 2x (13q-)	0	1	1	18	20	90

[a]Не согласуются = количество образцов, для которых результат одной площадки не согласуется с результатами других площадок. Согласуются = количество образцов, для которых результаты всех 3 площадок согласуются.

Воспроизводимость набора зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) для каждой прогностической категории продемонстрировала почти идеальное согласование[24] при использовании обобщенной каппа-статистики на трех тестовых площадках (таблица 17).

Таблица 17. Воспроизводимость набора зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) на основе обобщенной каппа-статистики

	Прогностическая категория	
Образец	Сомнительный/ благоприятный прогноз [a]	Неблагоприятный прогноз [a]
1	3	0
2	3	0
3	3	0
4	3	0
5	3	0
6	3	0
7	3	0
8	3	0
9	3	0
10	3	0
11	3	0
12	3	0
13	0	3
14	1	2
15	0	3
16	1	2
17	0	3
18	0	3
19	0	3
20	0	3
Каппа	0,86	
Эффективность	Почти идеальная[24]	

[a] количество площадок в зависимости от прогностической категории

Кроме того, данные были проанализированы по площадкам и зондам с использованием точного критерия Фишера. См. **таблицы 18** и **19.**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 18. Воспроизводимость набора зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) по участкам (на основе точного критерия Фишера)

	Прогностическая категория	
Область	**Сомнительный/Благоприятный[a]**	**Неблагоприятный[a]**
1	12	8
2	12	8
3	14	6
p-значение	0,8396	

a Количество членов панели в зависимости от прогностической категории.

Таблица 19. Воспроизводимость набора зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) по зондам на основе точного критерия Фишера

Зонд (Отсутствие нормы)	**Область**	**Отклонение от нормы обнаружено**	**Отклонение от нормы не обнаружено**	***p*-значение**
TP53 (17p-)	1	4	16	1,0000
	2	4	16	
	3	4	16	
ATM (11q-)	1	2	18	0,7495
	2	4	16	
	3	4	16	
D13S319 1x (13q-[x1])	1	6	14	0,8396
	2	8	12	
	3	8	12	
D13S319 2x (13q-[x2])	1	2	18	1,000
	2	3	17	
	3	3	17	
CEP 12 (+12)	1	5	15	1,000
	2	5	15	
	3	5	15	

Воспроизводимость II

Воспроизводимость набора зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) была оценена в трех независимых лабораториях путем тестирования кодированной рандомизированной панели образцов от 8 представителей (8 уникальных образцов, по 2 стекла каждый), которая состояла из шести уникальных TP53-положительных образцов с различными целевыми уровнями положительности (близкие к пороговым значениям 1 и 2, низкоположительные 1 и 2, высокие положительные 1 и 2) и двух уникальных TP53-отрицательных образцов периферической крови (нормальные 1 и 2). Панель образцов от 8 представителей состояла из 2 членов панели следующих групп:

Тип пробы	**Целевой процент положительных клеток**
нормальная	< 7%
около порогового значения положительного результата (17p-)	от 7% до 19%
слабоположительный (17p-)	от 20% до 50%
высокий положительный (17p-)	=> 50%

Для оценки на каждой из 3 площадок были использованы три партии реагентов набора зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH).

Как минимум два узкоспециализированных технолога на каждой из трех испытательных площадок произвели подсчет членов панели для TP53. Тестирование каждой партии реагентов проводилось в течение пяти (5) не последовательных дней в течение примерно 25 календарных дней.

На каждой площадке оценивали 240 стекол с образцами - в общей сложности 720. Для каждого стекла члена панели два считывателя производили подсчет образцов сигналов 100 ядер, что в общей сложности составило 200 ядер.

Процентная согласованность с ожидаемым расположением образцов была рассчитана для каждого члена панели по площадкам и для всех площадок вместе взятых. Эти результаты перечислены в Таблице 20. Процентная согласованность с ожидаемым расположением образцов была рассчитана для каждого члена панели по партиям и для всех партий вместе взятых. Эти результаты перечислены в Таблице 21.

Таблица 20. Общая воспроизводимость по областям

	Центр 1		**Центр 2**		**Центр 3**		**Комбинированная**		
Член панели	**Согласовано/Всего***	**% согласованности**	**Согласовано/Всего***	**% согласованности**	**Согласовано/Всего***	**% согласованности**	**Согласовано/Всего***	**% согласованности**	**95% ДИ**
Высокий положительный 1	30/30	100	30/30	100	30/30	100	90/90	100	(96,100)
Высокий положительный 2	30/30	100	30/30	100	30/30	100	90/90	100	(96,100)
Низкоположительный 1	30/30	100	30/30	100	30/30	100	90/90	100	(96,100)
Низкоположительный 2	30/30	100	30/30	100	30/30	100	90/90	100	(96,100)
Рядом с предельным значением 1	30/30	100	29/30	97	25/30	83	84/90	93	(86,97)
Рядом с предельным значением 2	30/30	100	29/30	97	29/30	97	88/90	98	(92,99)
Нормальный 1	30/30	100	27/30	90	30/30	100	87/90	97	(91,99)
Нормальный 2	30/30	100	27/30	90	30/30	100	87/90	97	(91,99)

* Количество образцов, согласующихся с ожидаемой фармакокинетикой, из общего числа испытанных

Таблица 21. Общая воспроизводимость по партиям

	Партия 1		**Партия 2**		**Партия 3**		**Комбинированная**		
Член панели	**Согласовано/Всего***	**% согласованности**	**Согласовано/Всего***	**% согласованности**	**Согласовано/Всего***	**% согласованности**	**Согласовано/Всего***	**% согласованности**	**95% ДИ**
Высокий положительный 1	30/30	100	30/30	100	30/30	100	90/90	100	(96,100)
Высокий положительный 2	30/30	100	30/30	100	30/30	100	90/90	100	(96,100)
Низкоположительный 1	30/30	100	30/30	100	30/30	100	90/90	100	(96,100)
Низкоположительный 2	30/30	100	30/30	100	30/30	100	90/90	100	(96,100)
Рядом с предельным значением 1	28/30	93	27/30	90	29/30	97	84/90	93	(86,97)
Рядом с предельным значением 2	29/30	97	29/30	97	30/30	100	88/90	98	(92,99)
Нормальный 1	29/30	97	30/30	100	28/30	93	87/90	97	(91,99)
Нормальный 2	229/30	97	29/30	97	29/30	97	87/90	97	(91,99)

* Количество образцов, согласующихся с ожидаемой фармакокинетикой, из общего числа испытанных

Клиническое применение

Традиционные клинические системы стадирования ХЛЛ Rai и Binet основаны на тяжести заболевания и были полезны для распределения пациентов в группы с одинаковыми сроками выживаемости.25,26 Эти системы, однако, не эффективны в прогнозировании выживаемости на ранних стадиях заболевания, когда диагностируется большинство случаев ХЛЛ. Это привело к разработке молекулярных маркеров, которые отличают тех пациентов, которые склонны к быстрому прогрессированию, от тех, у кого болезнь протекает медленно.

В базовом исследовании, проведенном Деннером и др. под названием “Геномные аберрации и выживаемость при хроническом лимфоцитарном лейкозе”, было обнаружено, что геномные изменения, определенные FISH, являются прогностическими для прогрессирования заболевания и общей выживаемости.[5] Многочисленные исследования подтверждают вывод Деннера и др. о том, что эта потеря маркеров 17p и 11q предсказывает снижение времени выживания по сравнению с другими группами Деннера, что определяется аберрациями FISH.[13-15] Такие исследования привели к включению тестирования FISH в руководства NCCN в качестве средства определения прогноза ХЛЛ. Прогностические категории ХЛЛ, в соответствии с действующим руководством NCCN, делят пациентов на 3 категории - благоприятные, нейтральные и неблагоприятные.[16]

В 2006 году в проспективном исследовании 151 пациента, проведенном Шанафельт и др. с использованием зондов Vysis FISH, была установлена корреляция между общей выживаемостью и категорией риска FISH для ХЛЛ при постановке диагноза.15 Пациенты были разделены на 2 прогностические группы. Они были отнесены к группе благоприятного/сомнительного прогноза FISH, если не было никаких хромосомных аберраций или если присутствовали только аберрации 13q- и/или +12. При наличии хромосомной аберрации 17p- или 11q- пациента помещали в группу неблагоприятного прогноза FISH. Неблагоприятный по сравнению с благоприятным/сомнительным прогнозами FISH (P=0,004), возраст на момент постановки диагноза (P=0,0006) и стадия Rai (P=0,0026) были достоверно связаны с общей выживаемостью после постановки диагноза в однофакторном анализе.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Когда все факторы были включены в многомерную регрессионную модель Кокса, каждый из трех факторов все еще оставался значимым: неблагоприятный или благоприятный/сомнительный прогноз FISH (P=0,00022), возраст на момент постановки диагноза (P=0,000024) и стадия Rai (P=0,00012).

Клиническая полезность набора зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) была установлена, главным образом, из-за его высокой согласованности с анализом, использованным в публикации Шанафельт и др.15 (См. раздел **Соответствие методов**.)

Кроме того, как отмечалось в исследовании Шанафельт, все пациенты с 17p- аномалией имели от 24 до 94% клеток с этой аномалией.[15] Поэтому эффект 17p- на очень низких уровнях определить не удалось. В публикации о пациентах с 17p- ХЛЛ до лечения Тэм и др. сообщили об общей выживаемости 92% в течении 3 лет для пациентов с < 25% удаленных 17p- ядер по сравнению с 54% для пациентов с ≥ 25% удаленных 17p- ядер (P=0,007).[7]

Соответствие методов

Было проведено исследование, сравнивающее метод, используемый в наборе зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH), и метод, используемый Шанафельт и др.15 Это исследование установило клиническую валидность набора зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH), продемонстрировав соответствие методу FISH, использованному в исследовании Шанафельт. Клиническая валидность набора зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) задокументирована в рецензируемой литературе.

В ходе исследования было проанализировано 64 образца, классификация которых по Деннеру была основана на предыдущих результатах с использованием метода FISH Шанафельт. В таблице 22 показано распределение анализируемых образцов по классификации Деннера.

Таблица 22. Количество образцов, проанализированных согласно Классификации Деннера

Классификация Деннера	Количество проанализированных образцов
13q- (моносомия или нуллисомия) как единственное отклонение от нормы	13
Нормальный (отсутствие цитогенетической аномалии)	12
+12 без 11q- или 17p-	14
11q- без 17p-	18
17p-	7

Каждому результату была присвоена классификация Деннера (табл. 6), и была определена прогностическая категория (см. табл. 7).

Процентная согласованность между набором зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) и методом FISH Шанафельт по прогностической категории составило 97% (62/64) при нижней границе одностороннего доверительного интервала для доверительной вероятности 0,95 90% (см. таблицу 23). Общая согласованность определялось как процент образцов, которые имели одну и ту же прогностическую категорию при тестировании с использованием набора зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) и метода FISH Шанафельт.

Таблица 23. Соответствие для прогностической категории[a]

	Стандартное испытание FISH методом Шанафельт		
Набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизации ХЛЛ in situ (FISH)	**Сомнительные/Благоприятные**	**Неблагоприятные**	**Всего**
Сомнительные/Благоприятные	38	1	39
Неблагоприятные	1	24	25
Всего	39	25	64

а Значения в этой таблице представляют собой количество образцов

Информация о клинических исследованиях

Клиническое исследование представляло собой многоцентровое исследование, в ходе которого были проанализированы образцы периферической крови пациентов с ХЛЛ. Эффективность венетоклакса (ингибитора BCL2) была исследована в несравнительном исследовании пациентов с ХЛЛ, прошедших лечение, с делецией 17p (исследование 1).

Исследование 1 проводилось с помощью набора зондов Vysis для флуоресцентной гибридизация ХЛЛ in situ (FISH) на образцах периферической крови пациентов с рецидивирующим/ рефрактерным ХЛЛ. В общей сложности 167 человек были обследованы на 17p del в основной когорте исследования 1.

В общей сложности 167 пациентов из исследования 1 были исследованы на предмет прогностической информации в соответствии с руководством NCCN. Пациенты с делецией 17p или делецией 11q классифицируются в неблагоприятную прогностическую категорию. Из 167 пациентов 8 попали в благоприятную прогностическую категорию, 8 - в нейтральную прогностическую категорию, 150 - в неблагоприятную прогностическую категорию, а 1 образец был неинформативен. Данные о прогностических категориях из исследования 1 представлены в таблице 24.

Таблица 24. Исследование 1 Прогностические категории обследуемых субъектов на основании FISH тестирования

Прогностическая категория	Количество
Неблагоприятная	150
Нейтральная	8
Благоприятная	8
Не содержащая новой информации	1
Комбинированная	167

Из 167 обследованных субъектов 107 были включены в исследование 1. Демографические и эпидемиологические характеристики исследуемой группы для исследования 1 представлены в таблице 25.

Таблица 25. Демографические характеристики и характеристики заболеваний в исследовании 1

Характеристика			N=107[a]
Возраст (годы)	Медиана (диапазон)	67	(37–85)
Раса, n (%)			
	Монголоидная	0	(0)
	Негроидная	3	(2,8)
	Европеоидная/неизвестно[b]	104	(97,2)
Пол, n (%)			
	Мужской	70	(65,4)
	Женский	37	(34,6)
Шкала ECOG-ВОЗ, n (%)			
	0	42	(39,3)
	1	56	(52,3)
	2	9	(8,4)
Количество предшествующих терапий			
	Медиана (диапазон)	2	(1–10)

[a] У одного пациента не было делеции 17p

[b] Раса неизвестна у одного пациента

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/, based on November 2013 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2014.
2. Leukemia and Lymphoma Society Facts Spring 2014.
3. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, et al. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. Nature 1986; 320:84-85.
4. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. p53 mutations in human cancers. Science 1991; 253:49-53.
5. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2000;343;1910-6.
6. Zenz T, Gribben JG, Hallek M, et al. Risk categories and refractory CLL in the era of chemoimmunotherapy. Blood. 2012;119:4101-7.
7. Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. Blood. 2009;114:957-64.
8. Stilgenbauer S, Zenz T. Understanding and managing ultra high-risk chronic lymphocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2010;2010:481-8.
9. Shanafelt TD, Byrd JC, Call TG, et al; Narrative review: initial management of newly diagnosed, early-stage chronic lymphocytic leukemia. Ann Intern Med. 2006;145:435-47.
10. Mehes G. Chromsome abnormalities with prognostic impact in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Pathol Oncol Res. 2005;11(4):205-10.
11. Stilgenbauer S. Bullinger L, Lichter P et al. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberration and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. Leukemia. 2002; 16(6):993-1007.
12. Ripolles L, Ortega M, Ortuno F et al. Genetic abnormalities and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. Cancer Genet Cytogenet.2006;171(1):57-64.
13. Krober A, Seiler T, Benner A et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2002;100(4):1410-6.
14. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. Blood. 2002; 100(4):1177-84.
15. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol. 2006; 24(28): 4634-41.
16. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™ NON-HODGKIN'S LYMPHOMAS (Version 2.2015). National Comprehensive Cancer Network, Inc. Available at: NCCN.org.
17. The University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser. http://genome.ucsc.edu/
18. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]
19. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline—Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
21. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
22. Margaret J. Barch, Turid Knutsen, Jack Spurbeck, The AGT Cytogenetics Laboratory Manual - Third Edition. June 1997.
23. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. Genet Med. 2006;8(1):16-23.
24. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 1977;33:159-174.
25. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1975;46(2):219-34.
26. Binet JL, Auguier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer. 1981;48(1):198-206.

Abbott Molecular Inc. является законным производителем набора зондов Vysis для флуоресцентной гибридизации ХЛЛ in situ (FISH).

Набор зондов Vysis для флуоресцентной гибридизации ХЛЛ in situ (FISH) и другие множественные продукты с ДНК-зондами FISH с прямой меткой подпадают под действие патентов США 5,663,319 и 5,491,224, присвоенных компании Abbott Molecular. Флуоресцентные зонды Vysis LSI и CEP с прямой меткой подпадают под действие патентов США RE40,494, 6,596,479, 7,115,709, 5,756,696 и 6,607,877, лицензирующих исключительно компанию Abbott Molecular Inc. попечительским советом Калифорнийского университета. Методы обнаружения нескольких сигналов гибридизации одновременно подпадают под действие патента США 6,203,977, эксклюзивно лицензирующего компанию Abbott Molecular Inc. Йельским университетом.

LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumAqua и SpectrumOrange являются торговыми марками группы компаний Abbott.

Техническая помощь

Для получения технической помощи позвоните в техническую службу компании Abbott Molecular по телефону +1-800-533-7042 в США и из-за пределов США +49-6122-580 или посетите всемирный веб-сайт компании Abbott Molecular по адресу: http://www.abbottmolecular.com.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines. Иллинойс 60018,
США

CE

EC|REP ABBOTL QMBH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Висбаден
Германия

© 2006, 2016 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

Январь 2016 г.
30-608527/R2

/Логотип: Abbott/

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis D7S486/CEP 7 FISH Probe Kit

en

REF 04N78-020

30-608510/R2

Vysis D7S486/CEP 7
FISH Probe Kit
REF 04N78-020
30-608510/R2

Используемые символы

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер лота
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Глобальный номер товара
	Количество достаточно для <n> тестов
	Температурный режим
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	Биологический риск
	См. инструкцию по применению
	Использовать до (срок годности)
	Авторизованный представитель в Европейском сообществе

Обслуживание клиентов: 1-800-553-7042

МЕЖДУНАРОДНАЯ СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ: ПОЗВОНИТЕ ВАШЕМУ РЕГИОНАЛЬНОМУ ПРЕДСТАВИТЕЛЮ.

НАЗВАНИЕ
Vysis D7S486/CEP 7 FISH Probe Kit

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis D7S486/CEP 7 FISH Probe Kit – это проба, предназначенная для характеристики образца и также для детекции зонда-мишени LSI D7S486 на хромосоме 7q31 и детекции зонда-мишени CEP 7 на хромосоме 7p11.1 – q11.1 в костном мозге и образцах периферической крови у пациентов с диагнозом острый миелолейкоз или миелодиспластический синдром. Результаты анализа предназначены для интерпретации квалифицированным патологом или цитогенетиком. Эта проба не предназначена для использования в условиях повышенного риска, таких как выбор терапии, прогнозирование терапевтического ответа или скрининга заболевания. Использование данной пробы для диагностики, прогноза, мониторинга или риска оценки не было выявлено.

ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ ТЕСТА

Атипичные сигналы паттернов FISH или 1RG или 1R2G это наиболее часто повторяющиеся аномалии при некоторых злокачественных гематологических новообразованиях. Vance и др. продемонстрировали, что Vysis LSI D7S468 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen детектирует 1R2G сигналы паттернов локусспецифической идентификации (LSI) D7S468 пробы-мишени на хромосоме 7q или 1R1G паттерны сигналов на хромосоме 7 (моносомия 7 хромосомы) в серии образцов костного мозга и образцах крови от пациентов с не пролеченной острой миелоидной лейкимией. В этом исследовании, 179 образцов костного мозга и 47 образцов периферической крови было протестировано. Среди 179 протестированных образцов костного мозга. 4 образца были атипичными для 1R2G паттернов FISH, ассоциированных с пробой-мишенью LSI D7S486 на хромосоме 7q с диапазоном атипичных ядер от 58 до 93%. Среди протестированных 179 образцов костного мозга, 5 образцов костного мозга были атипичными для 1R1G FISH паттернов с диапазоном атипичных ядер от 70 до 90%. Среди 47 протестированных образцов периферической крови, один образец периферической крови содержал 1R1G атипичный паттерн FISH в 11% ядер. В дополнении, 3 образца периферической крови были атипичными для 1R2G FISH паттернов с диапазоном атипичных ядер от 37% до 96%. Cherry и др. сообщил, что с помощью Vysis LSI D7S486 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen Probes детектировали 1R2G в трех случаях миелодисплатического синдрома у пациентов с диапазоном атипичных ядер от 22,5 до 44% костного мозга и также детектировали 1R1G у двух пациентов с диапазоном атипичных ядер от 23 до 87,5%. Теффери и и др. описали 2 случая миелофиброзиса с миелоидной метаплазией у пациентов с 9% и 16% ядер костного мозга с 1R2G с атипичными паттернами сигналов. Образцы периферической крови от пациентов с миелоидной метаплазией с 16% атипичных ядер костного мозга, 27% ядер 1R2G содержали атипичные сигналы паттернов. Образцы периферической крови от пациентов с 9% 1R2G костный мозг были определены как типичный. Однако, автор заявил, что процент атипичных ядер возможно был ниже предела обнаружения в этих образцах периферической крови.

В наборе Vysis D7S468/ CEP 7 FISH Probe используется ДНК-зонд для технологии обнаружения мишени для LSI D7S486 (7q31) на хромосоме 7q и для обнаружения мишени на CEP 7 (7q11.1-q11.1) на хромосоме 7.

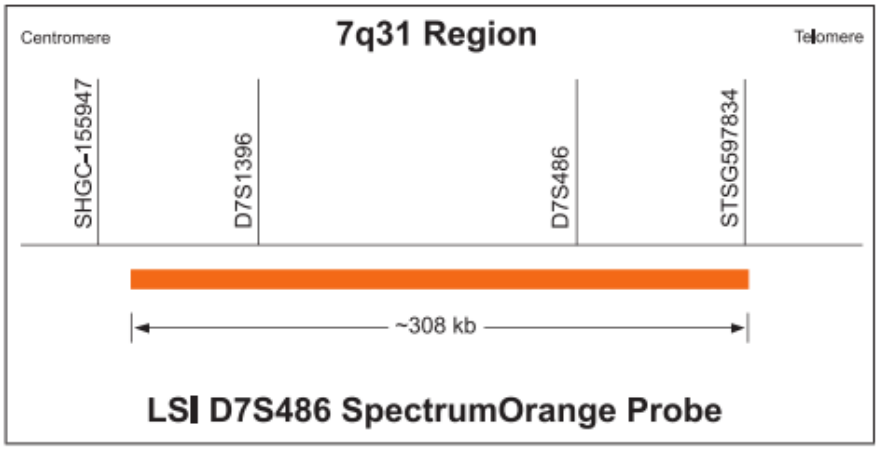
БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ПРОЦЕДУРЫ

ОПИСАНИЕ ДНК-пробы

LSI D7S468 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen Probes

Vysis LSI D7S468 SpectrumOrange/ CEP 7 SpectrumGreen Probes это смесь SpectrumOrange D7S468 (7q31) и SpectrumGreen CEP 7 пробы (7p11.1-q11.1). Меченая флуорохромом SpectrumOrange LSI D7S486 проба размеров приблизительно 308 Kb в длину (CHR7:115983468-115675366; февраль Ассамблея 2009 UCSC Human геном Browser).

Меченая флуорохромом зонд CEP 7 нацелен на альфа D7Z1 сателлитную последовательность на центромере хромосомы 7.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ РЕАГЕНТОВ

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer содержит сульфат декстрана, формамид, и стандартный цитрат натрия (SSC), который используется для инициирования быстрой специфической гибридизации.

DAPI II Counterstain

DAPI II состоит из DAPI (4', 6-диамидино-2 фенилиндол •2HCl) (ДНК-специфический флуорофор) и 1,4-фенилендиамин (антифадное соединение, используемое для уменьшения склонность флуорофоров к снижению интенсивности) в глицерине и забуференная фосфатом смесь.

NP-40

NP-40 представляет собой неионное поверхностно-активное вещество, которое используется для постигибридизационной отмывки.

20X SSC соль

20X SSC соль состоит из хлорида натрия и цитрата натрия. Он используется для приготовления 20X раствора SSC и последующих разведений для приготовления моющих растворов.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ

FISH - это метод, позволяющий визуализировать специфическую нуклеиновую последовательность внутри клеточного препарата. В частности, FISH включает точный отжиг одноцепочечного, меченного флуорофором зонда ДНК комплементарной сиквенсовой последовательности. Гибридизация зонда с сайтом клеточной ДНК видима при прямой детекции с использованием флуоресцентной микроскопии. Интерпретация результатов FISH должна быть сделана с использованием соответствующего контроля и аналитических методов, а также принимая во внимание рассмотрение других данных клинических и диагностических исследований.

Образцы костного мозга или клеток периферической крови, фиксированные на слайдах микроскопа с использованием стандартных цитогенетических процедур используются для этого анализа. Полученный образец ДНК денатурируется до одноцепочечной формы и впоследствии гибридизуется с зондами Vysis D7S486 /CEP 7 FISH Probe Kit. После гибридизации несвязанный зонд удалятся путем серии промывок, а ядра окрашиваются DAPI II, ДНК-специфическое окрашивание, которое флуоресцирует синим цветом. Гибридизация Vysis LSI D7S486 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen пробы визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, оснащенного соответствующими фильтрами возбуждения и эмиссии, позволяющие визуализировать оранжевый и зеленые флуоресцентные сигналы. В клетке с типичным числом копий Vysis LSI D7S486 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen таргетных мишеней, ожидается 2 оранжевых (2R) сигнала (D7S486) и 2 зеленых (2G) сигнала (CEP 7). В клетке с нетипичными числом копий Vysis LSI D7S486 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen таргетных мишеней, ожидается 1R1G или 1R2G сигналы. Могут наблюдаться интерфазные паттерны FISH сигналов, отличные от 1R1G или 1R2G. Метафазный анализ может быть полезен при интерпретации этих результатов.

РЕАГЕНТЫ

Необходимые материалы

Этот набор содержит 5 реагентов, достаточных для проведения 20 анализов. Анализ определяется как одна из 22мм×22мм Vysis LSI D7S486 SpectrumOrange /CEP 7 SpectrumGreen областей гибридизации зондов.

Vysis LSI D7S486/CEP 7 Probes в буфере Tris-EDTA

Номер лота	30-171002
Количество	1 флакон, 20 мкл/флакон (100 и 200 нг/мл)
Хранение	-20°C (±5°C) в защищенном от света месте
Состав	SpectrumOrange и SpectrumGreen меченые флуорохромом ДНК-пробы и буфере Tris-EDTA

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Номер лота	30-804813
Количество	1 флакон, 150 мкл/флакон
Хранение	-20°C (±5°C)
Состав	Декстрана сульфат, формамид, SSC

NP-40

Номер лота	30-804810
Количество	2 флакона, 2000 мкл/флакон
Хранение	-25°C до 30°C
Состав	NP-40 (неионный детергент)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

20X SSC Соль

Номер лота	30-804812
Количество	1 флакон, 66г/флакон
Хранение	-25°C до 30°C
Состав	Хлорид натрия и цитрат натрия

ИНСТРУКЦИЯ ПО ХРАНЕНИЮ И ОБРАЩЕНИЮ С РЕАГЕНТАМИ



Vysis D7S486/CEP 7 FISH Probe Kit хранится при температуре -20°C (±5°C) в защищенном от света месте, если не используется.



NP-40 и 20X SSC соль хранится при температуре -20°C (±5°C) или отдельно при комнатной температуре.

- Если реагенты получены в состоянии, противоречащем рекомендациям на этикетке, или если они повреждены, свяжитесь со службой технической поддержки Abbott Molecular.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD **Медицинское оборудование для диагностики in vitro**

Использовать только для in vitro диагностики.

Внимание:

• Результаты анализа предназначены для интерпретации только квалифицированным патологом или цитогенетиком.

• Это устройство не предназначено для использования в условиях повышенного риска, таких как выбор терапии, прогнозирование терапевтического ответа или скрининг заболевания.

• Использование этого набора для диагностики, мониторинга или оценки риска не было установлено.



Внимание: Федеральный закон ограничивает продажу этого набора или по приказу врача или другого практикующего лица, лицензированного в соответствии с законодательством штата в котором он практикуется, чтобы использовать или заказать использование этого набора.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Vysis LSI D7S468 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen Probes



ВНИМАНИЕ: данный препарат содержит полученные от человека и/или потенциально инфекционные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может гарантировать, что продукты, полученные от человека, или инактивированные микроорганизмы не инфицированы. Поэтому все биоматериалы человека должны рассматриваться как потенциально инфекционные. Рекомендуется обращаться с этими реагентами и биоматериалами человека в соответствии со стандартом для гемоконтактных патогенов Управления США по охране труда и промышленной гигиене (OSHA Standard on Bloodborne Pathogens).[8] При работе с материалами, содержащими инфекционные агенты, следует соблюдать правила биобезопасности, уровень 2, или другие соответствующие правила биобезопасности.[10]

Эти меры включают, но не ограничиваются следующим:

- Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите, не пользуйтесь косметикой и не дотрагивайтесь до контактных линз в помещениях, где производятся работы с этими материалами.
- Вытирайте и дезинфицируйте все места, куда попадают капли образцов, туберкулецидным дезинфецирующим средством, например, 1,0% натрия гипохлорита, или другим соответствующим дезинфецирующим средством.[7]
- Деконтаминируйте и утилизируйте все потенциально все потенциально инфекционные материалы в соответствии с местными и государственными законами[9].

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

NP-40 Опасность



Вызывающие опасность компоненты маркировки: Тритон X-100

H302 Опасно при проглатывании

H315 Случаи повреждения кожи

H318 Вызывает повреждение глаз

H411 Токсично для водных организмом с долгосрочными последствиями



P280 Надевайте защитные перчатки, защитную одежду, защиту для глаз

P264 Тщательно мойте руки после работы

P273 Избегайте попадания в окружающую среду

P305+ При попадании в глаза: Тщательно промойте водой в течении нескольких минут.

P351+ Снимите контактные линзы, если они есть.



P338 Продолжайте промывать.

P310 Незамедлительно позвоните в центр токсикологии или обратитесь к врачу.

P301+P312 При проглатывании: позвоните в центр токсикологии или обратитесь к врачу при плохом самочувствии.

P302+P352 При попадании на кожу: Интенсивно промыть водой

P332+P313 При раздражении кожи: обратитесь к врачу.

P330 Прополощите рот

P362 Снимите загрязненную одежду и помойте перед повторным использованием.

P501 Этот материал и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer



Внимание

Вызывающие опасность компоненты маркировки: Формамид

H360 Может влиять на плод ребенка

P201 Получите специальные инструкции перед использованием

P202 Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности

P281 Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы

P308+P313 В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.

P405 Хранить в закрытом виде.

P501 Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

ПАСПОРТА БЕЗОПАСНОСТИ: Важная информация по безопасности, хранению, транспортировке и утилизации содержится в Паспортах Безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (MSDS) для всех реагентов, представленных в комплекте, доступны по запросу от Службы Технической поддержки Abbott Molecular.

Лабораторные меры предосторожности:

- Все биологические образцы должны рассматриваться как потенциально опасные инфекционные агенты. Поскольку зачастую невозможно знать, какой из агентов является потенциально опасным, все биологические образцы должны быть обработаны с соблюдением универсальных мер предосторожности.
- Следует избегать взаимодействия образцов с кислотами, сильными основаниями, или действию высоких температур. Такие условия могут привести к разрушению ДНК и к неправильным результатам FISH исследования.
- Несоблюдение всех процедур денатурации, гибридизации, детекции может привести к недопустимым или ошибочным результатам исследования.
- Контркраситель DAPI II содержит DAPI и 1,4-фенилендиамин
- DAPI является возможным мутагеном, основанным на положительных генотоксических эффектах. Избегать вдыхания, проглатывания или контакта с кожей. Обратитесь к паспортам безопасности для конкретных предупреждений.
- 1,4-фенилендиамин является известным кожным сенсибилизатором и возможным респираторным сенсибилизатором. Избегать вдыхания, проглатывания или контакта с кожей. Обратитесь к паспортам безопасности для конкретных предупреждений.
- Флуорофоры легко распадаются под действием света. Для предотвращения этого распада, храните слайды и пробы в темноте, и обработка всех слайдов и наборов зондов должна осуществляться в защищенном от света месте. Выполните все шаги, которые не требуют света (периоды инкубации, отмывки и т.д.) в темноте или при минимальном освещении.
- Vysis D7S486/CEP 7 FISH Probe Kit содержит формамид, тератоген. Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Калибровочные термометры предназначены для измерения температуры растворов, водяных бань и инкубаторов.
- Всегда проверяйте температуру промывочных растворов перед использованием, измеряя температуру растворов в сосудах Коплина с калибровочными термометрами.
- Все опасные материалы должны быть утилизированы в соответствии с правилами утилизации опасных веществ.
- Перед использованием Vysis D7S486/CEP 7 FISH Probe Kit рекомендуется проверить верхний контрольный предел.

АНАЛИЗ

Необходимые материалы

- Vysis D7S486/CEP 7 FISH Probe Kit (Номер лота 04N78-020)

Необходимые, но не поставляемые материалы

Лабораторные реагенты:

- Имерсионное масло для флуоресцентной микроскопии
- 100% этанол. Хранить при комнатной температуре
- Очищенная вода
- Клей
- 12 NHCl
- 1 N NaOH

Лабораторное оборудование:

- Чистые силанизированные или положительно заряженные предметные стекла
- Покровные стекла 22 мм x 22 мм
- Пипеттор (1–10 мкл) и стерильные наконечники
- Таймер
- Микроцентрифуга
- Градуированные цилиндры (от 100 мл до 1000 мл)
- Водяная баня (70°C to 80°C)
- Пинцет
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Одноразовые наконечники (от 5 мл до 20 мл)
- Сосуды Коплина
- Флуоресцентные микроскопы с рекомендуемыми фильтрами (см. раздел Оборудование для микроскопа)
- Калибровочные термометры
- Коробочка для слайдов с крышкой и осушителем
- Магнитная мешалка
- pH метр
- Вортекс
- Фильтры 0,45 μm
- Инкубатор 37 °C
- Слайды (45 до 50°C)
- Цитогенетическая сушильная камера или вытяжной шкаф
- Термобрайт
- Карты влажности для Термобрайт
- Пробирки для микроцентрифуги
- Фиксатор метанол/уксусная кислота
- Фазово-контрастный микроскоп
- Поглотитель влаги

Микроскоп и дополнительные устройства

Микроскоп: для визуализации результатов гибридизации требуется флуоресцентный микроскоп с освещением объекта сверху. При наличии флуоресцентного микроскопа необходимо убедиться в том, что он сможет обеспечить оптимальную визуализацию микропрепаратов с флуоресцентной гибридизацией in situ. Обычные красители для ДНК, например, DAPI, пропидиум йодид и хинакрин могут не подойти для FISH.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рекомендуется периодически приглашать представителя технического отдела фирмы-производителя микроскопа для очистки и проверки его работы, особенно для регулировки ртутной лампы.

Возбуждающий источник света: в качестве возбуждающего источника рекомендуется использовать ртутную лампу 100 Вт. Технический представитель производителя должен все проверить, чтобы убедиться, что система флуоресцентного освещения подходит для просмотра образцов для анализа FISH. Запишите количество часов, в течение которых использовалась лампочка, и замените лампочку, если она превышает расчетное время. Убедитесь, что лампа правильно выровнена.
Объективы: для микроскопа с ртутной лампой 100 Вт или лампой с длительным сроком эксплуатации 100 Вт используйте масляно-иммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами ≥0,75. Для сканирования подходит объектив с 40-кратным увеличение и окуляры с 10-кратным увеличением. Для получения удовлетворительных результатов для визуализации FISH используйте масляно-иммерсионный ахроматический объектив с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: иммерсионное масло, используемое совместно с иммерсионными объективами, должно подходить для низкого уровня аутофлуоресценции и должны быть предназначено специально для флуоресцентного микроскопа.

Фильтры: Гибридизация пробы Vysis D7S486/CEP 7 FISH Probe Kit к таргетному региону ДНК обозначается оранжевым и зеленым сигналом флуоресценции соответственно. Гибридизация пробы SpectrumGreen к таргетному региону ДНК зеленым сигналом обозначается флуоресценция. Присутствие всех других участков ДНК будет флуоресцировать голубым сигналом как результат окрашивания контркрасителем DAPI II.

Рекомендованные фильтры для использования с зондом Vysis D7S486/CEP 7 FISH Probe Kit это Vysis тройной фильтр Orange/Green/DAPI, Vysis Двойной фильтр Orange/Green, Vysis Одиночный Green фильтр и Vysis Одиночный Orange фильтр.

Процедура анализа
Соблюдайте меры предосторожности, указанные в упаковке перед взятием образцов для работы.
ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ:
Приготовление растворов этанола (70%, 85%, и 100%).
Подготовить объем / объемы разведения 70% и 85% с использованием 100% этанола и очищенной воды. Хранить при комнатной температуре в плотно закрытом контейнере если не используете. Растворы могут быть использованы в течение 1 недели, если не происходит испарение или раствор не становится разбавленным или мутным из-за многократного использования.
20X SSC раствор
Смешайте 66 г 20X SSC и 200 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCI, если это необходимо. Доведите объем до 250 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

0.4X SSC/0.3% NP-40 Wash Solution
Смешайте 20 мл 20X SSC и 950 мл очищенной воды. Добавьте 3 мл NP-40 пока NP-40 полностью не растворится. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью 1 N NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.
2X SSC/0.1% NP-40 Wash Solution
Смешайте 100 мл 20XSSC (pH 5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой в 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЗАБОР ОБРАЗЦОВ, ПОДГОТОВКА, ХРАНЕНИЕ И ПОДГОТОВКА СЛАЙДОВ СБОР И ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Сбор образцов должен быть выполнен в соответствии с лабораторными принципами учреждения. Лабораторное руководство по цитогенетике содержит рекомендации по сбору, культивированию и подготовке образцов. Там указано, что можно собирать образец в гепаринизированную натрием транспортную среду или в вакутайнеры с натрий-гепарином такие как BD Вакутайнеры®. Руководство также рекомендует перевозить образцы в цитогенетическую лабораторию, и культивирование клеток должно быть начато незамедлительно.

Образцы не должны быть заморожены перед культивированием или забором материала. Собранные образцы могут быть незамедлительно использованы для приготовления слайдов, или должны хранится в фиксаторе при -20°C.

ВНИМАНИЕ: Гемолизированные образцы могут помешать нормальному культивированию для стандартного цитогенетического анализа. Следует избегать воздействия на образцы кислот, сильных оснований или высокой температуры, что, как известно, может повредить ДНК и в свою очередь привести к неправильной постановке анализа.

Подготовка слайдов из фиксированной клеточной суспензии

Для слайдов, представленных в разделе «**Специфические характеристики эффективности**» используются следующие методы подготовки слайдов:

1. Центрифугировать фиксированную клеточную суспензию при 1100 об. в течении 8 минут при комнатной температуре (от 15 до 30°C).
2. Удалите супернатант в пределах приблизительно от 0,5 до 1,0 мл от клеточного осадка, стараясь не задеть осадок.
3. Ресуспензируйте осадок в оставшихся от 0,5 до 1,0 супернатанта, осторожно перемешивая флакон.
4. Для оптимальных результатов распределения хромосом может быть использована цитогенетическая сушильная камера. Предварительно прогрейте прибор до температуры от 20°C до 30°C и относительной влажностью от 30 до 50%. Если цитогенетическая сушильная камера недоступна, как альтернативу можно использовать вытяжной шкаф.
5. Убедитесь перед использованием, что образец тщательно перемешан перед нанесением на слайд. Используя трансферную пипетку, нанесите три капли клеточной суспензии по всей длине предварительно очищенного слайда, удерживая слайд под углом предварительно 45° и смочив нижние края бумажным полотенцем.
6. Дайте слайдам полностью высохнуть, прежде, чем снимать с сушильной камеры или вытяжного шкафа.
7. Пометьте каждый слайд соответствующим образом.
8. Используя фазово-контрастный микроскоп, проверьте число интерфазных ядер в поле зрения (при 10X увеличении). Минимум 100 клеток в подходящем поле рекомендуется для подходящего результата анализа. Зафиксируйте образцы клеточной суспензии в свежем метаноле/уксусной кислоте для достижения рекомендуемого количества интерфазных ядер.

Примечание: Оптимальные образцы будут содержать немного дебриса/или цитоплазмы.

9. После получения оптимальной суспензии клеток и подготовленных слайдов, добавьте от 2 до 5 мл свежего фиксатора метанола/уксусной кислоты к оставшемуся клеточному осадку перед хранением.
10. Оставьте слайды на нагревателе для слайдов при температуре от 45°C до 50°C или при комнатной температуре на ночь.

Хранение слайдов и фиксированной суспензии

Поместите подготовленные слайды в закрытую коробку для слайдов. Запечатайте слайд бокс в полиэтиленовый пакет, содержащий приблизительно 1 столовую ложку осушителя. Хранить при -20°C (±10°C) до процесса гибридизации или перейти к **ЦЕЛЕВОЙ ПОДГОТОВКЕ ОБРАЗЦОВ.**

ВНИМАНИЕ: Фиксированные слайды стабильны при -20°C (±10°C) до 12 месяцев. Храните любую оставшуюся фиксированные клеточную суспензию при -20°C (±10°C) до 1 месяца в случае необходимости подготовки дополнительных слайдов.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ: Инициируйте автоматизированную процедуру денатурации/гибридизации зонда до завершения этого раздела, чтобы убедиться, что материалы имеют достаточное время для оттаивания.

1. Перенесите предметные стекла в сосуд Коплина, содержащий 70% этанола на 1 минуту, и взбалтывайте образцы в сосуде Коплина от 1 до 3 секунд. После 70% раствора этанола, перенесите в 85% этанол на 1 минуту, а затем в 100% этанол на 1 минуту.
2. После денатурации в этаноле, дайте слайдам высохнуть на воздухе или поместите слайды в сушильную камеру при температуре от 45°C до 50°C на две минуты, чтобы обеспечить полное высыхание до использования зонда.

ВНИМАНИЕ: Храните образцы слайдов в 100% этаноле пока все слайды не высохнут и нанесите после этого пробу. Если вы одновременно гибридизуете более 4 слайдов, используйте одновременно несколько сосудов Коплина для хранения слайдов в 100% этаноле до готовности высушить все слайды и нанесения смеси зонда.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Автоматическая процедура Денатурации/Гибридизации

1. Включите прибор для автоматической Денатурации/Гибридизации ThermoBrite.

ВНИМАНИЕ: Главный выключатель питания Thermobrite расположен на задней панели. Прибор подаст звуковой сигнал, сообщив, что питание было включено. Главное меню будет отображаться, когда температура инструмента достигнет 37°C.

2. Установите на приборе ThermoBrite программу по следующим параметрам:
    - Время денатурации: 2 минуты
    - Температура денатурации: 73°C
    - Время гибридизации: от 6 до 24 часов
    - Температура гибридизации: 37°C
3. Извлеките ДНК зонд, Vysis LSI Hybridization Buffer, и очищенную воду и доведите до комнатной температуры.
4. Отвортексируйте ДНК зонд и Vysis LSI Hybridization Buffer в течении 2-3 секунд.
5. Отцентрифугируйте флаконы в течении 2-3 секунд.
6. Перенесите 7 мкл Vysis LSI Hybridization Buffer, 2 мкл очищенной воды и 1 мкл ДНК зонда в микроцентрифужную пробирку.
7. Отвортексируйте и отцентрифугируйте смесь еще раз интенсивно.
8. Используя дозатор, нанесите 10 мкл зонда к искомому образцу и незамедлительно нанесите покровное стекло, стараясь избегать образование пузырей.
9. Заклейте покровное стекло, используя заполненный клеем шприц.
10. Перед добавлением слайдов, вставьте в ThermoBrite 2 полоски влажности в положение слот под крышкой прибора. Зафиксируйте карты под крышкой с помощью фиксаторов. Обратитесь к Мануалу ThermoBrite для получения инструкций относительного повторного использования карт влажности при последующих прогонах.
11. После того, как карты влажности установлены в прибор ThermoBrite, напитайте карты дистиллированной водой. Добавьте от 8 до 10 мл дистиллированной или деоинизированной воды к каждой карте для первого прогона.
12. При появлении запроса поместите предметные стекла на поверхность ThermoBrite. Аккуратно протолкните предметные стекла к середине пластины, вставляя край слайда в отмеченные позиции. Матовый край слайда должен висеть над краем поверхности нагрева. Убедитесь, что слайды лежать ровно и правильно выровнен по отмеченным позициям в локаторе.

ВНИМАНИЕ: Если вы гибридизуете менее 12 слайдов, используйте пустые слайды, чтобы довести общее количество слайдов до 12.

13. Закройте крышку ThemoBrite. Курсор должен выделить «Выполнить PGM». Нажмите кнопку «Ввод», для подтверждения.

ПРОЦЕДУРА ОТМЫВКИ

1. Перенесите достаточное количество **0.4X SSC/0.3% NP-40** и **2X SSC/0.1% NP-40** в отдельные сосуды Коплина. Перенесите сосуды Коплина, содержащие **0.4X SSC/0.3% NP-40** на водяную баню. Нагревайте, пока внутренняя температура **0.4X SSC/0.3% NP-40** не достигнет 73±1°C. Подтвердите температуру растворов, используя калиброванные термометры. Используйте **2X SSC/0.1% NP-40** при комнатной температуре. Используйте приготовленный раствор только в течении одного дня и дальше утилизируйте.
2. Перенесите слайды с ThemoBrite.
3. Снимите покровное стекло с одного слайда и немедленно погрузите слайд в 0,4X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте образцы слайдов в сосуде Коплина от 1 до 3 секунд. Повторите процесс с другими слайдами, в общей сложности до 4 слайдов. Начните отсчет времени, когда погружен 4 слайд.

ВНИМАНИЕ: Для поддержания правильной температуры 0,4X SSC/0,3% NP-40, промывать 4 слайда одновременно. Если есть менее 4 слайдов, добавьте пустые слайды, которые находятся при комнатной температуре, чтобы довести общее количество до четырех.

4. Достаньте слайды по истечении 2 минут.
5. Погрузите слайды в сосуды Коплина, содержащие 0,4X SSC/0,3% NP-40. Поболтайте слайды внутри сосуда Коплина от 1 до 3 секунд.
6. Перенесите слайды с 0,4X SSC/0,3% NP-40 после того, как они пробыли в растворе от 5 до 60 секунд.

ВНИМАНИЕ: При отмывке дополнительных слайдов, убедитесь, что температура 0,4X SSC/0,3% NP-40 моющего раствора составляет 73±1°C.

ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

1. Высушите каждый слайд, касаясь нижнего края бумажным полотенцем и вытерев нижнюю сторону (сторона, которая не содержит образец)
2. Высушите слайды в темноте на длинном крае слайда, чтобы облегчить испарение и предотвратить накопление **2X SSC/0.1%** NP-40 максимально в течении 2 часов.
3. Достаньте Конткраситель DAPI II и доведите реагент до комнатной температуры.
4. Отвортексируйте DAPI II в течении 2-3 секунд.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Отцентрифугируйте DAPI II в течении 2-3 секунд.
6. Используя дозатор, нанесите 10 мкл DAPI II к каждому образцу на слайде и заклейте покровным стеклом. Повторите для каждого слайда.
7. Оставьте минимум на 10 минут до визуализации при помощи микроскопа.

ПРОЦЕДУРА АРХИВИРОВАНИЯ

Храните гибридизованные слайды при температуре -20°C (±10°C) в защищенном от света месте. При этих условиях, слайды могут храниться в течении 3 недель после нанесения DAPI II без существенных потерь в интенсивности флуоресценции сигнала.

Исследование слайдов

Просмотр слайдов производится с учетом использования подходящего фильтра на флуоресцентном микроскопе. Следующие наборы оптических фильтров используются при визуализации флуорофоров при гибридизации.

Использование фильтров Vysis	**Одновременное возбуждение и эмиссия**
Одиночный зеленый	SpectrumGreen флуорохром
Одиночный оранжевый	SpectrumOrange флуорохром
Двойной оранжевый/зеленый	SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорохромы
Тройной–DAPI, Green, Orange	DAPI, SpectrumGreen, SpectrumOrange флуорохромы

Рутинное исследование проводится с тройных и двойных фильтров. Для отдельных ядер, если конкретные сигналы зондов кажутся слабыми при использовании тройных и двойных фильтров, рекомендуется использовать одиночный зеленый и одиночный оранжевый для облегчения подсчета сигналов.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Контроль качества

Оценка адекватности слайда

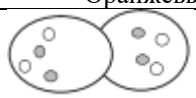
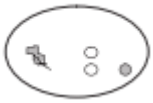
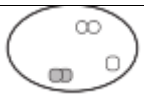
- Оценка адекватности слайда используется по следующим критериям. Если критерии не встречаются, образцы слайдов не должны оцениваться. Ядерная морфология: Границы ядер должны быть хорошо различимы и не повреждены.
- Общая информация: Фон, который возникает, должен быть темный или черный и относительно свободный от люминисцентных частиц и помутнения.
- Интенсивность сигнала пробы: Сигнал должен быть ярким, компактным, округлой или овальной формы, отличимым и легко оцениваемым.

ПОДСЧЕТ СИГНАЛОВ

Инструкция по подсчету сигналов основана на 4,5% верхнего диапазона границ для 1R1G и 6,5% верхний диапазон границ для 1R2G, принятыми Vance и др. Используя соответствующие фильтры, описанные выше, 2 исследователя подсчитывают по 100 ядер для каждой гибридизационной мишени, подсчитывая количество оранжевых и зеленых сигналов, присутствующих в каждом ядре. Первый исследователь считает ядра на левой стороне гибридизуемой мишени (которая определяется лучше) и второй исследователь считает ядра на правой стороне гибридизуемой мишени (которая определяется лучше). Обратитесь к рисунку **№1 Руководство по подсчету Двойных сигналов.**

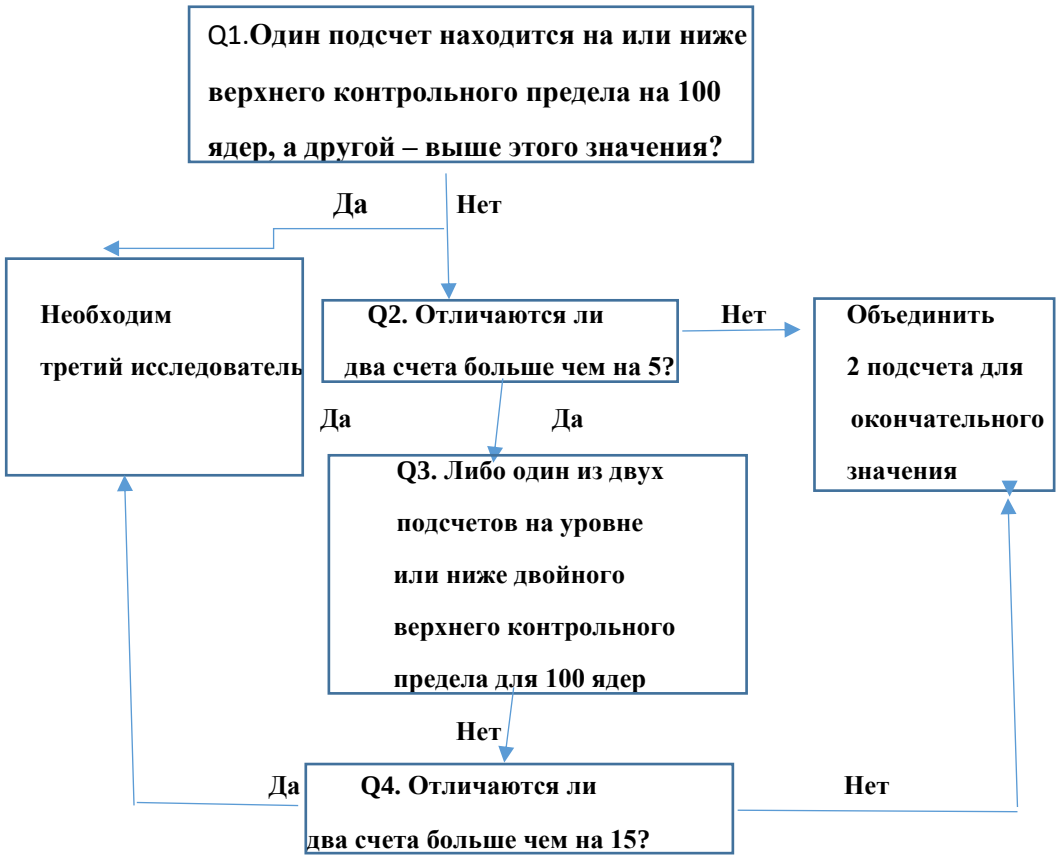
- Выберите только неповрежденные ядра, которые не свернуты, не перекрыты и не завалены омертвевшими клетками.
- Избегайте подсчета слайдов или площадей внутри слайдов, которые имеют чрезмерно неспецифическую гибридизацию или много ядер, которые имеют чрезмерно много или чрезмерно мало сигналов.
- Избегайте подсчета ядер со сгустками или облаками сигналов.
- Сигналы одного цвета, которые соприкасаются, независимо от размера, считаются одним сигналом.
- Сигналы одного цвета, которые соприкасаются, независимо от размера, считаются одним сигналом. Если есть небольшая цепь сигналов, соединяющих раздельные сигналы, считаются как один сигнал
- Сигналы одинакового цвета могут не быть одной интенсивности в данном ядре. Таким образом, возникает необходимость использовать соответствующий одиночный фильтр и/или приспособить фокальную плоскость.
- Если есть какие-либо сомнения подсчитывать клетки или нет, не подсчитывайте.
- Если образец имеет общую низкую интенсивность сигнала и малое количество клеток с атипичным сигналом FISH (1R2G и/или 1R1G), используйте соответствующие рекомендованные одиночные фильтры. Невыполнение данной рекомендации может привести к неточностям при идентификации сигналов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Рисунок 1. Руководство по подсчету Двойных сигналов	
Зеленый сигнал	
Оранжевый сигнал	
1. 	Если ядра перекрываются, не подсчитывать сигналы.
2. 	Считать как два оранжевых и два зеленых сигнала. Один оранжевый сигнал диффузный.
3. 	Считать как один оранжевый и один зеленый сигнал. Один оранжевый сигнал слитный.
4. 	Считать как один оранжевый и два зеленых сигнала. Один зеленый сигнал слитный и один оранжевый сигнал слитный.
5. 	Считать как два оранжевых и один зеленый сигнал.

После подсчета сигналов, от каждого исследователя учитывается число 1R1G и/или 1R2G атипичных паттернов сигналов и следующие шаги применяются для подсчета 200 ядер. В случае, когда наблюдаются оба атипичных сигнала паттернов (1R1G и 1R2G), правила применяются отдельно для каждого атипичного сигнала паттернов. Верхние контрольные пределы приняты Vance и др.[1] Обратитесь к **Рис. 2** для **D7S486/CEP 7 Диаграмма подсчета сигналов** и **Таблица 1 Верхний предел для включения третьего исследователя для атипичных сигналов паттернов.** Для сценариев, детализирующих применение правил на **Рисунке 2,** смотрите текст после таблицы.

Рисунок 2. D7S486/CEP 7 Руководство по подсчету сигналов



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Применение правил на Рисунке 2

Сценарий 1:
Когда 1 исследователь имеет нетипичный образец сигнала ниже верхнего контрольного предела для 100 ядер, а другой исследователь подсчитывает выше это значения, третий исследователь получит 100 ядер в гибридизационной мишени. Из 3 баллов, 2 балла, ближайших друг к другу, будут объединены, чтобы произвести счет для 200 ядер. Если все 3 балла имеют равноудаленное значение медианы удваивается и используется в качестве оценки.

Сценарий 2:
Когда количество нетипичных сигналов определяется двумя исследователями, отличающимися на 5 или менее на 100 оцененных ядер, затем добавляются 2 балла вместе, чтобы создать подсчитать для 200 ядер на образец.

Сценарий 3:
Когда количество нетипичных сигналов определяется двумя исследователями, отличающимися более чем на 5 на 100 оцененных ядер, затем принимается решение, основанное на близости количества нетипичных сигналов, рассчитывающих верхний контрольный предел на 100 ядер. Если один из двух исследователей фиксирует нетипичный для образца сигнал, и он меньше или равен удвоенному верхнему контрольному пределу на 100 ядер, и, если счет отличается более чем на 5 на 100 оцененных ядер, затем третий исследователь получит 100 ядер в гибридизационной мишени. Из 3-х баллов 2 ближайших друг к другу балла будут объединены для расчета на 200 ядер. Если все 3 балла равноудалены, медиана удваивается и используется в качестве счета.

Сценарий 4:
Когда оба из двух исследователей имеют нетипичные значения при подсчете, превышающие удвоенный верхний контрольный предел на 100 ядер, и, если эти числа различаются на 15 или меньше чем на 100 ядер, результаты будут объединены для получения счета на 200 ядер.

Сценарий 5:
Если 2 исследователя при оценке имеют нетипичное количество сигналов, которые отличаются на более 15 на 100 ядер, тогда третий исследователь получит оценку 100 ядер в гибридизационной мишени. Из 3 баллов 2 балла ближайшие друг к другу будут объединены для генерации расчета на 200 ядер. Если все 3 балла равноудалены, медианное значение удваивается и используется как оценка.

Сценарий 6:
Если требуется третий исследователь, и, если образец содержит как 1R1G и 1R2G паттерны, правила подсчета применяются к каждому шаблону независимо. Это означает, что подсчет от второго и третьего исследователя может быть объединен в общей сложности для 200 клеток для 1R1G паттерна, в то время как подсчет для первого и второго пользователя могут быть объединены для 200 клеток для 1R2G паттерна.

Например, первая и вторая исследовательская оценка:

Сигналы паттернов	**2R2G**	**1R1G**	**1R2G**	**Общее**
Исследователь 1	77	8	15	100
Исследователь 2	86	1	13	100

Потому как подсчет для исследователя 1 для 1R1G выше, а подсчет для исследователя 2 находится ниже верхнего предела 100 ядер, необходим третий исследователь. Третья исследовательская оценка:

Сигналы паттернов	**2R2G**	**1R1G**	**1R2G**	**Общее**
Исследователь 3	89	4	7	100

Для паттерна 1R1G наиболее близки оценки исследователя 2 и исследователя 3. Таким образом, эти оценки объединяются для пяти нетипичных 1R1G паттернов в 200 ядрах:

Сигналы паттернов	**2R2G**	**1R1G**	**1R2G**	**Общее**
Исследователь 2	86	1	13	100
Исследователь 3	89	4	7	100
Общее	**N/A**	**5**	**N/A**	**200**

Для паттерна 1R2G третий читатель не требовался. Следовательно, результаты суммируются в общей сложности для 28 нетипичных подсчетов 1R2G в 200 ядрах:

Сигналы паттернов	**2R2G**	**1R1G**	**1R2G**	**Общее**
Исследователь 1	77	8	15	100
Исследователь 2	86	1	13	100
Общее	**N/A**	**N/A**	**28**	**200**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1 Верхние контрольные пределы для включения третьего исследователя для подсчета атипичных сигналов

Проба/Цвет	Атипичные сигналы паттернов	Верхний контрольный предел на 100 ядер
D7S486 (Оранжевый) /CEP 7 (Зеленый)	1R1G	>4.5[a]
D7S486 (Оранжевый) /CEP 7 (Зеленый)	1R2G	>6.5[a]

[a]Дробный верхний контрольный предел составляет половину значения верхнего референсного предела на 200 ядер.

ИНТЕПРИТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ожидаемые значения

Ожидаемые сигналы паттернов в клетке с типичным паттерном для LSI D7S486/CEP 7 является 2 оранжевых и 2 зеленых сигнала (2R2G). Значения, используемые для верхних контрольных пределов 4,5% для 1R1G и 6,5% для 1R2G - количество наблюдаемых паттернов 1R1G и 1R2G на 200 ядер[1]. Обратитесь к **Таблице 2 Верхние контрольные пределы.**

Таблица 2 Верхние контрольные пределы

Проба/Цвет	Атипичные сигналы паттернов	Верхний контрольный предел: число паттернов на 200 ядер
D7S486 (Оранжевый) /CEP 7 (Зеленый)	1R1G	>9
D7S486 (Оранжевый) /CEP 7 (Зеленый)	1R2G	>13

- Отдельные лаборатории должны проверить, что верхний предел (4,5% и 6,5%) подходит для лабораторной популяция пациентов.
- Один оранжевый и 2 зеленых сигнала или 1 оранжевый и 1 зеленый сигнал ожидается в нетипичной клетке. В опубликованной литературе показаны следующие диапазоны значения для образцов с 1R2G и 1R1G с атипичными сигналами паттернов:

Публикации	Заболевание	Образец	1R1G	Число 1R1G образцов	1R2G	Число 1R1G образцов	Число протестированных образцов
Vance[1]	Острый миелоидный лейкоз	Костный мозг	70 -96%	5	От 58% до 93%	4	179
		Периферическая кровь	11%	1	От 37% до 96%	3	47
Cherry[2]	Миелоди спластический синдром	Костный мозг	23% и 87,5%	2	22,5 и 44%	3	48
Tefferi[3]	Миелофиброз и миелоидная метаплазия	Костный мозг	N/A	N/A	9 и 16%	2	42
		Периферическая кровь	N/A	N/A	27%	1	

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Для диагностики in vitro
- Проба Vysis D7S468/CEP 7 предназначена для использования в комбинации с дополнительными биомаркерами, морфологией и клинической информацией.
- Могут возникать другие атипичные сигналы паттернов и метафазный анализ может быть полезен в характеристике таких паттернов.
- Если образец имеет общую низкую интенсивность FISH сигнала и низкий уровень клеток с атипичными (1R2G и/или 1R1G) FISH сигналами, используйте соответствующие рекомендованные одиночные фильтры. Невыполнение этой рекомендации может привести к неточной идентификации сигналов.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая Специфичность

Аналитическая специфичность определяется как процент сигналов, которые гибридизуются с правильным локусом и не в каком-либо другом месте.[5,11]

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Аналитическая специфичность Vysis LSI D7S486 SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen Probes для соответствующих хромосомных локусов были опубликованы с использованием метафазных хромосомных препаратов, приготовленных из культуры периферической крови 4 мужчин и одной женщины кариотипически нормальных образцов. Место гибридизации для каждого сигнала FISH на хромосомах 100 последовательных метафазных ядер были оценены одним исследователем, что составило в общей сложности 200 таргетных локусов на хромосому. Для каждой пробы было пересчитано число FISH сигналов на метафазных хромосомах, гибридизуемых с правильным локусом и число FISH сигналов, гибридизуемых с неправильным локусом. Для каждой пробы, специфичность расчитывали как число FISH сигналов метафазных хромосом, гибридизуемых с правильным локусом, деленное на общее количество FISH сигналов метафазных хромосом и умноженное на 100, для получения процента.[5,11]
Аналитическая специфичность Vysis D7S486/CEP 7 FISH Probe Kit составила 100%, как показано в **Таблице 3.**

Таблица 3. Аналитическая специфичность

Проба	Правильный таргетный локус	№ сигнала на метафазной хромосоме		Специфичность (%)	95% Доверительный интервал
		Гибридизация с правильным таргетным локусом	Общее число гибридизуемых		
LSI D7S486	7q31	200	200	100	(98,100)
CEP 7	7p11.1-q11.1	200	200	100	(98, 100)

Аналитическая Специфичность
Аналитическая чувствительность определяется как процент от оценки интерфазных ядер с ожидаемыми типичными паттернами сигналов. Ожидаемые типичные паттерны сигналов для зондов Vysis D7S486 /CEP 7 FISH это 2 оранжевых (2R) и 2 зеленых (2G) сигнала на ядро.
Аналитическая чувствительность Vysis LSI D7S486 SpectrumOrange /CEP 7 SpectrumGreen Probes установлена с использованием межфазных ядер, приготовленных из 25 образцов костного мозга и 25 образцов периферической крови, которые были либо кариотипически нормальными, либо пациентами без 1R1G и 1R2G сигналов. Оранжевые и зеленые сигнальные паттерны ядер для каждого из 25 образцов были оценены 2 исследователями. Каждый исследователь оценивал 100 ядер на образец, в общей сложности 200 ядер на образец и 5000 ядер для каждого из типов образцов.
Аналитическая чувствительность рассчитывалась как процент от оценки интерфазных ядер с ожидаемыми сигналами 2R2G.
Vysis D7S486 / CEP 7 FISH обладает аналитической чувствительностью 98,1% для образцов костного мозга и 98,5% для образцов периферической крови.

Таблица 4. Аналитическая чувствительность

Проба	Образец[a]	№ интерфазных хромосомных сигналов		Аналитическая чувствительность	
		Ожидаемые сигналы паттернов	Учитываемые ядра	Точка оценки	95% CL[b]
D7S486	**Костный мозг**	**4903**	**5000**	**98.1**	**(97.6, 98.4)**
D7S486	**Периферическая кровь**	**4923**	**5000**	**98.5**	**(98.1,98.8)**

a – 25 кариотипически нормальных образцов для двух типов образцов
b – КМ - костный мозг – ПК – периферическая кровь

Верификация верхних контрольных пределов
Верхний контрольный предел определяется как максимальное количество подлежащих подсчету интерфазных ядер со специфическими атипичными сигналами, в которых образец считается кариотипически нормальным для этих сигналов. Верхний контрольный предел выражается в процентах или в фактическом количестве специфичных атипичных ядерных FISH сигналов на стандартное число тестируемых ядер.
Верхний контрольный предел для 1R1G это 4,5% и 9 1R1G паттернов на 200 подлежащих подсчету интерфазных ядер и верхний контрольный предел для 1R2G это 6,5% или 13 1R2G паттернов на 200 подлежащих подсчету интерфазных ядер.
Образцы с превышением 9 1R1G паттернов и/или 13 1R2G паттернов на 200 подлежащих подсчету ядер считаются атипичными для 1R1G и/или для 1R2G для зонда Vysis D7S486/CEP 7.
Анализ с использованием зонда Vysis D7S486/CEP 7 был выполнен на интерфазных ядрах, выделенных из 25 образцов костного мозга и 25 образцов периферической крови от других кариотипически нормальных доноров или пациентов, у которых отсутствует 1R1G и 1R2G. Паттерны сигналов на 200 ядер для каждого типа образца были оценены 2 исследователями, подсчитывая 100 ядер на образец.
Среди 25 кариотипически нормальных образцов как для периферической крови и для костного мозга, ни один не произвел больше 4,5% и 6,5% верхнего контрольного уровня.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Два повторных анализа были проведены на 2 высоко-позитивных и 2 низко-позитивных и 2 негативных участников панели трех сайтов в течении 5 дней подряд для каждого образца. Позитивные участники панели для исследования сайта на сайт были получены путем смешивания положительных клеток с нормальными клетками, для каждого типа образца, для получения желаемых уровней позитивности. Результаты показаны в **Таблицах с 5 по 8**, где представлено общее соглашение с положительным/отрицательным статусом тестируемой панели участников.

Все 3 сайта продемонстрировали 100% согласие с известным статусом отрицательных и положительных участников панели для двух типов образцов и обоих сигналов паттернов. Для образцов костного мозга, низко положительных согласий продемонстрировано 88% (1R2G) и 97% (1R1G). Для образцов периферической крови, низко положительных согласий продемонстрировано 95% (1R2G) и 93% (1R1G).

Таблица 5. Общее соглашение, Сайт к сайту – Для образцов костного мозга и 1R2G сигналов

	Число			
Категория	**Согласие[a]**	**Несогласие[b]**	**Общее количество**	**Процент согласий (%)**
Отрицательный	**60**	**0**	**60**	**100%**
Низко положительный	**53**	**7**	**60**	**88%**
Высоко положительный	**60**	**0**	**60**	**100%**

[a] – Согласие – число совпадающих слайдов

[b] – Несогласие – число несовпадающих слайдов

Таблица 6. Общее соглашение, Сайт к сайту – Для образцов костного мозга и 1R1G сигналов

	Число			
Категория	**Согласие[a]**	**Несогласие[b]**	**Общее количество**	**Процент согласий (%)**
Отрицательный	**60**	**0**	**60**	**100%**
Низко положительный	**58**	**2**	**60**	**97%**
Высоко положительный	**60**	**0**	**60**	**100%**

[a] – Согласие – число совпадающих слайдов

[b] – Несогласие – число несовпадающих слайдов

Таблица 7. Общее соглашение, Сайт к сайту – Для образцов периферической крови и 1R2G сигналов

	Число			
Категория	**Согласие[a]**	**Несогласие[b]**	**Общее количество**	**Процент согласий (%)**
Отрицательный	**60**	**0**	**60**	**100%**
Низко положительный	**57**	**3**	**60**	**95%**
Высоко положительный	**60**	**0**	**60**	**100%**

[a] – Согласие – число совпадающих слайдов

[b] – Несогласие – число несовпадающих слайдов

Таблица 8. Общее соглашение, Сайт к сайту – Для образцов периферической крови и 1R1G сигналов

	Число			
Категория	**Согласие[a]**	**Несогласие[b]**	**Общее количество**	**Процент согласий (%)**
Отрицательный	**60**	**0**	**60**	**100%**
Низко положительный	**56**	**4**	**60**	**93%**
Высоко положительный	**60**	**0**	**60**	**100%**

[a] – Согласие – число совпадающих слайдов

[b] – Несогласие – число несовпадающих слайдов

Было подсчитано среднее и стандартное отклонение в процентах клеток с 1R2G и 1R1G сигналами.

Анализ дисперсионных отклонений для сайт к сайту показан в **Таблицах 9 – 12.**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 9 Анализ компонентов отклонений сайт к сайту для образцов костного мозга и 1R2G сигналов

			В течении дня	Между днями	Между сайтом	Общее количество
Образец	**Номер**	**Значение**	**SD**	**SD**	**SD**	**SD**
Отрицательный 1	30	0.5	0.27	0.32	0.06	0.43
Отрицательный 2	30	0.4	0.38	0.14	0.24	0.47
Низко позитивный 1	30	10.5	2.11	1.41	1.14	2.78
Низко позитивный 2	30	10.0	3.19	0.00	2.33	3.95
Высоко позитивный 1	30	43.9	6.76	0.00	7.62	10.19
Высоко позитивный 2	30	42.0	4.61	0.00	5.44	7.13

Таблица 10 Анализ компонентов отклонений сайт к сайту для образцов костного мозга и 1R1G сигналов

			В течении дня	Между днями	Между сайтом	Общее количество
Образец	**Номер**	**Значение**	**SD**	**SD**	**SD**	**SD**
Отрицательный 1	30	0.5	0.67	0.14	0.49	0.84
Отрицательный 2	30	0.3	0.37	0.00	0.25	0.44
Низко позитивный 1	30	8.9	2.61	0.00	1.19	2.87
Низко позитивный 2	30	9.3	2.43	0.00	0.00	2.43
Высоко позитивный 1	30	48.3	6.20	1.30	8.06	10.25
Высоко позитивный 2	30	43.9	3.78	3.97	4.19	6.90

Таблица 11 Анализ компонентов отклонений сайт к сайту для образцов периферической крови и 1R2G сигналов

			В течении дня	Между днями	Между сайтом	Общее количество
Образец	**Номер**	**Значение**	**SD**	**SD**	**SD**	**SD**
Отрицательный 1	30	0.4	0.53	0.27	0.38	0.71
Отрицательный 2	30	0.4	0.42	0.25	0.00	0.49
Низко позитивный 1	30	10.4	2.46	0.00	2.03	3.19
Низко позитивный 2	30	12.5	2.57	0.00	0.38	2.60
Высоко позитивный 1	30	42.1	3.26	2.05	5.82	6.98
Высоко позитивный 2	30	52.8	4.07	1.82	2.15	4.95

Таблица 12 Анализ компонентов отклонений сайт к сайту для образцов периферической крови и 1R1G сигналов

			В течении дня	Между днями	Между сайтом	Общее количество
Образец	**Номер**	**Значение**	**SD**	**SD**	**SD**	**SD**
Отрицательный 1	30	0.3	0.65	0.00	0.32	0.72
Отрицательный 2	30	0.4	0.47	0.20	0.25	0.57
Низко позитивный 1	30	9.1	2.61	0.00	0.55	2.67
Низко позитивный 2	30	6.9	2.35	0.52	0.27	2.42
Высоко позитивный 1	30	44.8	3.77	0.00	5.35	6.55
Высоко позитивный 2	30	38.8	3.90	3.17	1.63	5.29

Используя одинаковую панель участников для исследования сайт к сайту, было проведено 4 повторяющихся исследования на 2 высоко положительных, двух низко положительных и двух отрицательных участников панели исследования с использованием трех различных партий проб к на одиночном сайте для каждого образца. Общее согласие с известным положительным/отрицательным статусом участников тестовой панели показаны в **Таблицах 13-16.**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Все три лота продемонстрировали 100% согласие с известным статусом отрицательных и высоко положительных участников панели для обоих типов образцов и для двух типов сигналов. Для образцов костного мозга продемонстрировано 88% низко положительных (1R2G) и 92% (1R1G). Для образцов периферической крови продемонстрировано 100% (1R2G) и 96% (1R2G).

Таблица 13. Общее соглашение, Лот к лоту – Для образцов костного мозга и 1R2G сигналов

	Число			
Категория	**Согласие[a]**	**Несогласие[b]**	**Общее количество**	**Процент согласий (%)**
Отрицательный	**24**	**0**	**24**	**100%**
Низко положительный	**21**	**3**	**24**	**88%**
Высоко положительный	**24**	**0**	**24**	**100%**

[a] – Согласие – число совпадающих слайдов

[b] – Несогласие – число несовпадающих слайдов

Таблица 14. Общее соглашение, Лот к лоту – Для образцов костного мозга и 1R1G сигналов

	Число			
Категория	**Согласие[a]**	**Несогласие[b]**	**Общее количество**	**Процент согласий (%)**
Отрицательный	**24**	**0**	**24**	**100%**
Низко положительный	**22**	**2**	**24**	**92%**
Высоко положительный	**24**	**0**	**24**	**100%**

[a] – Согласие – число совпадающих слайдов

[b] – Несогласие – число несовпадающих слайдов

Таблица 15. Общее соглашение, Лот к лоту – Для образцов периферической крови и 1R2G сигналов

	Число			
Категория	**Согласие[a]**	**Несогласие[b]**	**Общее количество**	**Процент согласий (%)**
Отрицательный	**24**	**0**	**24**	**100%**
Низко положительный	**24**	**0**	**24**	**100%**
Высоко положительный	**24**	**0**	**24**	**100%**

[a] – Согласие – число совпадающих слайдов

[b] – Несогласие – число несовпадающих слайдов

Таблица 16. Общее соглашение, Лот к лоту – Для образцов периферической крови и 1R1G сигналов

	Число			
Категория	**Согласие[a]**	**Несогласие[b]**	**Общее количество**	**Процент согласий (%)**
Отрицательный	**24**	**0**	**24**	**100%**
Низко положительный	**23**	**1**	**24**	**96%**
Высоко положительный	**24**	**0**	**24**	**100%**

[a] – Согласие – число совпадающих слайдов

[b] – Несогласие – число несовпадающих слайдов

Анализ изучения различных компонентов для Лот к лоту показан в **Таблицах 17-20**

Таблица 17 Лот к лоту – Анализ различных компонентов – для образцов костного мозга и сигналов 1R2G

			Между днями	**Между сайтом**	**Общее количество**
Образец	**Номер**	**Значение**	**SD**	**SD**	**SD**
Отрицательный 1	12	0.1	0.22	0.06	0.23
Отрицательный 2	12	0.2	0.28	0.00	0.28
Низко позитивный 1	12	8.7	2.31	1.63	2.82
Низко позитивный 2	12	11.3	1.58	0.00	1.58

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Высоко позитивный 1	12	47.8	5.65	2.49	6.17
Высоко позитивный 2	12	48.9	3.53	2.66	4.42

Таблица 18 Лот к лоту – Анализ различных компонентов – для образцов костного мозга и сигналов 1R1G

			Между днями	Между сайтом	Общее количество
Образец	**Номер**	**Значение**	**SD**	**SD**	**SD**
Отрицательный 1	12	0.1	0.22	0.06	0.23
Отрицательный 2	12	0.2	0.14	0.00	0.14
Низко позитивный 1	12	6.8	2.58	0.88	2.73
Низко позитивный 2	12	8.1	1.16	0.00	1.16
Высоко позитивный 1	12	43.9	6.55	4.86	8.16
Высоко позитивный 2	12	38.5	4.03	3.71	5.48

Таблица 19 Лот к лоту – Анализ различных компонентов – для образцов периферической крови и сигналов 1R2G

			Между днями	Между сайтом	Общее количество
Образец	**Номер**	**Значение**	**SD**	**SD**	**SD**
Отрицательный 1	12	0.1	0.22	0.06	0.23
Отрицательный 2	12	0.1	0.20	0.00	0.20
Низко позитивный 1	12	11.6	2.14	0.98	2.35
Низко позитивный 2	12	11.0	1.99	0.00	1.99
Высоко позитивный 1	12	46.5	2.47	1.52	2.89
Высоко позитивный 2	12	58.1	3.38	0.00	3.38

Таблица 20 Лот к лоту – Анализ различных компонентов – для образцов периферической крови и сигналов 1R1G

			Между днями	Между сайтом	Общее количество
Образец	**Номер**	**Значение**	**SD**	**SD**	**SD**
Отрицательный 1	12	0.0	0.00	0.00	0.00
Отрицательный 2	12	0.0	0.14	0.00	0.14
Низко позитивный 1	12	9.1	2.05	1.76	2.70
Низко позитивный 2	12	5.7	1.22	0.00	1.22
Высоко позитивный 1	12	37.1	2.87	0.90	3.01
Высоко позитивный 2	12	32.0	3.42	1.69	3.81

Краткое изложение результатов публикуемой цитируемой литературы

В цитируемой публикуемой литературе могут обсуждаться используемое оборудование, одобренное или неодобренное FDA.

Данные, взятые из вспомогательной литературы

Литературные источники	**Популяционный анализ**	**Число и тип образца**	**Используемые наборы**	**Наблюдаемые результаты D7S486/CEP 7**
Vance и др[1].	ОМЛ	179 образцов костного мозга и 47 образцов	Vysis LSI D7S486/CEP 7	Сигнал 1R2G были детектированы в 4 из 179 образцах костного мозга и в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		периферической крови		3 из 47 образцах периферической крови Сигнал 1R1G был детектирован в 5 из 179 образцов костного мозга и в одном из 47 образцов периферической крови
Cherry и др[2].	МДС	48 образцов костного мозга	Vysis LSI D7S486/CEP	Сигнал 1R2G был детектирован в 3 из 48 образцов костного мозга Сигнал 1R1G был детектирован в двух из 48 образцов костного мозга
Tefferi и др[3].	МММ	42 образца костного мозга и периферической крови	Vysis LSI D7S486/CEP	Сигнал 1R2G был детектирован в двух из 42 образцов костного мозга и в одном из 42 образцах периферической крови

БИБИЛИОГРАФИЯ

1. Vance GH, Kim H, Hicks GA, et al. Utility of Interphase FISH to Stratify Patients into Cytogenetic Risk Categories at Diagnosis of AML in an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Clinical Trial (E1900). *Leuk Res.* 2007;31:605-09.
2. Cherry A, Brockman S, Paternoster S, et al. Comparison of interphase FISH and metaphase cytogenetics to study myelodysplastic syndrome: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study. *Leuk Res.* 2003;27:1085-1090.
3. Tefferi A, Meyer R, Wyatt W, et al. Comparison of peripheral blood interphase cytogenetics with bone marrow karyotype analysis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol.* 2001;115:316-319.
4. Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz. The UCSC Genome Browser. ©The Regents of the University of California. Available at: http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?hgsid=185806115&clade=mammal&org=Human&db=hg18. Accessed [April 30, 2013].
5. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med*. 2006;8:16-23.
6. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,* Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens.*
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline—Third Edition.* CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
9. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
10. Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck J, eds. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. 3rd ed. Philadephia, PA: Lippincott-Raven; 1997.
11. AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS (ACMG), Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories, 2008 Edition.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефонам (1-800-553-7042) (в США) +49-6122-580 (другие регионы) или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Abbott Molecular Inc. это легальный производитель зонда Vysis LSI D7S486/CEP FISH Probe Kit

Патенты: abbott.us/patents

VYSIS, LSI, CEP и WCP торговые марки группы компании Abbott в различных юрисдикциях. Все остальные торговые марки собственность их соответствующих владельцев.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines. IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany

© 2013, 2016 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

Июнь 2016
30-608510/R2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis IGH/CCND1 XT DF FISH Probe Kit

EN

REF 05N33-020
30-608271/R2

Vysis IGH/CCND1 XT
DF FISH Probe Kit
05N33-020
30-608271/R2

Используемые символы

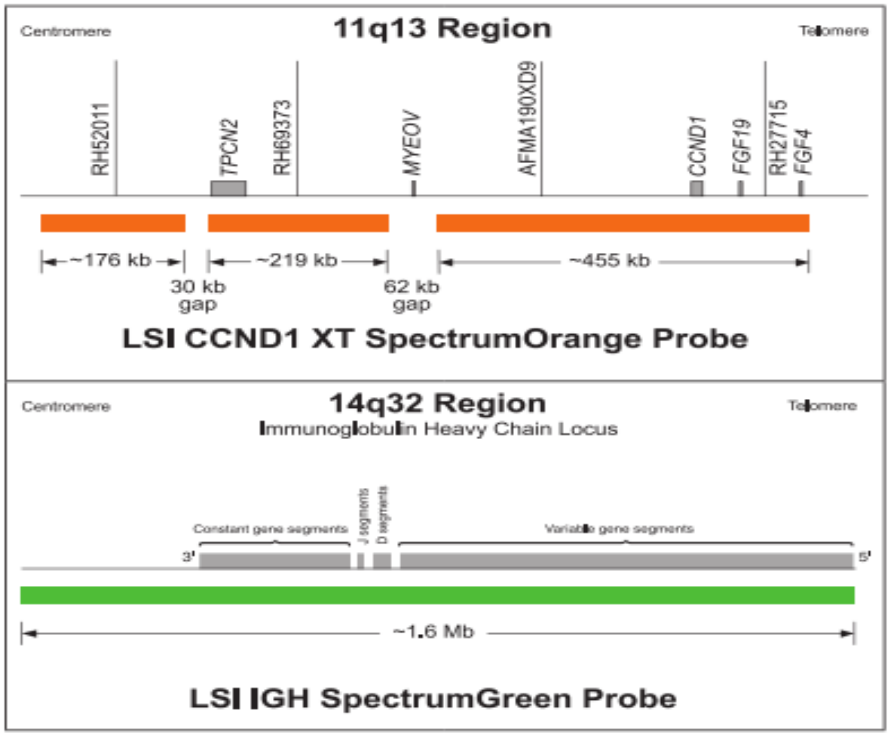
	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер лота
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурный режим
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	Биологический риск
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам
	Использовать до (срок годности)
	См. инструкцию по применению
	Биологический риск
	Авторизованный представитель в Европейском сообществе

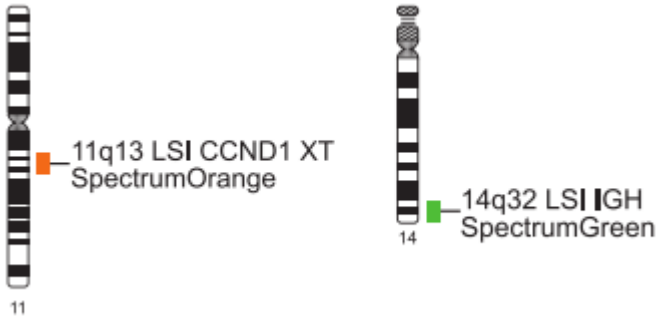
Назначение
Данные зонды для флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) предназначены для выявления реципрокной транслокации t(11;14) (q13;q32), расположенной в локусах генов IGH и CCND1.

Краткое описание и разъяснения
t(11;14)(q13;q32) – наиболее часто встречающаяся при миеломе транслокация.[1-,3] Пациенты с t(11;14) характеризуются более высокой выживаемостью и лучше отвечают на лечение, особенно на высокодозную терапию и на применение стволовых клеток.[1,4] Двухцветные двойные зонды Vysis LSI IGH/CCND1 XT использовались во многих работах для выявления t(11;14).[5]

Описание зонда
Зонд SpectrumOrange, около 942 т.п.н., перекрывает участок разрыва в CCND1 и имеет два промежутка, в 30 т.п.н. и 62 т.п.н. Контиг состоит из трех частей, приблизительно по 176 т.п.н (chr11:68363475-68539031; UCSC Март 2006), 219 т.п.н. (chr11:68568591-68787877; UCSC Март 2006) и 455 т.п.н. (chr11:68850088-69305335; UCSC Март 2006). Зонд SpectrumGreen составляет около 1,6 млн.п.н. (chr14:104736507-106339460; ассамблея Март 2006, UCSC Genome Browser), соответствует локусу IGH.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru





Реагенты

1. Двухцветный двойной зонд Vysis IGH/CCND1 XT (номер по каталогу 30-191015)

(1 пробирка, 20 мкл на пробирку). 1150 нг/мкл, меченый флуорофором ДНК-зонд и блокирующая ДНК в Трис-ЭДТА(Tris-EDTA).

2. Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP (номер по каталогу 30-804826)

(1 пробирка, 150 мкл на пробирку). Дестрана сульфат, формамид, SCC (pH 7,0). Таблицы с данными о безопасности материалов (MSDS) всех предоставленных реагентов можно получить в технической службе компании Abbott Molecular.

Хранение



Зонд Vysis IGH/CCND1 XT DF для FISH – методики (набор реактивов) необходимо хранить при температуре -20ºC, в защищенном от света месте.

Условия транспортировки

Транспортировка зонда Vysis IGH/CCND1 XT DF для FISH – методики (набор реактивов) осуществляется в сухом льду. Если Вы получили реагенты, поврежденные или находящиеся в ненадлежащих условиях, свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Меры предосторожности

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

Использовать только для in vitro диагностики.

Vysis IGH/CCND1 XT Dual Color Fusion Probes

ВНИМАНИЕ: данный препарат содержит полученные от человека и/или потенциально инфекционные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может гарантировать, что продукты, полученные от человека, или инактивированные микроорганизмы не инфицированы. Поэтому все биоматериалы человека должны рассматриваться как потенциально инфекционные. Рекомендуется обращаться с этими реагентами и биоматериалами человека в соответствии со стандартом для гемоконтактных патогенов Управления США по охране труда и промышленной гигиене (OSHA Standard on Bloodborne Pathogens).[8] При работе с материалами, содержащими инфекционные агенты, следует соблюдать правила биобезопасности, уровень 2, или другие соответствующие правила биобезопасности.[10]

Эти меры включают, но не ограничиваются следующим:

- Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите, не пользуйтесь косметикой и не дотрагивайтесь до контактных линз в помещениях, где производятся работы с этими материалами.
- Вытирайте и дезинфицируйте все места, куда попадают капли образцов, туберкулецидным дезинфецирующим средством, например, 1,0% натрия гипохлорита, или другим соответствующим дезинфецирующим средством.[7]
- Деконтаминируйте и утилизируйте все потенциально все потенциально инфекционные материалы в соответствии с местными и государственными законами.

Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Определяющие опасность компоненты маркировки: Формамид

H360	Может причинить вред плоду ребенка в утробе матери
P201	Получите специальные инструкции перед использованием
P202	Не начинайте работать до полного понимания всех мер безопасности
P281	Используйте средства индивидуальной защиты, которые рекомендованы
P308+P313	В случае воздействия: обратитесь за медицинской помощью.
P405	Хранить в закрытом виде.
P501	Материалы и контейнеры должны быть утилизированы безопасным способом

ПАСПОРТА БЕЗОПАСНОСТИ: Важная информация по безопасности, хранению, транспортировке и утилизации содержится в Паспортах Безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (MSDS) для всех реагентов, представленных в комплекте, доступны по запросу от Службы Технической поддержки Abbott Molecular.

Приготовление Реагентов

ПРИМЕЧАНИЕ: **там, где необходимо, измеряйте pH растворов при комнатной температуре. Используйте pH – метр со стеклянным электродом, если не указано иное.**

20X SSC раствор

Смешайте 132 г 20X SSC и 400 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Измерьте pH и доведите pH до 5,3 с помощью HCI. Доведите объем до 500 мл с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

2X SSC / 0,1% NP-40 промывочный раствор

Смешайте 100 мл 20X SSC (pH 5,3) и 850 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 1 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0±0,2 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Раствор для денатурации (70% формамид / 2X SSC)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Смешайте 49 мл формамида, 7 мл 20X SSC (pH 5,3) и 14 мл очищенной воды в стеклянной емкости Коплина. Измерьте pH с помощью индикаторных полосок и убедитесь, что pH составляет 7,0-8,0. Хранить при температуре при 2-8°C в плотно закрытом контейнере. Использовать в течение 7 дней.

Растворы этанола (70%, 85%, 100%)
Приготовьте v/v растворы этанола методом разведений, используя 100% этанол и очищенную воду. Храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Использовать в течение 6 месяцев.

0,4X SSC / 0,3% NP-40 промывочный раствор
Смешайте 20 мл 20X SSC (pH 5,3) и 950 мл очищенной воды. Тщательно перемешайте. Добавьте 3 мл NP-40, тщательно перемешайте до полного растворения NP-40. Измерьте pH и доведите pH до 7,0-7,5 с помощью NaOH. Доведите объем до 1 л с помощью очищенной воды. Перемешайте и профильтруйте через фильтр с фильтровальной установкой с порами 0,45 мкм. Храните при комнатной температуре. Утилизируйте раствор через 6 месяцев или раньше при его помутнении или загрязнении.

Хранение LSI ДНК зонда: Зонд LSI ДНК должен храниться при температуре не выше -20ºC (±5 °C) в защищенном от света месте.

Разрушение: Флуорофоры быстро обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы не допустить этого, работу с растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, следует проводить при слабом освещении. Проводите все этапы, для выполнения которых не требуется свет (например, инкубация и отмывка), в темноте.
Указания по методике: Перед использованием отогрейте реагенты при комнатной температуре, встряхните, затем центрифугируйте каждую пробирку в течение 2-3 секунд с помощью стандартной настольной микроцентрифуги.

Сбор образцов и подготовка к Анализу
Клетки костного мозга культивируются, снимаются с подложки, фиксируются и помещаются под микроскоп (изготовление препаратов с использованием стандартных цитогенетических методик).
Методика
Необходимые материалы

- Двухцветные двойные зонды Vysis IGH/CCND1 XT
- Буфер для гибридизации Vysis LSI/WCP
-

Необходимые, но не входящие в комплект материалы

- 12N HCl (для коррекции pH промывочных растворов)
- 1N NaOH (для коррекции pH промывочных растворов)
- Емкости Коплина стеклянные
- Калиброванный термометр
- Щипцы лабораторные
- Градуированный цилиндр (1000 мл)
- Магнитная мешалка
- Этанол
- Микроцентрифуга
- Микродозатор на объемы от 1 до 10 мкл
- Микропипет-дозатор, от 1 до 10 мкл
- pH метр
- Чистые стекла для микроскопа
- Очищенная вода
- Таймер
- Вихревая мешалка (vortex)
- Водяная баня (37ºC и 72ºC)
- Флуоресцентный микроскоп
- Термостат на 37ºC
- 20X SSC
- NP-40
- Формамид, очень высокой степени очистки
- Краситель DAPI II
- Столик с подогревом
-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление трех емкостей Коплина: налейте 70 мл 100% EtOH в одну из трех емкостей; 70 мл 85% EtOH в другую емкость; 70 мл 70% EtOH в третью емкость. Работайте при комнатной температуре. Растворы можно использовать в течение 7 дней, если не происходит их испарение или разбавление.
Для получения оптимальных результатов убедитесь, что реагенты приготовлены и используются при температуре, указанной в этой инструкции.
Измеряйте температуру растворов в емкости Коплина; необходимо использовать калиброванный термометр.

Приготовление исследуемого препарата образца-мишени

ПРИМЕЧАНИЕ: Перенесите раствор для денатурации, содержащийся в емкостях Коплина, в условия комнатной температуры. Перед использованием поместите емкости в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 30 мин для того, чтобы нагреть раствор до этой температуры.

1. Убедитесь, что температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC. Для поддержания должной температуры, погружайте в емкость одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.
2. Погрузите препараты в раствор для денатурации на 5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: не погружайте в одну емкость Коплина более четырех стекол одновременно.

3. Проведите обезвоживание препаратов, опустив стекла в 70% EtOH на 1 минуту, затем – в 85% EtOH на 1 минуту, и на 1 минуту в 100% EtOH.

ПРИМЕЧАНИЕ: В 100% EtOH стекла находятся до тех пор, пока не будут обезвожены все препараты и не будет готов раствор зондов.

Приготовление раствора зондов

1. Добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца-мишени):
   7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
   1 мкл зонда
   2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), можно добавить один микролитр каждого зонда. Доведите общий объем до трех микролитров с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 73±1ºC приблизительно на 5 мин.
5. Извлеките пробирку из водяной бани.
6. Держите пробирку на столике с подогревом (45-50ºC) до того момента, как станет возможным нанесение зондов на искомую ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: если препараты к моменту приготовления образца уже обезвожены, то можно сразу нанести зонды на искомую ДНК.

Гибридизация Зонда и Образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Подготовьте увлажненную камеру – поместите бумажную салфетку, смоченную водой, на внутреннюю поверхность воздухонепроницаемого контейнера. Поместите в термостат с температурой 37ºC.

1. Извлеките стекла из 100% EtOH.
2. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла бумажной салфеткой.
3. Просушите стекла на нагревателе для стекол при 45-50°C для того, чтобы выпарить оставшийся EtOH.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную искомую область стекла и сразу накройте эту область покровным стеклом. Повторите процедуру для других отмеченных искомых участков.
5. Сформируйте при помощи резинового клея изолирующий слой вокруг покровного стекла.
6. Поместите стекла в подготовленную предварительно увлажненную камеру и поместите эту камеру в термостат при 37°C на 6-16 часов.

Для получения сигнала достаточной интенсивности большинству зондов LSI необходимо 12-16 часов.

Отмывка Стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для образцов, залитых в парафин, замените промывочный раствор 2X SSC/0,3% NP-40 на 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Приготовление промывочных растворов:

- Налейте 70 мл 0,4X SSC/0,3% NP-40 в емкость Коплина. Перед использованием поместите емкость в водяную баню с температурой 73±1ºC минимум на 30 минут. Используйте в течение 1 дня.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Налейте 70 мл 2X SSC/0,1% NP-40 в емкость Коплина при комнатной температуре. Используйте в течение 1 дня.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания должной температуры 0,4X SSC/0,3% NP-40, промывайте одновременно четыре стекла. Если количество стекол меньше, чем четыре, добавьте пустые стекла (комнатной температуры) для поддержания необходимого их количества.

Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

1. Снимите покровное стекло с одного препарата и сразу же погрузите препарат на предметном стекле в 0,4X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте препарат в растворе в течение 1-3 секунд. Повторите операцию для остальных трех стекол.
2. Извлеките стекла через 2 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: До начала промывки стекол убедитесь, что температура промывочного раствора составляет 73±1ºC.

3. Погрузите стекла в 2X SSC/0,1% NP-40. Встряхивайте стекла в течение 1-3 секунд. Извлеките стекла через интервал времени от 5 секунд до 1 минуты.

Визуализация гибридизации

1. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
2. Нанесите 10 мкл DAPI II на отмеченную на стекле область – мишень и накройте ее покровным стеклом.

Гибридизация на препарате визуализируется с помощью флуоресцентного микроскопа, снабженного соответствующими фильтрами. Флуорофоры, используемые при гибридизации, визуализируются при помощи следующих оптических фильтров:

Используйте этот фильтр Vysis…	**Обеспечивает одновременный переход в возбужденное состояние и излучение…**
DAPI/Orange	DAPI и SpectrumOrange флуорофоры
DAPI/Green	DAPI и SpectrumGreen флуорофоры
Aqua/ Green/ Orange	SpectrumAqua, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/ Orange / Green	DAPI, SpectrumOrange и SpectrumGreen флуорофоры
DAPI/Aqua / Green / Orange	DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen и SpectrumOrange флуорофоры

Хранение

Образцы, хранящиеся в защищенном от света месте при -20ºC (±5°C), могут анализироваться в течение трех недель после гибридизации.

Использование коденатурации

Коденатурация – это процесс, упрощающий флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с помощью проведения денатурации раствора зондов и образца в один этап. Обычно коденатурация проводится следующим образом: накрытый покровным стеклом образец (препарат), с нанесенным зондом, помещается на нагревательную плитку, в термошкаф или термостат, при температуре денатурации. Обычно через 2-10 минут препараты вынимаются и перемещаются в термостат с температурой гибридизации.

Опубликованные условия коденатурации охватывают широкий диапазон показателей температуры и времени. Это говорит о необходимости оптимизации условий для специфических случаев и типов образца. В настоящем руководстве описаны параметры для использования системы денатурации/гибридизации Vysis ThermoBrite, они предназначены для того, чтобы задать группу стартовых параметров. В дальнейшем, в зависимости от образца, может потребоваться их оптимизация. Внешний вид результатов гибридизации с использованием коденатурации может отличаться от стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Приготовление препаратов для коденатурации

1. Для каждой интересующей области добавьте в пробирку для микроцентрифугирования следующие реагенты при комнатной температуре (для каждого искомого образца):

7 мкл буфера для гибридизации LSI/WCP
1 мкл зонда
2 мкл очищенной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: Для одновременной гибридизации трех зондов, меченных различными флуорофорами (до трех), добавьте 1 мкл каждого зонда. Доведите общий объем до 3 мкл с помощью очищенной воды.

2. Центрифугируйте пробирку в течение 1-3 секунд.
3. Встряхните (vortex) и снова центрифугируйте.
4. Нанесите 10 мкл смеси зондов на препарат и немедленно накройте покровным стеклом.
5. При помощи герметика создайте изолирующий слой вокруг покровного стекла.

Настройка системы гибридизации/денатурации

Параметры

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приведенные ниже указания предназначены для стартовых параметров системы денатурации/гибридизации ThermoBrite. За более подробной информацией об использовании прибора обращайтесь, пожалуйста, к инструкции пользователя ThermoBrite.
При использовании системы ThermoBrite необходимо установить условия денатурации и гибридизации. Для более подробных разъяснений обратитесь к разделу по устранению неисправностей этой инструкции.

1. Для культивированных лимфоцитов и костного мозга установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 1 минуту. Для образцов, залитых в парафин, установите Melt Temp на 73ºC и Melt Time на 5 минут.
2. Установите Hyb Temp на 37 ºC и HybTime между 4 часами и ночным режимом.
3. По истечении времени гибридизации промойте препараты, используя процедуру быстрой отмывки.
4. Просушите стекла на воздухе, в темном помещении.
5. Нанесите 10 мкл флуоресцентного красителя на интересующую область и накройте покровным стеклом.

Методики контроля качества
С образцами тканей пациента должны быть проведены положительные и отрицательные контрольные пробы.
Ограничения при использовании
Интерпретация результатов FISH должна проводиться при должном контроле и использовании аналитических технологий необходимого уровня, а также учитывать клинические данные и результаты других методов обследования.[6]
Для использования в интерфазу каждой лаборатории необходимо установить аналитические ограничения для аномальных сигнальных искомых паттернов.
Предполагаемые результаты
Ожидаемый нормальный сигнальный паттерн двухцветного двойного зонда Vysis IGH/CCND1 XT – два оранжевых и два зеленых сигнала. Нетипичный сигнальный паттерн двухцветного двойного зонда Vysis IGH/CCND1 XT – один оранжевый, один зеленый и два гибридных сигнала. Могут встречаться другие аномальные сигнальные паттерны, в их характеристике способен помочь метафазный анализ.

Ошибочные результаты коденатурации
Морфология хромосом, наблюдаемая при гибридизации с использованием коденатурации, может отличаться от морфологии хромосом при стандартной гибридизации, где образец до нанесения зондов денатурируется и обезвоживается.

Проблема	Возможное решение
Перекрестная гибридизация	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Увеличьте температуру 0,4X SSC/0,3% NP-40 на 2ºC. При необходимости, продолжайте увеличивать температуру до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Уменьшите температуру плавления на 2ºC.
«Тусклые» зонды	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Увеличьте время гибридизации. • Увеличьте температуру плавления. При необходимости, увеличивайте температуру до тех пор, пока морфология не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4X SSC/0,3% NP-40 при температуре от 70ºC до 73ºC.
Рассеивание сигнала (точечное)	Повторите гибридизацию, применив одну из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня. • Для отмывки используйте 0,4X SSC/0,3% NP-40 при температуре от 73ºC до 76ºC.
Нечеткая морфология в метафазу	Повторите анализ для нового образца с использованием одной из следующих рекомендаций: • Уменьшите температуру плавления на 2ºC. • Уменьшите время плавления. **ПРИМЕЧАНИЕ**: при необходимости, уменьшайте температуру или время плавления до тех пор, пока интенсивность сигнала не достигнет приемлемого уровня.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	• Приготовление срезов: 1. Приготовьте раствор 2X SSC/1% параформальдегида. 2. Погрузите срезы в 2X SSC/1% параформальдегид на 1 минуту. 3. Погрузите срезы несколько раз в очищенную воду. 4. Проведите обезвоживание срезов в серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%). 5. Просушите стекла на воздухе и продолжайте приготовление с момента «Приготовление препаратов для коденатурации». • Если нечеткая морфология сохраняется, измените характер использования прибора ThermoBrite: 1. Подготовьте 280 мкл 70% формамида/раствора для денатурации 2X SSC (196 мкл формамида/28 мкл 2X SSC/56 мкл очищенной воды). 2. Запустите программу ThermoBrite Hold Temp при температуре 73ºC. 3. Поместите 10 мкл 70% формамида/2X SSC раствора для денатурации на каждую интересующую область и накройте покровным стеклом. 4. Когда ThermoBrite достигнет 73ºC, поместите срезы на нагревающую поверхность. Закройте крышку. 5. Извлеките срезы через 3 минуты. 6. Снимите покровное стекло. 7. Продолжите с этапа дегидратации «Приготовления препаратов для коденатурации» для процедуры анализа без использования коденатурации.

Советы и решение проблем

При просмотре результатов FISH-методики убедитесь, что Ваш микроскоп нормально работает и настроен должным образом.

Приведенный ниже, в таблице, список содержит некоторые нетипичные результаты, с которыми Вы можете встретиться при использовании зондов LSI. Приведены вероятные причины рассматриваемых проблем и предложения по улучшению качества проведения анализа.

Проблема	**Вероятная причина**	**Решение**
"Искаженная" морфология хромосомы	Срезы в процессе пробоподготовки были высушены слишком быстро.	Повысьте температуру водяной бани (увеличьте влажность) при погружении в нее срезов. Снизьте температуру столика с подогревом во время приготовления образца. Увеличьте время высушивания (как минимум – в течение ночи, затем оставьте срезы на самое меньшее 24 часа при комнатной температуре). Не подвергайте срезы воздействию высоких температур.
	Срезы подверглись избыточной денатурации.	Убедитесь, что раствор для денатурации был приготовлен согласно данной инструкции. Убедитесь, что перед погружением срезов температура раствора для денатурации составляет 73±1ºC; уменьшите ее до 72 ºC. Уменьшите продолжительность погружения слайда в раствор для денатурации до 1-3 минут.
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в раствор для денатурации.	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC или проведите обезвоживание при

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Срезы перед денатурацией имели слишком низкую температуру.	Выдержите срезы в течение как минимум 24 часов в условиях комнатной температуры.
Высокий фон слайда	Стекла были недостаточно очищены перед приготовлением препарата.	Погрузите стекла в EtOH и вытрите насухо, используя безворсовую бумагу для промокания.
	Клеточный детрит в образце.	Промойте детрит с помощью свежего фиксирующего раствора три раза и повторите для данного препарата процедуру раскапывания.
	Метафазные пластинки подвергались воздействию высоких температур или содержат цитоплазму.	Увеличьте время, в течение которого срез погружен в денатурирующий раствор, до 10 мин.
	Препарат не промыт должным образом после гибридизации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. Убедитесь, что pH и температура раствора требуемые. Снимите покровное стекло. Повторите процедуру отмывки.
	Промывочные растворы использовались в течение более длительного времени или хранились в неподобающих условиях.	Убедитесь, что промывочные растворы, содержащие формамид, хранятся при 4ºC. Утилизируйте их через 7 дней или после частого использования. Все остальные промывочные растворы используйте не более 1 дня. Убедитесь, что pH промывочных растворов, содержащих формамид, составляет от 7,0 до 8,0.
	Для визуализации гибридизации использованы длиннополосные пропускные фильтры.	Для уменьшения доли «фонового света» перейдите на фильтр с меньшей полосой пропускания или на многопропускные фильтры.
Отсутствие сигнала или слабые сигналы	Срез образца не денатурирован должным образом.	Перед тем, как погружать срезы в денатурирующий раствор, убедитесь, что температура раствора в емкости Коплина составляет 73±1ºC. Увеличьте температуру раствора для денатурации до 74ºC. Увеличьте время денатурации до 2-4 минут.
	Срез образца не подготовлен для FISH должным образом.	Свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular для того, чтобы получить протоколы подготовки образца для FISH-методики
	После нанесения образца («раскапывания») препарат не выдержан должным образом.	До проведения FISH выдержите препараты в течение 24 ч при комнатной температуре
	Срезы были недостаточно высушены перед погружением в	Перед денатурацией прогрейте срезы до температуры 45-50ºC

	раствор для денатурации.	или проведите обезвоживание при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты.
	Со срезами был проведен GTG-бэндинг.	Использование срезов после GTG-бэндинга в FISH-методике (обработка трипсином и красителем Гимза (trypsin-Giemsa)) может потребовать изменений в протоколах бэндинга и/или гибридизации. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular. Или приготовьте новые срезы образцов.
	Не добавлен зонд.	Приготовьте новую смесь зондов, она должны медленно достичь необходимой температуры. Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени. Медленно раскапайте зонды с помощью пипетки.
	Зонды, буфер для гибридизации или смесь зондов не перемешаны перед использованием.	Встряхните (vortex) или перемешайте с помощью пипетки реагенты; центрифугируйте в течение короткого времени.
	Зонды неправильно разведены для гибридизации.	Используйте указанные объемы для того, чтобы поддержать необходимые соотношения в смеси зондов (7 мкл буфера для гибридизации: 1 мкл зонда: 2 мкл очищенной воды). Убедитесь, что пипетка откалибрована. Буфер для гибридизации перед использованием должен прогреться и достичь комнатной температуры; раскапывайте медленно.
	Зонды не денатурированы должным образом.	Убедитесь, что температура водяной бани, используемой для денатурации смеси зондов, составляет 73±1ºC.
	ПРМЕЧАНИЕ: Не применимо для зондов, помещенных в буфер для гибридизации и денатурированных.	Денатурируйте смесь зондов в течение 5 минут.
	Зонды не нанесены на искомый образец непосредственно после денатурации зондов.	Планируйте так, чтобы зонды наносились сразу же после извлечения срезов из раствора EtOH 100%. Перед нанесением зонда убедитесь, что EtOH испарился. Извлеките пробирку со смесью зондов из водяной бани (73±1ºC) и сразу же положите пробирку на столик с подогревом (45-50ºC). Во время нанесения зондов на срез

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

		(раскапывание) держите пробирку на подогреваемом столике. Обрабатывайте только такое количество срезов, которое сможете исследовать и соблюдайте должную температуру и временные промежутки в соответствии с данной методикой исследования.
	Смесь зондов на срезе образца высушена слишком сильно.	Сразу же после нанесения смеси зондов накройте искомую область покровным стеклом При отмывке удаляйте покровное стекло с препарата за один прием и сразу же препарата погрузите этот препарат в промывочный раствор, до того, как снять покровное стекло со следующего препарата.
	Во время гибридизации под покровным стеклом появились пузырьки воздуха.	Положите покровное стекло с первого касания поверхности смеси зондов. Положите препарат с покровным стеклом на какую-либо прокладку и очень осторожно выдавите пузырьки воздуха.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что соблюдены установочные время и температура гибридизации. Убедитесь, что температура в термостате составляет 37ºС. Создайте хороший изолирующий слой вокруг покровного стекла при помощи резинового клея , не оставляя промежутков. Увеличьте время гибридизации.
	Неверные условия отмывки или использование неправильных растворов.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с этой инструкцией. Убедитесь, что температуры промывочных растворов равны установочным температурам процедуры отмывки. Убедитесь, что используемые термометры и pH – метры откалиброваны должным образом. Снимите покровные стекла до погружения препаратов в промывочный раствор.
	Нарушены условия хранения зондов или срезов образцов.	Храните неразведенные зонды при температуре -20ºС или ниже, в защищенном от света месте. Храните не гибридизованные срезы высушенными, при температуре -20ºС или ниже; или при комнатной температуре в течение короткого времени. Храните гибридизованные срезы при температуре -20ºС или ниже, в защищенном от света месте максимум в течение 3 недель.
	Использован неверный флуоресцентный краситель.	Снимите покровное стекло. Погрузите препараты на 5 минут в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Флуоресцентный краситель слишком яркий.	2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре: проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите и нанесите краситель снова.
	Для визуализации гибридизации используется неверный набор фильтров.	Многополосные пропускные фильтры дают меньше света, чем однополосные, поэтому сигналы от зондов при просмотре с использованием многополосных фильтров могут казаться слабее. Для визуализации флуорофора зонда используйте правильные фильтры. Для получения более подробной информации свяжитесь с технической службой компании Abbott Molecular.
	Конфигурация микроскопа или объективов не приспособлена для визуализации результатов FISH, или фильтры микроскопа повреждены.	Свяжитесь с производителем Вашего микроскопа.
Низкая специфичность сигнала	Зонды разведены неверно; часто в анализируемый образец добавляется слишком большое количество зондов.	Убедитесь, что смесь зондов приготовлена в соответствии с инструкцией.
	Неправильные условия гибридизации.	Убедитесь, что температура в термостате составляет 37°C. Убедитесь, что в смесь зондов добавлено должное количество буфера для гибридизации.
	Температура для промывки слишком низкая.	Не помещайте в емкость Коплина больше четырех стекол одновременно, и таким образом поддерживайте необходимую температуру промывочных растворов. Убедитесь, что температура промывочного раствора равна необходимой перед тем, как промывать еще одну группу препаратов.
	Промывочный раствор слишком низкой концентрации.	Убедитесь, что промывочные растворы приготовлены в соответствии с инструкцией. ПРИМЕЧАНИЕ: Чем ниже концентрация соли (SSC), тем выше концентрация формамида и NP-40, тем концентрированнее раствор.
Яркий или тусклый флуоресцентный краситель	Краситель тусклый: срезы не обезвожены до нанесения красителя или в красителе имеются жировые капли.	Снимите покровное стекло. Погрузите срезы на 5 минут в раствор 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре; проведите обезвоживание срезов при помощи серии растворов EtOH (70%, 85%, 100%), погружение в течение 1 минуты. Просушите на воздухе и нанесите краситель снова.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Неверная концентрация красителя.	Если краситель слишком яркий, разведите краситель в серии растворов (Номер в списке 06J290-010) до нанесения на срез.
	ПРИМЕЧАНИЕ: DAPI I в восемь раз более концентрированный, чем DAPI II.	
	Краситель слишком старый или подвергался воздействию света в течение длительного времени	Храните красители при -20ºC или ниже, в защищенном от света месте, используйте в таких же условиях. Убедитесь, что срок годности красителя не истек.

Библиография

1. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood*. 2005;106(8):2837-40.
2. Zelenetz AD, Abramson JS, Advani RH, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: non-Hodgkin's lymphomas. *J Natl Compr Canc Netw*.2009;3:1-156. Available at: http://www.nccn.org/ professionals/physician_gls/PDF/nhl.pdf. Accessed 2009.
3. Soverini S, Cavo M, Cellini C, et al. Cyclin D1 overexpression is a favorable prognostic variable for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autologous transplantation. *Blood*. 2003;102(5):1588-94.
4. Moreau P, Facon T, Leleu X, et al. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood*. 2002;100(5):1579-83.
5. Bang SM, Kim YR, Cho HI, et al. Identification of 13q deletion, trisomy 1q, and IgH rearrangement as the most frequent chromosomal changes found in Korean patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;168(2):124-32.
6. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupka PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med. 2006;8(1):16-23*
7. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3 (ISBN 1-56238-567-4). Clinical and Laboratory Standards Institute. 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
10. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая поддержка

Техническую помощь можно получить в технической службе компании Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 или на сайте Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Адрес уполномоченного представителя (AR)
ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Вейсбаден
Германия
Телефон: +49-6122-580

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold, ThermoBrite являются зарегистрированными товарными знаками группы компаний различной юрисдикции Abbott.
Все остальные товарные знаки являются собственностью соответствующих обладателей.

Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Вейсбаден
Германия

© 2010 Abbott Laboratories

http://www.abbottmolecular.com.

Июль 2012

30-608271/ R2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

/Логотип/ CEP 12 SpectrumOrange Набор ДНК-зондов

RU

ИСХ. № 07J20-012
07J22-012
30-608311/R3

CEP 12 SpectrumOrange
Набор ДНК-зондов
Исх.№ 07J20-012; 07J22-012
30-608311/R3

Описание используемых символов

	Производитель
ИСХ. №	Исходный номер
Диагностика in-vitro	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Содержит достаточное количество тестов
	Ограничение температур
	Опасность
	Опасность
	Опасность
	Биологическая опасность
	См. руководство по эксплуатации
	Использовать до
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

НАБОР ПРЯМОМЕЧЕНЫХ ДНК-ЗОНДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСЛА ХРОМОСОМ CEP 12 SPECTRUMORANGE ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ IN SITU
(Часть № 30-160012, список № 07J20-012;
Часть № 32-160012, список № 07J22-012)

ПАТЕНТОВАННОЕ НАЗВАНИЕ

Набор прямомеченых ДНК-зондов для флуоресцентной гибридизации CEP 12 SpectrumOrange

ОБЩЕЕ ИЛИ ОБЩЕПРИНЯТОЕ НАЗВАНИЕ

Реагенты для флуоресцентной гибридизации in situ (FISH)

ПРЕДУСМОТРЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Набор ДНК-зондов CEP 12 SpectrumOrange предназначен для обнаружения АТ-богатых последовательностей альфа-сателлитной ДНК в области центромеры хромосомы 12 в сочетании с плановым диагностическим цитогенетическим тестированием. Он показан для использования в качестве дополнения к стандартному цитогенетическому анализу для идентификации и подсчета числа хромосом 12 с помощью флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) в межфазных ядрах клеток, полученных из лимфоцитов периферической крови пациентов с В-клеточным хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ). Он не предназначен для использования в качестве самостоятельного анализа для составления отчетов об испытаниях; результаты FISH предназначены для представления и интерпретации только в сочетании с результатами стандартного цитогенетического анализа, выполняемого одновременно с использованием одного и того же образца пациента.

Анализ CEP 12 не был валидирован для целей, отличных от описанных выше. Он не предназначен для использования с тестовыми матрицами, отличными от лимфоцитов периферической крови пациентов с ХЛЛ, для скрининга анеуплоидии хромосомы 12, например, у бессимптомных лиц, или для мониторинга пациентов на наличие остаточных явлений заболевания.

ОБЗОР И ПОЯСНЕНИЯ

В настоящее время большинство пациентов с диагнозом ХЛЛ имеют раннюю стадию заболевания (классификация по методу Rai: 0 или 1). Пациенты с ранней стадией ХЛЛ представляют собой гетерогенную группу; примерно 30-50% из них подвержены высокому риску ускоренного прогрессирования заболевания, а остальные могут жить десятилетиями и, возможно, никогда не будут нуждаться в терапии. Недавние исследования биологических характеристик лейкозных В-клеток привели к открытию новых прогностических инструментов (статус мутации гена тяжелой цепи с переменной областью иммуноглобулина, цитогенетические аномалии, оцениваемые методом FISH, и экспрессия белка протеинкиназы 70 Z-цепи), которые могут способствовать идентификации пациентов с ранней стадией заболевания, подверженных высокому риску раннего прогрессирования заболевания.[1]
Профилактический анализ кариотипа выявляет хромосомные аберрации, связанные с ХЛЛ, только в 40-50% случаев. Использование метода FISH и других технологий позволило выявить геномные аномалии более чем в 80% случаев ХЛЛ. Распространенными геномными аберрациями являются трисомия 12 и делеции 13q, 17p и 11q.[2-4] Традиционные методики измерения трисомии 12 при ХЛЛ имеют определенные ограничения в том, что для анализа требуются метафазные клетки, а лейкозных клеток, доступных для анализа при ХЛЛ, относительно мало, поскольку скорость митоза лейкозных клеток in vitro невелика. Поэтому результаты традиционного метафазного анализа могут не отражать фактические пропорции клеток с трисомией 12 или без нее в образце.[6] Метод FISH с использованием зондов к центромерам хромосомы 12 может быть использован для оценки состояния хромосомы 12 в межфазных клетках.[7-10]

ОСНОВЫ ПРОЦЕДУРЫ

Флуоресцентная гибридизация in situ - это метод, позволяющий визуализировать специфические последовательности нуклеиновых кислот в клеточном препарате. В частности, флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) для ДНК включает в себя точный отжиг одноцепочечного, меченого флуорофором ДНК-зонда до последовательностей-мишеней комплементарного гена. Гибридизация зонда с центром клеточной ДНК видна при прямом обнаружении с помощью флуоресцентной микроскопии. Образцы периферической крови, состоящие из межфазных клеток, прикрепляются к предметным стеклам с использованием стандартных цитогенетических протоколов. Полученный образец ДНК денатурируют до его одноцепочечной формы, а затем позволяют гибридизировать с ДНК-зондом CEP 12. После гибридизации избыток и несвязанный зонд удаляют серией промывок, а хромосомы и ядра окрашивают ДНК-специфическим красителем DAPI (4,6 диамидино-2-фенилиндол), который флуоресцирует синим цветом. Гибридизация ДНК-зонда CEP 12 рассматривается с помощью флуоресцентного микроскопа, оснащенного соответствующими фильтрами возбуждения и эмиссионными фильтрами, позволяющими визуализировать как интенсивный оранжевый флуоресцентный сигнал, сконцентрированный в центромере хромосомы 12, так и окрашенную в синий цвет хромосому и ядра. Подсчет числа хромосом 12 проводится путем микроскопического исследования межфазных ядер. Флуоресцентно окрашенные центромеры хромосомы 12 ярко выделяются на фоне общей синей флуоресценции ядерной ДНК, обеспечиваемой веществом для контрастного окрашивания DAPI. Процедура CEP 12 позволяет визуально определить число хромосом 12 внутри ядер.
Результаты анализа представлены в виде процентного содержания ядер с 0, 1, 2, 3, 4, и > 4 флуоресцентными сигналами. Каждый флуоресцентный сигнал соответствует центромере хромосомы 12. Ядро, демонстрирующее 2 флуоресцентных сигнала, называется «двухсигнальным». Ядро, демонстрирующее 3 флуоресцентных сигнала, называется «трехсигнальным».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru



12p11.1-q11.1 CEP 12 SpectrumGreen для альфа-сателлитной ДНК

ДНК-зонд CEP 12 представляет собой спектральный прямомеченый флуоресцентный ДНК-зонд, специфичный для АТ-богатой последовательности альфа-сателлитной ДНК в области центромеры хромосомы 12 (12p11.1-q11.1). Этот анализ предназначен для обнаружения и количественного определения хромосом 12 в межфазных ядрах методом FISH.

РЕАГЕНТЫ И ПРИБОРЫ

Предоставляемые материалы

Этот набор содержит 4 реагента, достаточных для обработки приблизительно 20 анализов. Анализ определяется как одна целевая область размером 22 мм x 22 мм.

Таблица 1. Набор ДНК-зондов CEP 12 SpectrumOrange (Часть № 30-160012, список № 07J20-012)

Компонент	Состав	№ детали:	Содержание	Хранение
CEP 12 ДНК-зонд: Плазмид кишечной палочки (Зонд предварительно денатурирован)	2 нг/мкл Меченный флуорофором альфа-сателлитный ДНК-зонд SpectrumOrange предварительно смешивают с блокирующей ДНК и гибридизационным буфером. (сульфат декстрана, формамид, солевой раствор SSC)	30-170012	220 мкл/1 флакон	- 20°C, в защищенном от света месте.
Вещество для контрастного окрашивания DAPI II	125 нг/мл DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол) в фенилендиамина дигидрохлориде, глицерине и буфере.	30-804841	300 мкл/1 флакон	- 20°C, в защищенном от света месте.
NP-40	неионный детергент	30-804818	1 мл/1 флакон	от – 25 до 30°C
Стандартный солевой раствор (20X SSC)	хлорид натрия и цитрат натрия	30-805850	66 г/1 контейнер	от – 20 до 25°C

Таблица 2. Набор ДНК-зондов CEP 12 SpectrumOrange с контрольными стеклами ProbeChek (Часть № 32-160012, список № 07J22-012).

В комплект поставки входят следующие контрольные стекла ProbeChek в дополнение к компонентам, приведенным в **Таблице 1.**

Компонент	Состав	№ детали:	Содержание	Хранение
ProbeChek Стекла для отрицательного контроля 0% трисомии 8/12	Фиксированный биологический образец, полученный из нормальных (~0% трисомии 8/12) культивируемых клеток лимфобластов человека на предметных стеклах микроскопа	30-805000	5 стекол (10 целевых областей)	– 20°C, в сухом месте
ProbeChek Стекла для положительного контроля 10% трисомии 8/12	Фиксированный биологический образец, полученный из смеси (~10% трисомии 8/12 и ~90% дисомии 8/12) культивируемых клеток лимфобластов человека на предметных стеклах микроскопа	30-805002	5 стекол (10 целевых областей)	– 20°C, в сухом месте

ХРАНЕНИЕ И ОБРАБОТКА

Храните запечатанный набор ДНК - зондов CEP 12 как единое целое при температуре -20°C в защищенном от света и влажности месте. Соли 20X SSC и NP-40 можно хранить отдельно при комнатной температуре (от 15 до 30°C). Храните контрольные стекла ProbeChek при температур- 20°C в закрытом контейнере с осушителем, чтобы защитить их от влажности. Срок годности каждого из запечатанных компонентов указан на этикетках отдельных компонентов. Эти условия хранения распространяются как на вскрытые, так и на невскрытые компоненты.

Требуемые, но не предоставляемые материалы

Лабораторные реагенты

ПРИМЕЧАНИЕ: Если условия хранения не указаны в данном вкладыше или на этикетке продукта, храните реагент в соответствии с рекомендациями поставщика.

- Ультра-чистый класс формамида
- Этанол (100%). Хранить при комнатной температуре.
- Концентрированный (12 н.) раствор HCl
- 1 н. раствор NaOH
- Очищенная вода (дистиллированная, деионизированная или клиническая вода качества Milli-Q). Хранить при комнатной температуре.
- Фиксатор (3:1 метанол:уксусная кислота). Ежедневно готовьте свежий.
- Дриерит и газообразный азот

Лабораторное оборудование

- Флуоресцентный микроскоп оснащен рекомендованными фильтрами
- Фазоконтрастный микроскоп
- Предварительно очищенные предметные стекла микроскопа
- Столик с подогревом (45–50°C)
- Покровное стекло 22мм x 22мм
- Микролитровая пипетка (от 1 до 10 мкл) и стерильные наконечники
- Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки (0,5 мл или 1,5 мл)
- Таймер
- Магнитное перемешивающее устройство
- Вихревая мешалка
- Микроцентрифуга
- Мерный цилиндр
- Водяные ванны (67 ± 2°C и 73 ± 1°C)
- Воздушный инкубатор (42°C)
- Скрейбер с алмазным наконечником
- Увлажненная камера
- Пинцеты
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Емкости Коплина (6) Предлагаемый тип: продукт Уитона. Вертикальный сосуд для окрашивания № 900620
- pH-метр и индикаторная pH-бумага
- Калиброванный термометр
- Проволочные пробирочные штативы
- Каучуковый клей
- Блок фильтрации с порами размером 0,45 мкм

Микроскопическое оборудование и фильтры

Микроскоп: Для просмотра результатов гибридизации необходим флуоресцентный микроскоп с осветителем отражённого света. Микроскоп должен быть проверен, чтобы убедиться, что он работает правильно, чтобы обеспечить оптимальный осмотр образцов при анализе флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) Микроскоп, используемый для обнаружения общих следов ДНК, таких как DAPI, йодид пропидия и квинакрин, может работать неправильно для анализов флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Рекомендуется регулярная очистка микроскопа и периодические “настройки” техническим представителем изготовителя, особенно выравнивание лампы, если это необходимо.

Источник света возбуждения: Рекомендуемым источником возбуждения является 100-ваттная ртутная лампа или другая лампа с аналогичной интенсивностью и спектральной выходной мощностью. Следует проконсультироваться с техническим представителем изготовителя, чтобы убедиться в том, что система флуоресцентного освещения подходит для просмотра образцов анализа флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Регистрируют количество часов, в течение которых использовалась лампа, и заменяют ее до того, как номинальное время работы будет превышено. При необходимости, убедитесь, что лампа правильно выровнена.

Объективы: Используйте масляные иммерсионные флуоресцентные объективы с числовыми апертурами > 0,75 при использовании микроскопа со 100 - ваттной ртутной лампой или другой лампой с аналогичной интенсивностью и спектральной выходной мощностью. Объектив с 40-кратным увеличением в сочетании с 10-кратными окулярами подходит для сканирования образца с целью выбора областей для определения числа частиц. Удовлетворительные результаты для определения числа сигналов FISH могут быть получены с помощью масляного погружного ахроматического объектива с 63-кратным или 100-кратным увеличением.

Иммерсионное масло: Иммерсионное масло, используемое с иммерсионными объективами, должно быть предназначено по составу для низкой автофлуоресценции и специально для использования в флуоресцентной микроскопии.

Фильтры: Линейка наборов фильтров для многополосных флуоресцентных микроскопов Abbott Molecular была оптимизирована для анализа с использованием системы прямого подсчета хромосом методом CEP. Полные, собранные и выровненные наборы фильтров Abbott Molecular доступны для большинства моделей микроскопов. Рекомендуемым фильтром для набора ДНК-зондов SpectrumOrange CEP 12 является двухдиапазонный фильтр DAPI/Orange, который позволяет одновременно возбуждать и выделять флуорофоры SpectrumOrange и DAPI (синие) (см. прайс-лист Abbott Molecular или свяжитесь с техническим отделом Abbott Molecular по телефону 1-800-553-7042 в США и по телефону +49-6122-580 за пределами США для получения дополнительной информации о наборах фильтров Abbott Molecular).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приготовление рабочих растворов реагентов

Стандартный солевой раствор (20X SSC)

Для приготовления объединяют:

66 г	Стандартный солевой раствор (20X SSC)
200 мл	Вода очищенная
250 мл	конечный объем

Тщательно перемешивают. Измеряют pH при комнатной температуре с помощью pH-метра. При необходимости доводят уровень pH до 5,3 с помощью концентрированного HCl. Доводят до общего объема 250 мл. Фильтруют через фильтр с порами размером 0,45 мкм. Хранят в закрытой таре при комнатной температуре до 6 месяцев.

Денатурирующий раствор

Для приготовления объединяют:

49 мл	Формамид
7 мл	Стандартный солевой раствор (20X SSC), pH 5,3
14 мл	Вода очищенная
70 мл	конечный объем

Хорошо перемешивают и помещают в стеклянную емкость Коплина. Измеряют pH при комнатной температуре с помощью pH-метра. Необходимо подтвердить, что pH находится в диапазоне от 7,0 до 8,0. Хранят в закрытом контейнере при температуре от 2 до 8°C. Этот раствор можно использовать до 1 недели. Значение pH проверяют перед каждым использованием.

Промывочные растворы этанола

Готовят разведения об/об 70%, 85% и 100% этанола, используя 100% этанол и очищенную воду. Хранят при комнатной температуре в плотно укупоренных емкостях. Растворы можно использовать в течение 1 недели до тех пор, пока не будет отмечено испарение или раствор не станет слишком разбавленным из-за чрезмерного использования.

Промывочный раствор 0,4x SSC

Для приготовления объединяют:

950 мл	Вода очищенная
20 мл	Стандартный солевой раствор (20X SSC), pH 5,3
1000 мл	конечный объем

Тщательно перемешивают. Измеряют pH при комнатной температуре с помощью pH-метра. При необходимости, доводят уровень pH до 7,0–7,5. Объем доводят до 1 литра водой. Фильтруют через фильтр с порами размером 0,45 мкм. Хранить неиспользованный раствор в закрытой таре при комнатной температуре до 6 месяцев. Утилизируют раствор, используемый в анализе, в конце каждого дня.

0,1% nP-40 в промывочном растворе 2x SSC

Для приготовления объединяют:

100 мл	Стандартный солевой раствор (20X SSC), pH 5,3
849 мл	Вода очищенная
1 мл	NP-40
1000 мл	конечный объем

Тщательно перемешивают. Измеряют pH при комнатной температуре с помощью pH-метра. Уровень pH доводят до 7,0–7,5 с помощью 1 н. раствора NaOH. Объем доводят до 1 литра водой. Фильтруют через фильтр с порами размером 0,45 мкм. Добавляют 70 мл в емкость Коплина и выдерживают при комнатной температуре. Хранить неиспользованный раствор в закрытой таре при комнатной температуре до 6 месяцев. Утилизируют раствор, используемый в анализе, в конце каждого дня.

ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Диагностика in vitro **Медицинское изделие для диагностики in vitro.**

1. Для использования при диагностике in vitro
2. Все биологические образцы должны рассматриваться как способные передавать возбудителей инфекции. Контрольные стекла, поставляемые с этим набором, изготовлены из культивируемых клеток лимфобластов человека, которые были зафиксированы в растворе метанола:уксусной кислоты (3:1, об:об). Поскольку зачастую невозможно определить, какой из них может быть заразным, все человеческие образцы и контрольные предметные стекла должны быть обработаны с соблюдением универсальных предосторожностей. Рекомендации по обращению с образцами можно получить в центрах США по контролю и профилактике заболеваний.11
3. На условия гибридизации может отрицательно повлиять использование реагентов, отличных от предоставленных и рекомендованных компанией Abbott Molecular, Inc.
4. Несоблюдение всех процедур денатурации, гибридизации и обнаружения сигналов стекол может привести к неприемлемым или ошибочным результатам.
5. Флуорофоры легко обесцвечиваются при воздействии света. Чтобы ограничить эту деградацию, работайте со всеми растворами, содержащими флуорофоры, при пониженном освещении. Сюда входят все шаги, связанные с использованием гибридизированного стекла. Выполняйте все действия, не требующие освещения для манипуляций (инкубационные периоды, промывки и т.д.) в темноте.
6. Зонд CEP 12 содержит формамид, тератоген. Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
7. Калиброванные термометры необходимы для измерения температуры растворов и водяных ванн.
8. Все опасные материалы должны быть утилизированы в соответствии с местными и государственными руководящими документами по утилизации опасных отходов.

ДНК-зонд CEP 12 SpectrumOrange



ВНИМАНИЕ: Этот препарат содержит компоненты человеческого происхождения и/или компоненты потенциальных возбудителей. Ни один известный метод испытаний не может дать полной гарантии того, что продукты, полученные от человека, или инактивированные микроорганизмы не передадут инфекцию. Эти реагенты и человеческие образцы должны обрабатываться как инфекционные с использованием безопасных лабораторных процедур, описанных в разделе «Биологическая безопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях»,[13] стандартах OSHA по переносимым с кровью патогенам,[14] документе Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) M29-A3,[15] и других соответствующих практических руководствах по биологической безопасности.[16] Поэтому все материалы, полученные от человека, должны считаться инфекционными.

Сюда входят следующие меры предосторожности, но не ограничиваясь ими:

- При работе с образцами или реагентами надевайте перчатки.
- Не пипетировать ртом.
- Не есть, не пить, не курить, не наносить косметику и не пользоваться контактными линзами в тех местах, где используются данные материалы.
- Очистите и продезинфицируйте розливы образцов, используя туберкулоцидное дезинфицирующее средство, такого как 1,0% гипохлорит натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.[13]
- Обеззараживайте и утилизируйте все потенциальные возбудители инфекции в соответствии с местными, государственными и федеральными нормами.[16]

ДНК-зонд CEP 12 SpectrumOrange



Опасность

Компоненты маркировки, определяющие опасность:

Формамид

H360	Может повлиять на фертильность или навредить нерожденному ребенку.
P201	Перед использованием получите специальные инструкции.
P202	Не используйте устройство до тех пор, пока не будут прочитаны и изучены все меры предосторожности.
P281	Используйте требуемые средства индивидуальной защиты.
P308+P313	При воздействии или потенциальном воздействии: Обратиться за медицинской помощью.
P405	Хранить под замком.
P501	Этот материал и его контейнер должны быть утилизированы безопасным способом.

NP-40



Опасность

Компоненты маркировки, определяющие опасность:

Полиэтиленгликоль октилфениловый эфир

H302	Опасно при проглатывании.
H318	Вызывает серьезное повреждение глаз.
H412	Вредно для водных организмов. Последствия будут продолжительными.
P280	Надевать защитные перчатки/защитную одежду/ средства защиты глаз.
P264	После использования тщательно мыть руки.
P273	Не допускать попадания в окружающую среду.
P305+ P351+ P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промывайте водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы при их наличии и при возможности. Продолжайте промывать.
P501	Этот материал и его контейнер должны быть утилизированы безопасным способом.

Паспорта безопасности материалов (ПБМ) для всех реагентов, входящих в комплект поставки, можно получить по запросу в техническом отделе Abbott Molecular (1-800-553-7042 -в США; и +49-6122-580 - за пределами США).

СБОР, ОБРАБОТКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКОЛ

Отбор и обработка образцов

Забор периферической крови должен проводиться в соответствии с руководящими принципами лаборатории. Руководство ACT содержит ряд рекомендаций по сбору и культивированию образцов.[5] Подготовка образцов и условия культивирования должны быть подходящими для анализа B-клеток с использованием промотирующего опухоль агента (ПОА) и/или интерлейкина-2 (ИЛ-2) в качестве митогенов. Согласно руководству ACT, кровь можно культивировать до 4 дней после сбора, однако следует с осторожностью избегать высоких температур. Образцы должны храниться при комнатной температуре или при температуре охлаждения выше 4°C; образцы крови никогда не должны быть покрыты льдом или заморожены.[5]

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Иктеричные или гемолизированные образцы могут препятствовать правильной культуре. Следует избегать воздействия на образцы кислот, сильных оснований или очень высоких температур. Такие условия, как известно, повреждают ДНК и могут привести к сбою анализа флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).

Подготовка предметных стекол из неподвижных клеточных масс

Для приготовления предметных стекол из культивируемых образцов можно использовать следующий метод:

1. Необходимо поместить водяную баню и увлажнитель воздуха в устройство для удержания влажности, которое имеет доступ с передней стороны. Переднюю часть защитного устройства необходимо неплотно накрыть полиэтиленовой пленкой, не перекрывая полностью доступ внутрь. Если показания комнатного гигрометра ниже 45%, следует использовать увлажнитель воздуха.
2. Предварительно нагревают водяную баню до 67 ± 2°C. В центр водяной бани помещают штативы для пробирок так, чтобы они не касались стенок ванны. На протяжении всей процедуры необходимо поддерживать уровень воды в верхней части штатива для пробирок.
3. Клеточную массу с фиксатором подготавливают так, чтобы суспензия была слегка мутной.
4. Предметное стекло микроскопа очищают, залив обе стороны предметного стекла 70%-ным этанолом (используйте гибкую бутылку). Предметное стекло протирают насухо, проводя лабораторной салфеткой вниз по длине предметного стекла от помеченного конца. Используют карандаш для пометки стекла нарисованным пламенем.
5. Очищенные стекла погружают в емкость Коплина, содержащую фиксатор. Наклонить предметное стекло, чтобы равномерно покрыть его верхнюю поверхность фиксатором.
6. Сразу же подержать предметное стекло над водяной баней. Держа пастеровскую пипетку на 2-4 дюйма выше предметного стекла, вытеснить 3-4 капли суспензии клеточных образцов по всей длине предметного стекла.
7. Поместить предметное стекло лицевой стороной вверх на верхнюю часть штатива для пробирок в водяной бане. Необходимо позволить предметному стеклу высохнуть в течение 10 минут.
8. Снять предметное стекло со штатива для пробирок и посмотреть под фазово-контрастным микроскопом. Исследовать количество интерфаз в поле зрения под малым увеличением (объектив с 10-кратным увеличением). Для получения оптимальных результатов анализа требуется использовать не менее 100 клеток в поле зрения. Довести образец клеточной суспензии свежим фиксатором до рекомендуемого количества межфазных ядер.
9. Аккуратно очертить область, содержащую межфазные ядра на обратной стороне стекла с помощью гравера с алмазным наконечником. Поскольку для формирования зоны гибридизации необходимо использовать покровное стекло (22 мм x 22 мм), очерченная область должна находиться в пределах площади покровного стекла. На одно предметное стекло может быть использовано до 2-х покровных стекол.
10. Поместить стекла с образцами в коробку для предметных стекол.
11. Выдержать стекла с образцами при комнатной температуре в течение 24 часов в открытой коробке перед гибридизацией или хранением.

Хранение предметных стекол

Поместить подготовленные стекла в закрытую коробку для предметных стекол. Запечатайте коробку с предметными стеклами в полиэтиленовый пакет, продуваемый газообразным азотом и содержащий примерно 1 столовую ложку дриерита. Хранить при температуре -20°C до начала гибридизации.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА: ОБЗОР ПРОЦЕДУРЫ FISH

Денатурация ДНК образца:

1. Предварительно разогревают камеру гибридизации (герметичный контейнер) до 42°C, поместив ее в инкубатор с температурой 42°C перед подготовкой предметного стекла.
2. Добавляют денатурирующий раствор в емкость Коплина и поставить на водяную баню с температурой 73 ± 1°C не менее чем на 30 минут. Температуру раствора проверяют перед использованием.
3. Денатурируют ДНК образца, погружая подготовленные предметные стекла в денатурирующий раствор при температуре 73 ± 1°C на 5 минут. Не следует денатурировать более 4 предметных стекол на сосуд Коплина за один раз. Перед использованием следует убедиться в том, что pH денатурирующего раствора составляет от 7,0 до 8,0.
4. Предметные стекла удаляют пинцетом из денатурирующего раствора и немедленно помещают в 70%-ный промывочный раствор этанола при комнатной температуре. Предметное стекло встряхивают, чтобы удалить формамид. Дают постоять в промывочном растворе этанола в течение 1 минуты.
5. Предметные стекла вынимают из 70% этанола. Повторяют шаг 4 с 85% этанолом, а затем со 100% этанолом.
6. Излишки этанола сливают с предметного стекла, прикоснувшись нижним краем предметного стекла к промокательной бумаге, и насухо вытирают нижнюю сторону предметного стекла лабораторной салфеткой.
7. Предметное стекло(а) помещают на подогревательный столик с температурой от 45 до 50°C не более чем за 2 минуты до готовности применить зондовый раствор.

   ПРИМЕЧАНИЕ: если время гибридизации таково, что предметное стекло готово более чем за 2 минуты до готовности зонда, предметное стекло должно оставаться в емкости со 100% этанолом. Не сушить предметное стекло на воздухе перед тем, как поместить его на подогревательный столик.

Подготовка зонда

1. Необходимо позволить зонду нагреться до комнатной температуры, тем самым уменьшив вязкость и обеспечив точное пипетирование.
2. Перемешивают на вортексе. В течение непродолжительного времени (от 1 до 3 секунд) пробирки вращают в микроцентрифуге, чтобы довести содержимое до дна пробирки. Осторожно перемешивают на вортексе.

   ПРИМЕЧАНИЕ: зонд предварительно денатурирован и готов к нанесению на денатурированную целевую область на предметном стекле с образцом.

Гибридизация

1. Наносят 10 мкл аликвоты зондового раствора на целевую область предметного стекла. Незамедлительно поверх зондового раствора помещают покровное стекло размером 22 x 22 мм и дают раствору равномерно распределиться под покровным стеклом. Пузырьки воздуха будут мешать гибридизации, и их следует избегать.

   ПРИМЕЧАНИЕ: Запрещается пипетировать раствор зонда на несколько целевых областей перед применением покровных стекол.
2. Предметное стекло помещают в предварительно нагретую до 42°C гибридизационную камеру и плотно накрывают ее крышкой.
3. Камеру с предметным стеклом помещают в инкубатор при температуре 42°C и позволяют гибридизации продолжаться не менее 30 минут.

   ПРИМЕЧАНИЕ: Для достижения достаточной интенсивности сигнала в некоторых образцах может потребоваться более длительное время гибридизации. Инкубацию можно проводить в течение ночи (16 часов). При инкубации более 1 часа покровное стекло должно быть герметизировано с помощью съемного герметика, такого как резиновый клей, а камера гибридизации должна быть увлажнена. Процедура описана ниже.

- Набирают резиновый клей в шприц объемом 5 мл. Выделяют небольшое количество резинового клея по периферии покровного стекла, перекрывая покровное стекло и предметное стекло, образуя уплотнение вокруг покровного стекла.
- Предметное стекло помещают во влажную гибридизационную камеру (герметичный контейнер с кусочком влажной промокательной бумаги или бумажным полотенцем размером примерно 1 x 3 дюйма, приклеенным скотчем сбоку контейнера).
- Камеру накрывают плотной крышкой и инкубируют от 1 до 16 часов, по желанию.
- После инкубации резиновый клей удаляют с покровного стекла, потянув резиновый клей вверх.

Промывки после гибридизации

1. 0,4 X SSC (pH от 7,0 до 7,5) добавляют в емкость Коплина. Раствор 0,4X SSC предварительно нагревают после гибридизации, поместив сосуд Коплина в водяную баню при температуре 73 ± 1°C не менее чем на 30 минут или пока температура раствора не достигнет 73 ± 1°C.

   ПРИМЕЧАНИЕ: для поддержания надлежащего температурного диапазона необходимо за 1 раз поместить в нагретый промывочный раствор 4 предметных стекла. Если было гибридизировано менее 4 предметных стекол, то для доведения числа предметных стекол до 4 можно использовать предметные стекла микроскопа комнатной температуры (без применения образца). Если было гибридизировано более 4 предметных стекол, то они должны быть промыты более чем в 1 партии. Температуру промывочного раствора необходимо вернуть к 73 ± 1°C перед промывкой каждой партии.
2. Покровное стекло снимают с целевой области первого предметного стекла и немедленно помещают предметное стекло в емкость Коплин, содержащую 0,4 X SSC, 73 ± 1°C. Предметное стекло взбалтывают в течение 1-3 секунд. Процедуру повторяют для остальных 3 предметных стекол и инкубируют в течение 2 минут при температуре 73 ± 1°C.

   ПРИМЕЧАНИЕ: Запрещается снимать покровные стекла с нескольких предметных стекол перед тем, как поместить любое из стекол в промывочную ванну. Необходимо начать отсчет времени 2-минутной инкубации, когда в промывочную ванну добавляется последнее предметное стекло.
3. Каждое предметное стекло удаляют из промывочной ванны и помещают в емкость с 2X SSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре на 5-60 секунд, перемешивая в течение 1-3 секунд после помещения предметных стекол в ванну.
4. Предметному стеклу необходимо дать высохнуть на воздухе в темноте. (Достаточно закрытого ящика или полки внутри закрытого шкафа.)
5. 10 мкл контрастного красителя DAPI II наносят на целевую область предметного стекла и накрывают покровным стеклом. Перед подсчетом сигналов предметные стекла хранят в темноте.

Хранение

Гибридизированные предметные стекла (с покровными стеклами) хранят при температуре -20°C в темноте. В этих условиях предметные стекла могут храниться до 12 месяцев без существенной потери интенсивности сигнала флуоресценции. Для длительного хранения покровные стекла должны быть герметизированы, чтобы предотвратить высыхание, а предметные стекла должны храниться при температуре -20°C.

Подсчет сигналов

Оценка пригодности предметных стекол

Оценку пригодности предметных стекол проводят с использованием следующих критериев.

- Интенсивность сигнала зонда: сигнал должен быть ярким, четким и легко поддающимся оценке. Сигналы должны быть яркими, компактными, овальными или волокнистыми, рассеянными, овальными.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Фон: Фон должен быть темным или черным и свободным от флуоресцентных частиц или туманности.
- Перекрестная гибридизация/специфичность мишени: Зонд должен гибридизировать и освещать только мишень (центромеру хромосомы 12). Для проверки специфичности локуса и выявления любой перекрестной гибридизации с нецелевыми последовательностями должны быть оценены распространения метафазы. По крайней мере 98% клеток должны показывать 1 или более сигналов для приемлемой гибридизации (см. руководство по определению числа сигналов ниже).

Если какие-либо из вышеперечисленных характеристик не отвечают требованиям, смотрите Руководство по устранению неполадок, **Таблица 3**, и используйте свежее предметное стекло.

Выбор оптимальной области обзора и оцениваемых ядер

Для сканирования гибридизованной области и изучения распределения образцов необходимо использовать объектив с 25-кратным увеличением. Необходимо выбрать область, где наблюдается низкая концентрация образца, несколько межфазных ядер перекрываются, и несколько межфазных ядер могут быть отсканированы в пределах поля обзора. Необходимо избегать областей с высокой концентрацией клеток, где клетки перекрываются, или ядерная граница отдельных ядер неидентифицируема. Избегать областей, содержащих скопление клеток. Перечисляют только клетки с дискретными сигналами.

Сканирование для определения числа

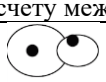
Используя объектив с 40-кратным или 63-кратным увеличением, необходимо начать анализ в верхнем левом квадранте выбранной области и, сканируя слева направо, подсчитать количество сигналов в каждом оцениваемом метафазном распространении или в пределах ядерной границы каждой оцениваемой межфазной клетки Области на слайде с высокой концентрацией клеток должны быть случайным образом пропущены, чтобы сканировать всю целевую область. Сканирование продолжают до тех пор, пока не будет подсчитано и проанализировано 500 межфазных ядер. Если более 2% ядер не показывают сигнала гибридизации после подсчета частиц 200 ядер, предметное число должно быть обозначено как сбой гибридизации, о результатах не сообщают.

Подсчет межфазных частиц

Флуоресцентные сигналы подсчитывают в каждом оцениваемом межфазном ядре с помощью объектива с 40-кратным или 63-кратным увеличением. Необходимо следовать инструкциям по подсчету сигналов, приведенным на **рисунке**. Для проверки или разрешения вопросов о расщепленных или рассеянных сигналах следует использовать объективы с более высокой степенью увеличения (например, с 63-кратным или 100-кратным увеличением).

- Два сигнала, которые находятся в непосредственной близости и имеют примерно одинаковый размер, но не связаны видимой связью, считаются 2 сигналами.
- Диффузный сигнал необходимо считать равным 1 сигналу, если диффузия сигнала непрерывна и находится в пределах допустимой границы.
- Два небольших сигнала, соединенных видимой связью, считаются 1 сигналом.
- Подсчитывают число ядер с 0, 1, 2, 3, 4, или > 4 сигналами. Ядра с 0 сигналов считают только в том случае, если в поле зрения присутствуют другие ядра с хотя бы 1 сигналом. Если точность подсчета вызывает сомнения, повторите подсчет в другой области предметного стекла.
- Не подсчитывайте ядра с неопределенными сигналами.

Рисунок. Примеры изображений и рекомендации по подсчету межфазных сигналов

1		Не считать, пропустить. Это может быть 2 ядра с 1 сигналом каждое или с 1 скрученным ядром.
2		Считать как 2 сигнала. Один очень компактный, другой рассеянный.
3		Не считать, пропустить. Наблюдатель не может определить, какое ядро содержит сигналы.
4		Считать как 2 сигнала. Один сигнал разделен.
5		Считать как 3 сигнала.
6		Считать как 3 сигнала. Один сигнал разделен.
7		Считать как 4 сигнала.

Контроль качества

Использование контрольных предметных стекол

Предметные стекла для положительного контроля (низкоуровневая трисомия 12) и отрицательного контроля (приблизительно 0% трисомии 12) должны быть исследованы одновременно со стеклами пациента для мониторинга эффективности анализа и оценки точности подсчета сигналов. Контроли следует анализировать каждый день тестирования методом FISH с использованием каждой новой партии набора зондов. Рекомендуется использовать контрольные стекла ProbeChek

Соответствие стекол и подсчет сигналов должны оцениваться с использованием критериев, описанных выше в разделе «Подсчет числа сигналов». Критерии соответствия должны быть выполнены, а результаты подсчетов сигналов должны соответствовать техническим требованиям, указанным в технических паспортах, прилагаемых к контрольным стеклам, для обеспечения приемлемых результатов испытаний.

Если контрольные предметные стекла не соответствуют критериям приемлемости, возможно, анализ не был проведен должным образом или компоненты набора ДНК-зондов CEP 12 SpectrumOrange могли сработать ненадлежащим образом. Может потребоваться повторный анализ со свежими контрольными предметными стеклами и предметными стеклами пациентов. Смотрите Руководство по поиску и устранению неисправностей в **таблице 3**, чтобы узнать о возможных причинах и действиях, необходимых для устранения проблем.

Если контрольные предметные стекла соответствуют критериям приемлемости, но значения подсчета числа частиц выходят за пределы указанного диапазона, подсчет мог быть выполнен неправильно, и может потребоваться повторный независимый анализ того же предметного стекла.

Ни в коем случае не следует указывать результаты плановой флуоресцентной гибридизации in situ (FISH), если контроли не дали результатов. Для клинических образцов, когда интерпретация сигнала гибридизации затруднена, а образца для повторного анализа недостаточно, тест считается неинформативным. Если клеток для анализа недостаточно, тест считается неинформативным.

Метафазные распределения должны быть проанализированы для проверки специфичности локуса и обеспечения отсутствия последовательностей перекрестной гибридизации в альтернативных расположениях хромосом.

ПРИМЕЧАНИЕ: Упаковки ProbeChek содержат 5 положительных контрольных стекол (низкоуровневая трисомия 8/12, часть № 30-805002) или 5 контрольных стекол (нетрисомия, часть № 30-805000). Допустимый диапазон для % трехсигнальных межфазных ядер указан в техническом паспорте, сопровождающем данные стекла.

Таблица 3. Руководство по устранению неисправностей

Проблема	Вероятная причина	Решение
• Сигнал отсутствует или слабые сигналы	• Неправильный набор фильтров для просмотра предметного стекла	• Используйте правильные фильтры
	• Микроскоп не работает должным образом	• Обратитесь к техническому представителю производителя микроскопа
	• Неправильные лампы (например, ксеноновые или вольфрамовые)	• Используйте ртутную лампу (рекомендуется 100 Вт)
	• Слишком старая ртутная лампа	• Замените на новую лампу
	• Ртутная лампа сместилась	• Выровняйте лампу
	• Грязные и/или потрескавшиеся линзы коллектора	• Очистите и замените линзу
	• Грязное или разбитое зеркало в светильнике	• Очистите и замените зеркало
	• Неподходящие объективы	• Используйте рекомендуемые объективы
	• Зонды не денатурированы должным образом	• Проверьте температуру водяной бани 75 ± 1°C
	• Несоответствующие условия гибридизации	• Проверьте температуру инкубатора 42°C • Увеличьте время гибридизации до 1 часа
	• Несоответствующие условия промывки	• Проверьте температуру водяной бани 75 ± 1°C • Проверьте состав промывочных ванн (например, pH)
	• Пузырьки воздуха задерживаются под покровным стеклом и препятствуют доступу зонда	• Нанесите покровное стекло, сначала прикоснувшись к поверхности смеси для гибридизации
	• Датчики неправильно хранили	• Храните зонды при температуре -20°C в темноте
• Низкая специфичность сигнала	• Несоответствующие условия гибридизации	• Проверьте температуру инкубатора 42°C
	• Слишком низкая температура промывки	• Поддерживайте температуру промывки на уровне 75 ± 1°C

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 3. Руководство по устранению неисправностей (продолжение)

Проблема	Вероятная причина	Решение
• Интенсивный фон стекла	• Клеточный дебрис в клеточном препарате	• Клеточный препарат промывают 5 раз свежим фиксатором и повторяют процедуру **подготовки предметного стекла**
	• Образец ДНК не чистый	• Заменить пост-гибридизационный промывочный раствор 0,4 x SSC на промывочный раствор из формамида следующим образом: 1. промыть предметные стекла трижды в течение 10 минут каждый в 50% растворе формамида/2X SSC с pH от 7,5 до 8,0 при 46 ± 1°C 2. промыть предметные стекла один раз в течение 10 минут в растворе 2X SSC при температуре 46 ± 1°C 3. промыть предметные стекла один раз в течение 5 минут в растворе 2X SSC/0,1% NP-40 при температуре 46 ± 1°C
	• Использование длинноволновых пропускающих фильтров, которые пропускают много света	• Перейти на фильтры с меньшей полосой пропускания или многополосные фильтры
	• Промывки при неправильной температуре или неправильном составе	• Проверить температуру ванны, pH и/или состав
	• Стекла не были должным образом очищены до того, как на них были нанесены целевые клетки	• Погрузить предметные стекла в этанол и протереть лабораторной салфеткой перед нанесением клеток
• "Искаженная" морфология хромосом	• Предметные слайды были слишком быстро высушены во время подготовки образца	• Повышение относительной влажности воздуха при подготовке предметного стекла • Повысить температуру водяной бани при подготовке предметного стекла
	• Предметные стекла являются слишком свежими перед денатурацией	• Увеличьте время сушки предметных стекол с образцами • Подвергнуть предметные стекла старению на протяжение не менее 24 часов при комнатной температуре до денатурации
	• Предметные стекла не были полностью высушены перед денатурацией	• Нагреть предметные стекла при температуре 45°C в течение 10-15 минут перед денатурацией
	• Слишком высокая температура в денатурирующей ванне	• Проверить температуру водяной бани
• Чрезмерно яркий сигнал	• Концентрация зонда слишком высока для Вашего микроскопа	• Попробовать заблокировать часть сигнала, поместив фильтр нейтральной плотности в канал возбуждения

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕСТА

Результаты по подсчету числа частиц 500 межфазных ядер представлены в виде числа и процента ядер с 1, 2, 3, 4 и > 4 сигналами. Клинические образцы с > 2,0% трисигнализированных ядер считаются имеющими аномальный клон трисомии 12; т.е., образцы с ≤ 2,0% считаются нормальными, хотя наличие трисомии 12 не может быть полностью исключено.

Если процент трехсигнальных межфазных ядер находится у предельного значения (1,5–2,5%), результаты следует интерпретировать с осторожностью. Если результаты стандартных цитогенетических и FISH исследований не совпадают или результаты не согласуются с клиническими данными, следует тщательно изучить основание для любых расхождений. Расхождения в результатах между методами тестирования могут быть вызваны неточными результатами от 1 или более методов тестирования, различиями в аналитической чувствительности/специфичности методов, фактическими различиями в статусе хромосомы 12 среди клеточных популяций, оцененных с помощью различных методов (например, циклические метафазные клетки по сравнению с нециклическими межфазными клетками) и другими причинами. Если результаты 1 или более методов испытаний неоднозначны или если процент трехсигнальных межфазных ядер находится у порогового значения (1,5 - 2,5%), результаты следует интерпретировать с осторожностью и может потребоваться дальнейшая оценка испытуемого образца. Повторный анализ FISH (исследование одновременно с материалом ОТК) и/или повторный стандартный цитогенетический анализ оставшегося образца могут быть полезны для оценки возможности неверных результатов испытания. Если основание для каких-либо расхождений в результатах теста не определено или если результаты теста не согласуются с клиническими данными, то необходима консультация между цитогенетиком и лечащим врачом.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Набор ДНК-зондов CEP 12 был оптимизирован только для идентификации хромосомы 12 в межфазных ядрах образцов периферической крови пациентов с В-клеточным хроническим лимфолейкозом.
2. Клиническая интерпретация любой аномалии или ее отсутствия методом FISH должна проводиться в сочетании со стандартным цитогенетическим анализом и при помощи надлежащих контролей, а также оцениваться в контексте истории болезни пациента и прошлых результатов диагностических лабораторных исследований.
1. Клинические образцы с > 2,0% трисигнализированных ядер считаются образцами, имеющими аномальный клон трисомии 12. Образцы с ≤ 2,0% трисигнализированных ядер следует считать нормальными, хотя наличие трисомии 12 полностью не исключается. Если процент трехсигнальных межфазных ядер находится у предельного значения (1,5–2,5%), результаты следует интерпретировать с осторожностью.
2. Анализ CEP 12 был валидирован только для использования с лимфоцитами периферической крови, полученными от пациентов с В-клеточным лейкозом ХЛЛ. Он не предназначен для использования для подсчета числа хромосом 12
3. у других групп пациентов или с другими тестовыми матрицами, такими как амниоциты, ворсинки хориона, фибробласты, опухолевые клетки, долгосрочные культуры и другие.
4. Результаты анализа методом FISH могут быть неинформативными, если качество образца и/или подготовка предметного стекла с образцом недостаточны; набор ДНК - зондов CEP 12 был оптимизирован для архивных образцов периферической крови, хранящихся только при рекомендуемой температуре - 20°C или -80°C.
5. Набор ДНК-зондов CEP 12 не был валидирован для мониторинга стадии болезни.
6. Вполне возможно, что некоторые пациенты могут иметь целевые последовательности в альтернативном хромосомном местоположении, которые могут гибридизоваться с CEP 12. Это не было исследовано для данного устройства; пользователь должен оценить это в метафазных распространениях каждого испытуемого субъекта.
7. Анализ CEP 12 предназначен только для помощи в подсчете числа центромер хромосомы 12; он не предназначен для обнаружения структурных аномалий хромосомы 12.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Подсчет межфазных сигналов методом FISH проводили на образцах периферической крови, полученных от здоровых субъектов и от испытуемых, положительных на трисомию 12, чтобы оценить ожидаемый процент клеток с 0, 1, 2, 3 и ≥ 4 сигналами для этих 2 состояний и определить пороговые значения для определения наличия или отсутствия трисомии 12.

Значения нормальных образцов периферической крови

Межфазный анализ методом FISH проводили на образцах периферической крови 30 нормальных испытуемых на 1 опытном участке исследования. В каждом образце был подсчитан процент клеток с 1, 2, 3 и ≥ 4 сигналами. Распределение сигналов для этой исследуемой группы кратко представлено в **таблице 4.**

Таблица 4. Распределение процентного содержания клеток с сигналами CEP 12 в 30 образцах с нормальной периферической кровью

	Процент клеток с				
	0 сигналов [a]	**1 сигналом**	**2 сигналами**	**3 сигналами**	**≥ 4 сигналами**
Среднее значение	—	2,24	97,39	0,36	0,01
CO	—	1,29	1,29	0,26	0,03

[a] Данные не собраны

Кроме того, основное исследование было проведено на образцах периферической крови 57 (17 культивированных и 40 некультивированных) нормальных субъектов, чтобы подтвердить ожидаемые значения и определить предельные значения анализа. Сбор и анализ проб проводили на 2-х исследовательских участках. В каждом образце был подсчитан процент клеток с 0, 1, 2, 3 и ≥ 4 сигналами. Распределение сигналов по этим 57 субъектам представлено в **таблице 5.**

Таблица 5. Распределение процентного содержания клеток с сигналами CEP 12 в 57 образцах с нормальной периферической кровью

	Процент клеток с				
	0 сигналов [a]	**1 сигналом**	**2 сигналами**	**3 сигналами**	**≥ 4 сигналами**
Среднее значение	0,34	3,36	96,06	0,20	0,04
CO	0,95	5,45	6,00	0,29	0,14

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В цитогенетически нормальных образцах периферической крови процент двухсигнальных и трехсигнальных клеток составляет 2 критические категории для оценки ожидаемых значений. Средний процент двухсигнальных и трехсигнальных ядер в исходном исследовании составил 97,39% (CO = 1,29%) и 0,36% (CO = 0,26%) соответственно. Аналогичным образом, в подтверждающем исследовании средние процентные доли двухсигнальных и трехсигнальных ядер для 57 нормальных образцов составили 96,06% (CO = 6,00%) и 0,20% (CO = 0,29%) соответственно. Таким образом, при соблюдении указаний рекомендуемого руководства по подсчету и их практике процент двухсигнальных клеток в нормальном образце периферической крови должен составлять от 84,3% до 100% (95% ДИ), а процент трехсигнальных клеток - от 0% до 0,87% (95% ДИ).

Значения образцов периферической крови, с положительным тестом на трисомию 12

Было проведено исследование для оценки распределения межфазных сигналов методом FISH в 39 (35 культивированных и 4 некультивированных) образцах периферической крови, предварительно определенных как образцы с положительным результатом на трисомию 12 с помощью стандартного цитогенетического анализа. Распределение сигналов по этим 39 субъектам представлено в **таблице 6.**

Таблица 6. Распределение процентного содержания клеток с сигналами CEP 12 в 39 образцах периферической крови с трисомией 12

	Процент клеток с				
	0 сигналов[a]	**1 сигналом**	**2 сигналами**	**3 сигналами**	**≥ 4 сигналами**
Среднее значение	0,40	3,69	48,98	46,62	0,37
CO	1,21	5,80	14,27	17,99	0,60

В цитогенетически аномальных образцах периферической крови критической категорией является процент клеток с 3 сигналами (% трехсигнальных ядер). На основании анализа методом FISH из 39 образцов среднее значение (± CO) % трехсигнальных ядер составило 46,62 (± 17,99), а медиана - 48,5%.

Процент трехсигнальных ядер колебался от 7,2 до 79,2%.

Определение предельных значений

Другая критическая категория в нормальных образцах периферической крови - процент трехсигнальных ядер. Процент трисигнализированных ядер в нормальных образцах использовался для определения предельных значений для трисомии 12. Процент трехсигнальных клеток был рассчитан для каждого из 57 участников основного исследования, а распределение данных оценивалось на предмет нормального распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка W.[11] Нормальное допущение не было удовлетворено, и данные были логарифмически преобразованы, а также был вычислен средний процент трехсигнальных ячеек и стандартное отклонение. 95% доверительные пределы определялись с использованием нормального приближения, а в качестве предельных значений использовалось антилогическое значение верхнего предела. Подробная информация о расчете приведена ниже в **таблице 7.**

Таблица 7. Определение предельного значения для классификации трисомии 12

	Процент трехсигнальных ядер	
Статистика	**Логарифмически преобразованные значения**	**Анти-логарифмическое арифметическое значение**
Среднее значение	- 2,5998	—
Стандартное отклонение	1,5452	—
Среднее значение верхнего 95% доверительного интервала + 1,96 CO	0,43	1,54

Значение точки предельного значения - 1,54%, рассчитанное в **таблице 7**, было округлено до 2,0%. Нормальные (отрицательные) значения определяются как ≤ 2,0% трехсигнальных клеток, в то время как > 2,0% трехсигнальных клеток определяются как положительные значения при наличии трисомии 12.

Перед использованием набора CEP 12 лаборатория должна проверить его предельные значения, проанализировав и подсчитав число частиц не менее 10 образцов периферической крови в соответствии с инструкциями, приведенными в разделе «Подсчет числа» вкладыша упаковки. Процент трехсигнальных ядер в этих нормальных образцах должен быть ниже точки предельного значения 2,0%. Если эта точка отсечения не подходит для учреждения пользователя, он может переопределить эту точку предельного значения, следуя описанной выше статистической процедуре. Необходимо учитывать, что размер 10 проб не будет достаточным для определения нового предельного значения.

ОСОБЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность и специфичность

Эффективность гибридизации

В ключевом исследовании средний процент клеток без сигнала гибридизации составил 0,43% (CO = 1,48%) на 402 образца периферической крови. Таким образом, < 2% клеток без сигнала является реалистичным стандартом принятия.

Аналитическая чувствительность

Аналитическую чувствительность зондов из набора CEP 12 проверяли в исследовании воспроизводимости, описанном ниже. В этом исследовании 0% образцов было оценено со средним значением 1,72% (CO = 1,09%) трехсигнальных ядер, а 5% образцов - с 4,87% (CO = 0,99%). Наблюдалось небольшое перекрытие между 0% и 5% образцами; верхний предел 95% доверительного предела для 0% образцов составлял 3,86% , а нижний предел 95% доверительного предела для 5% образцов составлял 2,93%. Таким образом, предел обнаружения для CEP 12 оценивается в 4,0%.

Аналитическая специфичность

Исследования специфичности локуса проводили с использованием метафазных пластинок в соответствии со стандартными протоколами ОКК компании Abbott Molecular. В общей сложности 56 метафазных распределений были исследованы последовательно с помощью G-бэндинга для идентификации хромосомы 12 с последующим проведением испытания методом FISH. Никакой перекрестной гибридизации с другими локусами хромосом не наблюдалось ни в одной из 56 исследованных клеток. Гибридизация была ограничена областями центромеры хромосомы 12.

Воспроизводимость

Для оценки воспроизводимости анализа CEP 12, анализы CEP 12 на определение процента трехсигнальных клеток были оценены на воспроизводимость на разных участках, в разных партиях, в разные дни, и разными наблюдателями. Четыре смеси гематологически полученных человеческих клеток с известным процентом трисомии 12 (приблизительно 0%, 5%, 10% и 13%) были оценены на процент трехсигнальных клеток в соответствии с инструкциями по подсчету сигналов во вкладыше упаковки.

В результате исследования в разных лабораториях среднее значение наблюдаемого процента трехсигнальных ядер для каждого образца, CO, представляющее вариабельность исследований в разных лабораториях, и процент КВ, представляющий точность, приведены в **таблице 8.** В результате проведения серии анализов среднее значение, CO и процент КВ наблюдаемого процента трехсигнальных ядер по месту исследования, партии зондов, дню анализа и наблюдателю показаны в **таблицах 9-12**. Наблюдались статистически значимые различия между наблюдателями и участками, отражающие субъективность визуального подсчета.

Таблица 8. Точность наблюдаемых % трехсигнальных ядер

Уровень трисомии 12	**n**	**Среднее значение**	**Стандартное отклонение**	**Коэффициент вариации**
0%	22	1,72%	1,09%	63,1%
5%	23	4,87%	0,99%	20,4%
10%	23	9,19%	1,78%	19,4%
13%	24	12,07%	1,61%	13,3%

Таблица 9. Сводные статистические данные о % трехсигнальных ядер по исследовательским центрам

Уровень трисомии 12	**Статистика**	**Центр № 1**	**Центр № 2**	**Центр № 3**
0%	Среднее значение	1,15	0,88	1,68
	CO	0,70	0,40	1,30
	КВ (%)	60,78	45,46	77,44
	n	8	8	8
5%	Среднее значение	4,10	3,89	4,77
	CO	1,15	1,31	0,74
	КВ (%)	28,08	33,64	15,42
	n	8	8	8
10%	Среднее значение	8,95	8,56	8,74
	CO	1,91	1,42	1,35
	КВ (%)	21,36	16,62	15,49
	n	8	8	8
13%	Среднее значение	12,36	11,29	12,88
	CO	2,93	2,56	1,92
	КВ (%)	23,67	22,71	14,94
	n	8	8	8

CO (стандартное отклонение); КВ (%) (коэффициент вариации)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 10. Сводные статистические данные о % трехсигнальных ядер по партиям зондов

Уровень трисомии 12	Статистика	Партия № 1	Партия № 2	Партия № 3	Партия № 4
0%	Среднее значение	0,99	1,13	1,56	1,26
	CO	0,34	0,67	1,51	0,87
	КВ (%)	34,38	58,88	96,72	68,87
	n	6	6	6	6
5%	Среднее значение	4,30	4,99	4,46	3,28
	CO	0,42	0,85	1,15	1,28
	КВ (%)	9,79	17,11	25,80	39,02
	n	6	6	6	6
10%	Среднее значение	9,37	8,47	8,07	9,08
	CO	1,01	2,04	1,48	1,42
	КВ (%)	10,78	24,08	18,36	15,62
	n	6	6	6	6
13%	Среднее значение	11,04	12,86	12,57	12,23
	CO	2,70	3,48	2,04	1,60
	КВ (%)	24,47	27,08	16,22	13,05
	n	6	6	6	6

CO (стандартное отклонение); КВ (%) (коэффициент вариации)

Таблица 11. Сводные статистические данные о % трехсигнальных ядер по дням анализа

Уровень трисомии 12	Статистика	День анализа № 1	День анализа № 2	День анализа № 3	День анализа № 4
0%	Среднее значение	1,92	1,22	0,73	1,06
	CO	1,49	0,38	0,33	0,63
	КВ (%)	77,67	31,29	44,65	59,54
	n	6	6	6	6
5%	Среднее значение	4,02	4,49	4,50	4,02
	CO	1,45	1,02	0,81	1,28
	КВ (%)	36,08	22,67	18,05	31,75
	n				
10%	Среднее значение	6	6	6	6
	CO	9,47	8,13	9,02	8,37
	КВ (%)	1,58	1,48	1,47	1,56
	n	16,69	18,21	16,27	18,67
13%	Среднее значение				
	CO	6	6	6	6
	КВ (%)	10,71	11,86	13,56	12,56
	n	1,35	3,02	1,59	3,14

CO (стандартное отклонение); КВ (%) (коэффициент вариации)

Таблица 12. Сводные статистические данные о % трехсигнальных ядер по наблюдателям

Уровень трисомии 12	Статистика	Наблюдатель № 1	Наблюдатель № 2
0%	Среднее значение	1,14	1,33
	CO	0,58	1,17
	КВ (%)	50,42	88,21
	n	12	12
5%	Среднее значение	4,60	3,91
	CO	1,18	0,96
	КВ (%)	25,74	24,61
	n	12	12
10%	Среднее значение	8,76	8,74
	CO	1,51	1,60
	КВ (%)	17,25	18,27
	n	12	12
13%	Среднее значение	12,31	12,04
	CO	2,45	2,63
	КВ (%)	19,88	21,82
	n	12	12

CO (стандартное отклонение); КВ (%) (коэффициент вариации)

Сравнение методов; клинические образцы

Было проведено многоцентровое, заслепленное сравнительное исследование для дальнейшего определения эффективности использования набора ДНК-зондов CEP 12 SpectrumOrange по сравнению со стандартным цитогенетическим анализом. Образцы периферической крови были получены в общей сложности от 402 пациентов с В-клеточным хроническим лимфолейкозом (В-ХЛЛ) для стандартного цитогенетического анализа и анализа методом FISH. Образцы были оценены в 3 местах; 97 образцов были проанализированы на участке 1, 205 - на участке 2 и 100 - на участке 3. Все участки использовали культивированные образцы для стандартных цитогенетических анализов и анализов методом FISH, за исключением участка 1; там использовались прямые препараты только для анализа методом FISH, но один и тот же образец пациента использовался для обоих методов. Каждый участок следовал своему собственному внутреннему протоколу для стандартного цитогенетического анализа; анализы методом FISH проводились в соответствии с инструкциями во вкладыше упаковки набора ДНК-зондов CEP 12 SpectrumOrange*. На участках 3, 11 при первоначальной оценке было выявлено > 2% клеток без сигнала из 100 образцов. На этих образцах был повторен подсчет; результаты повторного подсчета были приемлемы и использовались в анализе.

**На участке 2 использовали небольшое изменение рекомендуемого времени и температуры для стадии гибридизации методом FISH.*

В общей сложности 177 образцов имели достаточное количество метафазных клеток (≥ 20 или по крайней мере 2 метафазы с трисомией 12) для стандартного цитогенетического анализа. Кроме того, 157 образцов на участке 1 имели недостаточное количество метафаз для полного цитогенетического анализа, но были оценены методом FISH (см. **таблицу 14).**

41 образец из этих образцов с достаточным количеством метафаз для анализа были классифицированы с помощью стандартного цитогенетического анализа как образцы с положительным результатом на трисомию 12; 132 - как отрицательные; и 4 - как неоднозначные (1 трисомия 12 клеток на 30 метафаз). При межфазном анализе методом FISH 53 образца были классифицированы как образцы с положительным результатом на трисомию 12; 119 были отрицательными; и 5 были неинформативными (с оценкой менее 500 межфазных ядер).

При сравнении результатов между межфазным анализом методом FISH и стандартным цитогенетическим анализом с использованием только образцов с достаточным количеством метафаз для анализа набор ДНК-зондов CEP 12 показал относительную чувствительность 100% (95% ДИ: 91,2 - 100%) и относительную специфичность 91,47% (95% ДИ: 86,66 - 96,22%). Межфазный анализ методом FISH определил 54 положительных образца; на 13 больше, чем было определено при стандартном цитогенетическом анализе. Результаты представлены в **таблице 13**.

Таблица 13. Классификация трисомии 12 набором зондов CEP 12 в сравнении с исследованием методом стандартного цитогенетического анализа; образцы только с достаточным количеством метафаз

	Стандартный цитогенетический анализ			
Межфазный анализ CEP 12[a]	Положительный	Отрицательный	Неопределенный	Всего
Положительный	39 (100%)	11	4	54 (31,40 %)
Отрицательный	0	118 (91,47%)	0	118
Неинформативный[b]	2	3	0	5
ВСЕГО	41	132	4	177

[a] Предельное значение составляет 2,0%

[b] В анализ относительной чувствительности и относительной специфичности не были включены результаты исследований образцов с недостаточным количеством межфазных клеток для анализа методом FISH.

На одном исследовательском участке (в Соединенном Королевстве) было оценено значительное количество образцов (157) с количеством метафаз, меньше минимального количества (20), требуемого международной системой стандартов цитогенетической номенклатуры человека (ISCN) для стандартного цитогенетического анализа. На этом участке было исследовано не менее 10 метафазных клеток, и образцы были обозначены как отрицательные или неоднозначные, если 0 или 1 клетка, соответственно, показали трисомию 12. Если > 2 клеток показали положительную реакцию на трисомию 12, образец считался положительным, и эти результаты были включены в таблицу 13. Анализ FISH определил 25 из этих 157 образцов как положительные на предмет трисомии 12; они были отмечены как отрицательные или неоднозначные на этом участке при стандартном цитогенетическом анализе.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 14. Классификация трисомии 12 набором зондов CEP 12 в сравнении с исследованием методом стандартного цитогенетического анализа; образцы только с недостаточным количеством метафаз

Межфазный анализ CEP 12[a]	Стандартный цитогенетический анализ			
	Положительный	Отрицательный	Неопределенный	Всего
Положительный	—	19	6	25 (16%)
Отрицательный	0	130 (87%)	2	132
ВСЕГО	—	149	8	157

[a] Предельное значение составляет 2,0%

Хотя истинный статус образцов, обозначенных методом FISH как положительные на предмет трисомии 12 и отрицательные или неоднозначные при стандартном цитогенетическом анализе, не был установлен, эти расхождения могут частично быть отражением разницы в сообщенной аналитической чувствительности между двумя методами.

Распределение трехсигнальных ядер по участкам

Распределение процента трехсигнальных ядер между 3 участками для 94 положительных случаев, определенных методом межфазного анализа FISH, показало статистически значимые вариации между участками исследования. Среднее значение (± CO) % трехсигнальных ядер составляло 42.6% (± 24.0%), 44.9% (± 17.7%), и 28,6% (± 14,3%) для участков 1, 2 и 3 соответственно.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Shanafelt TD, Byrd JC, Call TG, et al. Narrative review: initial management of newly diagnosed, early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Ann Intern Med*. 2006;145:435-7.
2. Mehes G. Chromosome abnormalities with prognostic impact in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Pathol Oncol Res*. 2005;11(4):205-10.
3. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, et al. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia*. 2002;16(6):993-1007.
4. Ripolles L, Ortega M, Ortuno F, et al. Genetic abnormalities and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006;171(1):57-64.
5. Barch MJ, ed. The ACT *Cytogenetics Laboratory Manual*. 2nd ed. New York, NY: Raven Press, Ltd.; 1991:17-105,297-536.
6. Losada AP, Wessman J. Tianinen M., et al. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia: an interphase cytogenetic study. *Blood.* 1991;78(3):775-779.
7. Escudier SM, Pereira-Leahy J, Drach JW, et al. Fluorescent in situ hybridization and cytogenetic studies of Trisomy 12 in chronic lymphocyte leukemia. *Blood*. 1993;81:2702-07.
8. Escudier SM, Engel HE, Pierce S, et al. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1994;84(10).
9. Cuneo A, Wlodarska I, Aly M, et al. Nonradioactive in situ hybridization for the detection and monitoring of Trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Br *J Hematol*. 1992;81:192-196.
10. Anastasi J, LeBeau MM, Vardiman JW, et al. Detection of Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization to interphase cells: a simple and sensitive method. *Blood*. 1992;79(7):1796-1801.
11. US Centers for Disease Control. *Morbidity and Mortality Weekly Review*. 1987;36(suppl. 2S):2S-18S.
12. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods*. Sixth Edition, Ames, IA: The Iowa State University Press; 1972.
13. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009. [Also available online *Type* > www.cdc.gov, search > BMBL5 > look up sections III and IV].
14. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition.* CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
16. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОМОЩЬ

Для получения технической помощи позвоните в технический отдел компании Abbott Molecular по телефону 1-800-553-7042 (в пределах США) или +49-6122-580 (за пределами США), а также посетите веб-сайт компании Abbott Molecular по адресу: http://www.abbottmolecular.com.

CEP, Vysis, SpectrumOrange и ProbeChek являются товарными знаками группы компаний Abbott в различных юрисдикциях. Все другие товарные знаки являются собственностью соответствующих владельцев.

* Прямомеченые флуоресцентные зонды Vysis LSI, CEP и WCP подпадают под действие патента США 5,491,224.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines. Иллинойс 60018,
США

EC REP ABBOTL QMBH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Висбаден
Германия

CE

© 2006, 2016 Abbott Laboratories

www.abbottmolecular.com

Май 2016 г.
30-608311/R3

/Логотип: Abbott/

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

PROBECHEK КОНТРОЛЬНЫЕ СЛАЙДЫ ДЛЯ МЕТОДА FISH, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОБ CEP X SPECTRUMORANGE/SEP Y SPECTRUMGREEN

en
REF 07J21-011
07J21-012
30-608328/R1

ProbeChek Control Slides for FISH using CEP X SpectrumOrange/ CEP Y SpectrumGreen DNA Probe Kit
REF 07J21-011; 07J21-012
30-608328/R1

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Температурный режим
	Количество достаточно для <n> тестов
	Биологический риск
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ: 1-800-553-7042
МЕЖДУНАРОДНАЯ СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ: ПОЗВОНИТЕ В СЛУЖБУ ПОДДЕРЖКИ ABBOTT

Вкладыш внутри упаковки необходимо прочесть внимательно перед использованием. Следуйте рекомендациям вкладыша внутри упаковки. Достоверность результатов анализа не может быть гарантирована, если есть какие-либо отклонения от инструкции, содержащейся внутри упаковки.

PROBECHEK КОНТРОЛЬНЫЕ СЛАЙДЫ ДЛЯ МЕТОДА FISH, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ С CEP X SPECTRUMORANGE/CEP Y SPECTRUMGREEN ПРОБАМИ.

(Номер партии 30-805011, Кат. номер 07J21-011;
Номер партии 30-805012, Кат. номер 07J21-012)

НАЗВАНИЕ
ProbeChek Низкий уровень Женский 5% XX/95%/XY
ProbeChek Низкий уровень Мужской 95% XX/5% XY

ОБЩЕЕ ИЛИ ОБЩЕПРИНЯТОЕ НАЗВАНИЕ
Реагенты для флуоресцентной in situ гибридизации (FISH).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

НАЗНАЧЕНИЕ

Контрольные слайды ProbeChek это фиксированные образцы клеток, нанесенные на слайды микроскопа, предназначенные для использования в качестве контролей для интерфазного FISH метода, как учебные материалы для подсчета FISH-сигналов, для обучения и для лабораторного контроля качества. Контрольные слайды ProbeChek могут быть использованы в качестве контроля для соответствующих условий гибридизации или как контроли для правильного приготовления реагентов. Этот продукт также полезен в качестве учебного пособия, при котором лаборатория сравнивает результаты подсчетов сигналов ДНК-зонда CEP, полученные от контрольных ProbeChek к ожидаемому количеству сигналов, определенному в спецификации к ProbeChek, описанному в этом документе.

РЕАГЕНТЫ И ИНСТРУМЕНТЫ

Поставляемые материалы

Упаковка контрольных слайдов ProbeChek состоит из:
ProbeChek Низкий уровень Женский 5% XX/95%/XY
Номер партии 30-805011, Кат. номер 07J21-011
Количество: 5 слайдов (две целевые области на слайд)
Состав: Лимфобластные клетки, фиксированные на слайдах для микроскопа

ProbeChek Низкий уровень Мужской 95% XX/5% XY
Номер партии 30-805012, Кат. номер 07J21-012

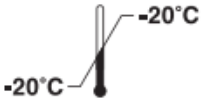
Количество: 5 слайдов (две целевые области на слайд)
Состав: Лимфобластные клетки, фиксированные на слайдах для микроскопа

ВНИМАНИЕ: Для CEP X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen DNA проба (Номер 32-161050, кат. номер 07J22-050) не требуется дополнительных материалов.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

CEP X SpectrumOrange/Y SpecrtumGreen DNA Probe (Номер партии 32-161050, Кат. Номер 07J22-050) не требуются дополнительные материалы.

ХРАНЕНИЕ



Храните ProbeChek контрольные слайды при -20°C в закрытом контейнере с осушителем для защиты от влажности.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ



Медицинское устройство для диагностики In Vitro

Предназначен только для диагностики *in vitro.*



Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.
Дезактивации и утилизации всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами[4].

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Обратитесь к инструкции внутри упаковки CEP X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen DNA проба для более подробного ознакомления с процедурой анализа.

ОГРАНИЧЕНИЯ

ProbeChek Низкий уровень Женский 5% XX/95%/XY и ProbeChek Низкий уровень Мужской 95% XX/5% XY не валидированы в качестве системы контроля в указанном диапазоне и выполнимы пользователем, если выполняются рекомендации по подсчету сигналов. Если результаты выходят за рамки ожидаемого диапазона, обратитесь к разделу Контроль Качества, представленном внутри упаковки для набора CEP X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen DNA. Обратитесь к таблице Распределение сигналов для ProbeChek контрольных слайдов и сертификатов анализа для фактических расчетов по отдельным лотам.

Таблица. Распределение сигналов для ProbeChek XX/XY Контрольных слайдов

Низкий уровень женский (Номер партии 30-805011, кат. номер 07J21-011)						
	% 0 сигналы	**% XO сигналы**	**% YO сигналы**	**% XY сигналы**	**% XX сигналы**	**% других сигналов**
CEP XY	0.0-1.0	0.0-2.0	0.0-2.0	79.0-96.0	4.0-8.0	0.0-8.0
Низкий уровень Мужской (Номер партии 30-805012, кат. номер 07J21-012)						
	% 0 сигналы	**% XO сигналы**	**% YO сигналы**	**% XY сигналы**	**% XX сигналы**	**% других сигналов**
CEP XY	0.0-1.0	0.0-2.0	0.0-2.0	4.0-8.0	79.0-96.0	0.0-8.0

Распределение сигналов основано на гибридизации с использованием пробы CEP X SO/Y SG (Номер партии 32-161050, кат. номер 07J22-050). Обратитесь к сертификату анализа для фактических подсчетов по отдельным номерам лотов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

1. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
2. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030. Occupational Safety and Health Standards: *Bloodborne Pathogens*.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition.* CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA;2011.
4. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая помощь

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в техническую службу компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) по телефону +496122-580 или заходите на http:\\www.abbottmolecular.com.

CEP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, и ProbeCheck являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт Молекуляр Инк. в различных юрисдикциях.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP
Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2000, 2012 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ProbeChek Prenatal Control Slides for FISH

en

REF 05J36-005
05J39-005

30-608323/R3

ProbeChek Prenatal Control Slides for FISH
REF 05J36-005; 05J39-005
30-608323/R3

Используемые символы

	Изготовитель
	Каталожный номер
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Достаточное для проведения <n> тестов
	Температурный режим
	Биологический риск
	Отрицательный контроль
	Положительный контроль
	Обратитесь к инструкции
	Использовать до (срок годности)
	Авторизованный представитель в Европейском сообществе

PROBECHEK Контрольные слайды для Пренатальной диагностики (ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ IN SITU ГИБРИДИЗАЦИЯ)

Номер партии 30-805017, кат. номер 05J36-005;
Номер партии 30-805017, кат. номер 05J39-005

НЕЗАПАТЕНТОВАННОЕ НАЗВАНИЕ
PROBECHEK СЛАЙДЫ ДЛЯ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ

ОБЩЕЕ ИЛИ ОБЫЧНОЕ НАЗВАНИЕ
Реагенты для проведения флуоресцентной in situ гибридизации
НАЗНАЧЕНИЕ

PROBECHEK контрольные слайды для Пренатальной диагностики представляют собой фиксированные образцы клеток, нанесенные на предметные стекла к микроскопу, которые предназначены для использования в качестве контроля при проведении интерфазного FISH-анализа, как учебно-методический материал для подсчета сигналов FISH, для обучения пользователей и для лабораторного контроля качества. PROBECHEK контрольные слайды могут использоваться в качестве контроля при проведении FISH-анализа для соответствующих условий гибридизации и в качестве контроля при подготовке реагентов. Данные слайды предназначены также в качестве учебно-методического материала, с помощью которого лаборатория сравнивает количество сигналов от центромерных (CEP) и теломерных (Tel) проб, полученных от контрольных

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

PROBECHEK слайдов к ожидаемому количеству сигналов, определенному в спецификации к PROBECHEK и описанному в этом документе.

ОБОБЩЕНИЯ И ДОПОЛНЕНИЯ

PROBECHEK слайды для пренатальной диагностики получают из культивируемых линий клеток мужских амниоцитов (30-805010) или линии триплоидных клеток 69, XXY (30-805017), которые выделяют, фиксируют в суспензионной среде и наносят на предметные стекла к микроскопу. Процедура, используемая для забора и подготовки предметных стекол, оптимизирована для интерфазной FISH. Контроль качества выполняется путем подсчета флуоресцентных сигналов, описанных во вложении (См. раздел Контроль качества) с использованием флуоресцентного микроскопа, снабженного однополосными фильтрами, предназначенными для возбуждения и эмиссии интересующего флуорофора. Кроме того, микроскоп должен быть снабжен ртутной лампой, мощностью 100 Вт и объективами Plan Apo с увеличением 40X. Пользователь должен выполнить подсчет теломерных и центромерных сигналов при одинаковых условиях для сравнения правильности подсчета сигналов. Рекомендации и примеры для подсчета CEP и LSI сигналов могут использоваться как обучающий инструмент при подсчете и стандартизации сигналов и предоставляется для пользователя во вкладыше внутри упаковки. Для точного обнаружения сигналов в образцах путем подсчета CEP и LSI сигналов, методы подсчета сигналов должны быть опубликованы в самой лаборатории. Обучение предполагает принятие стандартизированной системы подсчета, чтобы минимизировать вариативность интерпретации сигналов. Изменчивость в гибридизованных LSI и CEP размерах сигналов, форме и интенсивности неизбежна из-за вариации в структуре ДНК, пространственного расположения ДНК в ядре и эффективности гибридизации. Другие различия в результатах могут возникать из-за изменчивости морфологии ядра, различий в пробоподготовке образцов, остроте зрения самого пользователя и интерпретации результатов пользователем. Из-за таких различий должны быть установлены стандартные методы подсчета для каждой лаборатории, чтобы свести к максимуму точность и достоверность подсчета сигналов. Точность и достоверность подсчета CEP и LSI сигналов особенно важны при оценке образцов с низким процентом абнормальных клеток (с ненормальным числом копий клеток, которые можно обнаружить, используя специфические ДНК-зонды) так и неверная интерпретация может привести к ложноположительным или ложноотрицательным результатам.

PROBECHEK Контрольные слайды для Пренатальной диагностики валидированы Abbott Molecular с использованием критерий подсчета, описанных в разделе **Интерпретация результатов**. Ожидается, что подсчет сигналов, соответствующих этим критериям, будут достигнуты пользователем, если соблюдаются рекомендуемые правила для подсчета сигналов и, и если происходит эффективная гибридизация.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СИГНАЛОВ ДЛЯ CEP 18, CEP X, CEP Y и LSI 13, LSI 21, ОБНАРУЖЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ PROBECHEK КОНТРОЛЬНЫХ СЛАЙДОВ

Таблица 1. Нормальные контрольные слайды мужских амниоцитов (номер партии 30-805010, кат. номер 05J39-005)

	% 0 сигналов	% 1 сигнал	% 2 сигнала	% 3 сигнала	% 4 сигнала	% >4 сигналов
CEP-18	0.0-2.0	0.0-5.0	88.0-100	0.0-2.1	0.0-10.0	0.0-1.0
CEP-X	0.0-2.0	90.0-100	0.0-10.0	0.0-2.1	0.0-1.0	0.0-1.0
CEP-Y	0.0-2.0	90.0-100	0.0-10.0	0.0-2.1	0.0-1.0	0.0-1.0
LSI-13	0.0-2.0	0.0-2.1	90.0-100	0.0-4.0	0.0-10.0	0.0-1.0
LSI-21	0.0-2.0	0.0-2.1	90.0-100	0.0-4.0	0.0-10.0	0.0-1.0

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1. Пренатальные положительные контрольные слайды (номер партии 30-805017, кат. номер 05J36-005)						
	% 0 сигналов	**% 1 сигнал**	**% 2 сигнала**	**% 3 сигнала**	**% 4 сигнала**	**% >4 сигналов**
CEP-18	0.0-1.0	0.0-2.0	0.0-10.0	86.0-100	0.0-2.0	0.0-1.0
CEP-X	0.0-1.0	0.0-1.0	80.0-100	0.0-14.0	0.0-5.0	0.0-1.0
CEP-Y	0.0-2.0	96.0-100	0.0-3.0	0.0-1.0	0.0-1.0	0.0-1.0
LSI-13	0.0-1.0	0.0-1.0	0.0-2.0	95.0-100	0.0-2.0	0.0-1.0
LSI-21	0.0-1.0	0.0-1.0	0.0-5.0	94.0-100	0.0-1.0	0.0-1.0

Распределение сигналов основано на гибридизации с использованием набора многоцветных ДНК-зондов AneuVysion DNA Probe (номер партии 32-161075, кат. номер 05J38-030; номер партии 33-161075, кат. номер 05J38-010; номер партии 35-161075, кат. номер 05J38-050). Распределение сигналов для других FISH-зондов может быть валидировано в лаборатории заказчика с использованием соответствующих статистических методов.

ПРИНЦИПЫ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

При рутинном использовании FISH зондов на клетках амниоцитов, контрольные слайды следует использовать при получении каждой новой партии набора зондов и при выполнении каждодневного FISH-исследования. Результаты с контрольных слайдов должны соответствовать спецификациям в таблицах данных, прилагаемых к контрольным слайдам, если используются зонды, валидированные Abbott Molecular или если контроли используются с другими пробами, результаты должны быть в пределах спецификации, определенной лабораторией. Также рекомендуется, чтобы лаборатория использовала нормальные образцы, приготовленные в их собственной лаборатории, чтобы проверить правильность методов подготовки слайдов и эффективность гибридизации. Эти типы контроля обеспечивают лаборатории валидацию успешности гибридизации CEP и LSI, подтверждают ожидаемую специфичность и чувствительность для обнаружения абнормальных клеток.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

Один PROBECHEK контрольный слайд предназначен для двух областей мишеней размером 22×22 мм. CEP и LSI гибридизацию следует проводить на контрольных и тестируемых слайдах одновременно, с использованием CEP и LSI проб и реагентов и в соответствии с рекомендованными процедурами. Каждый пользователь внутри лаборатории должен оценивать качество гибридизации для каждой мишени и, если качество приемлемо, произвести подсчет сигналов на 200-500 ядер на пробу для каждой мишени (рекомендуется 3 мишени на исследуемый образец) слепым методом. Пользователь записывает число ядер в целевой области, которые содержат 0,1,2,3 или больше чем 3 CEP или LSI сигналов. Комбинированные результаты подсчета от каждого пользователя для каждого типа контроля рассчитывается с использованием соответствующих статистических методов для определения среднего значения, диапазона и стандартного отклонения числа клеток, содержащих 0,1,2,3,4 и более 4 сигналов. Среднее количество сигналов и нормальное отклонение (стандартное отклонение) далее можно рассчитать, чтобы определить нормальное распределение сигнала для конкретного зонда и типа образца. Значительные различия между контролями, между мишенями или между пользователями указывают на необходимость повышения квалификации и методов стандартизации внутри лаборатории.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD **Медицинское изделие для диагностики In Vitro**

1. Для диагностики In Vitro
2. PROBECHEK контрольные слайды и все другие свежие или фиксированные образцы с ними следует обращаться как с переносчиками инфекционных агентов. Утилизируйте с соблюдением

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

надлежащих мер предосторожности. Паспорта Безопасности на все материалы, входящие в состав PROBECHEK контрольных слайдов доступны от Abbott Molecular.

3. Избегайте контакта PROBECHEK слайдов с кожей и слизистыми.
4. PROBECHEK контрольные слайды до использования должны храниться при температуре от -20°C (±5°C). Не подвергать воздействию температур выше 25°C в течении длительного периода времени.



Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Эти реагенты или образцы от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, не надевайте контактные линзы там, где работаете с этими материалами.

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорит натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.

• Обеззараживать и утилизировать все потенциально инфекционные материалы в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.

УСТРАНЕНИЕ НЕПОЛАДОК

Подготовка образцов может влиять на результаты гибридизации и на результаты интенсивности сигналов. Пробы CEP и LSI лучше всего работают с образцами, забранными и подготовленными с использованием процедур, удаляющих контаминированный материал (такие как цитоплазма, клеточный дебрис, и красные клетки крови) на ранней стадии подготовки образца и подготовки слайда. Были предприняты шаги во время производства PROBECHEK контрольных слайдов для минимизации контаминации и оптимизации подготовки слайдов для FISH-диагностики. Пользователю рекомендуется следить за подготовкой и оценкой слайдов согласно методике, прилагаемой во вкладыше внутри упаковки при подготовке слайдов в лаборатории. Методы подготовки слайдов следует оптимизировать в лаборатории до подготовки слайдов с использованием исследуемого образца. Если при подсчет сигналов PROBECHEK контрольного слайда возникают значения, которые не соответствуют спецификации для проб, указанным в этом вкладыше или не соответствуют внутрилабораторным спецификациям, возможные причины резко отклоняющихся значений включают следующее:

I Подсчет был неточным

II Анализ не был проведен должным образом

III Анализируемый образец может иметь истинное отклонение от нормы.

IV Компоненты наборов зондов CEP и LSI могут быть выверены ненадлежащим образом.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

5 PROBECHEK контрольных слайдов входят в комплект каждой единицы и позволяют гибридизовать 10 отдельных целевых областей (2 целевые области на слайд). Пакет PROBECHEK контроля состоит из следующего:

- Контрольный мужской амниоцит PROBECHEK: 5 слайдов.
- Состав: культивированные клеточные линии амниоцитов, фиксированные на предметных стеклах для микроскопа.

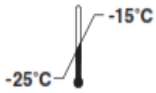
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Хранение: -20 °C (±5°C) в запечатанном контейнере для хранения для защиты от окружающей среды.
- PROBECHEK пренатальные контрольные слайды; количество:5 слайдов.
- Состав: культивирумые клеточные линии, фиксированные на предметных стеклах для микроскопа.
- Хранение: -20 °C (±5°C) в запечатанном контейнере для хранения для защиты от окружающей среды.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Набор многоцветных ДНК-зондов AneuVysion и все вспомогательные реагенты, компоненты и оборудование.

ХРАНЕНИЕ



Хранить PROBECHEK контрольные слайды -20°C (±5°C) в герметичной таре с влагопоглотителем для защиты от влажности.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Гибридизацию проб LSI и CEP следует соблюдать как указано во вкладыше к набору многоцветных ДНК-зондов AneuVysion. Оптимальное использование фильтров к флуоуресцентному микроскопу и процедур, как указано в листке-вкладыше к набору многоцветных ДНК-зондов AneuVysion, настоятельно рекомендуется для оптимальной гибридизации и точной оценки и интерпретации сигналов CEP и LSI, используя PROBECHEK контрольные слайды. Образцы следует оценивать с использованием фазово-контрастной микроскопии, предшествующей гибридизации для определения оптимизации проведения FISH-исследования.

Предлагаемые методические рекомендации для метода FISH приведены ниже:

- Клетки должны быть равномерно распределены на слайде. Области клеток с комками указывают на плохую подготовку образца. Должно быть минимум 8 клеток на поле 400X (общее увеличение). Меньшее количество клеток указывает на то, что концентрация клеток мала для подсчета.
- Ядра и метафазные хромосомы не должны быть яркими. Яркие клетки указывают указывают на то, что условия прободготовки слайдов не были оптимальными. Всегда оптимизируйте условия подготовки слайдов, используя хорошее качество подготовки лимфоцитов перед подготовкой слайдов.
- Не должно быть видимой цитоплазмы, окружающей ядра и метафазы. Цитоплазма может препятствовать гибридизации и приводить к неэффективной гибридизации и неточным результатам.

Каждый гибридизованный слайд следует оценивать по параметрам качества, определенными в лаборатории. Используя соответствующий микроскоп и набор фильтров, специфичность гибридизации, интенсивность сигнала и отношение сигнала к фоновому шуму определяли была ли гибридизация оптимальной в процессе проведения анализа. По крайней мере 85% всех ядер целевой области должны быть легко подсчитываемы. Фон или ядерный флуоресцентный шум должен быть минимальным. Сигналы должны быть хорошо видны при минимальном увеличении в 400 раз. Большинство ядер на слайдах должны быть отделены от окружающих ядер и не должны быть покрыты цитоплазмой. Наличие многочисленных участков слипшихся ядер (больше чем три ядра вместе) может препятствовать адекватному и однородному распределению ядер для более точного подсчета. Если проподготовка не соответствует этим критериям, подсчет сигналов не должен выполняться. Подсчет сигналов оценивается отдельно для каждой пробы, однако целесообразно подсчитывать сигналы проб CEP X и CEP Y одновременно.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Предполагаемый формат документации для подготовки слайдов и контроля качества при проведении гибридизации in situ

Показатель подготовки каждого слайда в соответствии с адекватностью проведение гибридизации in situ				
Слайд ID #	**Плохой**	**Хороший**	**Отличный**	**Подсчет Да или Нет**
----------	----------	----------	----------	----------
----------	----------	----------	----------	----------

Оценка каждой области по качеству при проведении гибридизации in situ **Оценки: хорошо, плохо, отлично**				
Область /Слайд ID #	**Интенсивность сигнала**	**Специфичность**	**Фоновый шум**	**Общее качество[a]**
----------	----------	----------	----------	----------
----------	----------	----------	----------	----------

[a]Области/слайды, получившие низкую общую оценку качества, не используются для подсчета сигналов

Документация подсчета сигналов **Пациент ID**_____

Проба_____ **Лампа часы/ватт**_____ **Исп. набор фильтров**_____

Область /Слайд ID #	**# подсчитываемые ядра**	**# ядра с одним сигналом**	**# ядра с двумя сигналами**	**# ядра с тремя сигналами**	**# ядра > чем с тремя сигналами**
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рекомендации по подсчету LSI и CEP сигналов на интерфазных ядрах приведены ниже. Пользователю рекомендуется применить эти рекомендации и предоставить дополнительные инструкции по мере необходимости для улучшения точности подсчета, достоверности и воспроизводимости в лаборатории. Технология сканирования слайдов для подсчета LSI и CEP сигналов описана ниже. Тот или иной метод, при условии, что он стандартизирован в лаборатории, может повысить точность и воспроизводимость подсчета.

1. Сканируйте целевую область с использованием объективов с низким увеличением, чтобы изучить распределение клеток.
2. Выберите целевую область, где клетки распределены равномерно, но при такой плотности, где несколько ядер можно оценить в 400X поле. Избегайте участков, где клетки расположены плотно, ядра перекрываются или ядерные границы отдельных ядер не определены. Используйте масляный объектив Plan Apo с 40X – 100X увеличением и сфокусируйтесь сначала на верхнем левом квадранте выбранного поля зрения. Сосредоточьтесь на каждом видимом ядре в первом просматриваемом поле и подсчитайте количество сигналов одного цвета в пределах ядерной границы. Сигналы могут быть как яркими так и компактными овальной формы, разделенными на два меньшей формы, но соединенными точками или волокнистой диффузной формы. Оценить слитные или сомнительные сигналы при наблюдении с большим увеличением. Запишите количество сигналов от каждой клетки. Двигаясь слева направо (или сверху вниз), продолжайте сканировать слайд на предмет полей с оцениваемыми ядрами. Когда достигнута граница видимых или интерпретируемых ядер, перейдите к следующему полю и продолжите процесс сканирования. Повторите процесс

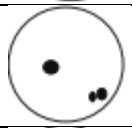
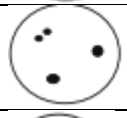
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

сканирования до тех пор, пока не будет найдено соответствующее количество ядер (от 200 до 500 и более в зависимости от распространённости абнормальных клеток). Повторите этот процесс для каждой пробы до тех пор, пока не будут собраны все данные для всех подсчитываемых проб.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОДСЧЕТУ СИГНАЛОВ ДЛЯ ОДНОЦВЕТНЫХ ПРОБ

Подсчет сигналов для одноцветных проб может выполняться с использованием одиночных фильтров или двойных или тройных фильтров, установленных для визуализации флуоресценции (если она присутствует).

1. Не оценивайте соприкасающиеся или перекрывающиеся клетки.
2. Подсчитайте диффузные сигналы, если они отделены от других сигналов.
3. Считайте разделенные сигналы – 2 небольших сигнала в непосредственной близости - как один сигнал.
4. Считайте два сигнала, соединенные цепью флуоресценции как один сигнал.
5. Не считайте клетки с 0 сигналом, даже если они не окружены ядрами, содержащими сигналы.
6. Не оценивайте поврежденные ядра.
7. Не оценивайте ядра с перекрывающимися сигналами разного цвета.
8. Не считайте неспецифические сигналы гибридизации. Эти сигналы можно узнать по их более низкой интенсивности и другой форме.
9. Не оценивайте ядра с сигналами, расположенными на периферии ядер.
10. Подсчитывайте только ядра, в которых можно произвести определенную нумерацию, все остальное пропускайте.
11. Запишите точный результат. Пересчитайте, чтобы подтвердить сомнительные подсчеты.

	 = проба	
1.		Не считайте, пропустите. Это может быть два ядра с одним сигналом в каждом или скрученные ядра.
2.		Не считайте, пропустите. Наблюдатель не может определить в каком ядре содержаться сигналы.
3.		Считать как два сигнала. Один очень компактный и один диффузный.
4.		Считать как три сигнала. Один сигнал более диффузный, чем два других.
5.		Считать как два сигнала. Один сигнал слитный.
6.		Считать как три сигнала. Один сигнал слитный.
7.		Считать как два сигнала. Один сигнал слитный и соединенный флуоресцентной нитью.

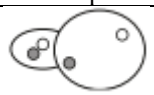
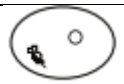
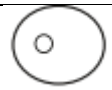
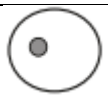
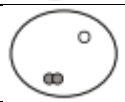
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОДСЧЕТУ СИГНАЛОВ ДЛЯ ДВУХЦВЕТНЫХ ПРОБ

Две и более пробы, меченых разными флуорофорами, которые гибридизуются с одними и теми же клетками, могут подсчитываться отдельно, с использованием наборов одиночных фильтров или с использованием двойных или тройных фильтров, в зависимости от интенсивности сигнала зондов и размера ядра. Клетки с маленькими или суженными ядрами не могут быть легко подсчитаны с

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

использованием двойных или тройных фильтров из-за пространственного расположения сигнала в ядре или благодаря предполагаемому тусклому сигналу пробы.

1. Не оценивайте клетки, которые соприкасаются или перекрываются.
2. Считайте диффузные сигналы, если они отделены от других сигналов.
3. Считайте раздельные сигналы – 2 небольших сигнала в непосредственной близости как один сигнал. Два сигнала представлены в одной хромосоме.
4. Считайте два сигнала, объединенные цепью флуоресценции, как один сигнал.
5. Не считайте клетки с 0 сигналами, если они не окружены ядрами, которые содержат сигнал.
6. Не оценивайте поврежденные ядра.
7. Не оценивайте ядра с перекрывающимися сигналами разного цвета.
8. Не считайте неспецифические сигналы гибридизации. Эти сигналы можно узнать по их более низкой интенсивности и другой форме.
9. Не оценивайте ядра с сигналами, расположенными на периферии ядер.
10. Подсчитывайте только ядра, в которых можно произвести определенную нумерацию, все остальное пропускайте.
11. Запишите точный результат. Пересчитайте, чтобы подтвердить сомнительные подсчеты.

= зеленый сигнал = оранжевый сигнал		
1.		Не подсчитывать. Ядра перекрываются и границы обеих ядер не видны.
2.		Подсчитывать как один оранжевый и один зеленый сигнал. Оранжевый сигнал диффузный.
3.		Считать как один зеленый сигнал. Оранжевый сигнал не виден или отсутствует.
4.		Считать как один оранжевый сигнал. Зеленый сигнал невидимый или отсутствует.
5.		Считать как один оранжевый и один зеленый сигнал. Оранжевый сигнал слитный.
6.		Считать как один оранжевый и два зеленых сигнала. Один зеленый сигнал слитный и два оранжевых сигнала слитных.
7.		Считать как два оранжевых сигнала и один зеленый сигнал.
8.		Считать как три оранжевых сигнала и один зеленый сигнал.
9.		Считать как четыре оранжевых сигнала.

ОГРАНИЧЕНИЯ

PROBECHEK контрольные слайды не валидированы в качестве системы контроля для любой гибридизации ДНК-зондов, кроме ДНК –зондов CEP и LSI от Abbott Molecular, описанные в этом листке-вкладыше. Рекомендации по интерпретации CEP и LSI сигналов включены не все. Интерпретация пользователем и качество гибридизации могут влиять на результаты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Legator M, Shasserre C, Morrison L. Enumeration of interphase nuclei in multi-color fluorescence in situ hybridizations [abstract]. *Am J. Hum Gen.* 1995;57(4, suppl).
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, PA: NCCLS; 1991;7(9). Order code M29-p.
3. Polak J, McGee JO, eds. *In Situ Hybridization Principles and Practices.* Oxford, England: Oxford University Press; 1990.
4. Kibbelaar RE, Kok F, Dreef EJ, et al. Statistical methods in interphase cytogenetics: an experimental approach. *Cytometry*. 1993;14(7):716-24.
5. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition.
6. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Occupational Safety and Health Standards: *Bloodborne Pathogens*.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition. CLSI Document M29-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
8. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization; 2004.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Для получения технической поддержки, позвоните в Службу технической поддержки Abbott Molecular по телефону (1-800-553-7042) (в пределах США) или +49-6122-580 (за пределами США) или посетите сайт Abbott Molecular: http:// www.abbottmolecular.com

CEP, LSI PROBECHEK, Vysis и AneuVysion является торговой маркой группы компании Abbott в различных юрисдикциях.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

CE 0843

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2006, 2010, 2014 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

Январь 2014 г.
30-608323/R3

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

en

REF 07J21-001
07J21-002

30-608324/R1

PROBECHEK КОНТРОЛЬНЫЕ СЛАЙДЫ ДЛЯ МЕТОДА FISH С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОБ CEP 8 и CEP 12

ProbeChek Control Slides for FISH using CEP 8 or CEP 12 DNA Probe Kit
REF 07J21-001; 07J21-002
30-608324/R1

Условные обозначения

	Официальный производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Отрицательный контроль
	Положительный контроль
	Температурный режим
	Биологический риск
	Количество достаточно для <n> тестов
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ: 1-800-553-7042
МЕЖДУНАРОДНАЯ СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ: ПОЗВОНИТЕ В СЛУЖБУ ПОДДЕРЖКИ ABBOTT
Вкладыш внутри упаковки необходимо прочесть внимательно перед использованием. Следуйте рекомендациям вкладыша внутри упаковки. Достоверность результатов анализа не может быть гарантирована, если есть какие-либо отклонения от инструкции, содержащейся внутри упаковки.

ProbeCHEK контрольные слайды для метода FISH с использованием наборов CEP 8 и CEP 12.
Номер партии (30-805000, Кат. номер 07J21-001;
Номер партии 30-805002, Кат. номер 07J21-002)

НАЗВАНИЕ
ProbeCHEK Отрицательный контроль 0% Трисомия 8/12
ProbeCHEK Положительный контроль 10% Трисомия 8/12

ОБЩЕЕ ИЛИ ОБЩЕПРИНЯТОЕ НАЗВАНИЕ
Реагенты для флуоресцентной in situ гибридизации (FISH).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

НАЗНАЧЕНИЕ

Контрольные слайды ProbeChek это фиксированные образцы клеток, нанесенные на предметные стекла микроскопа, предназначенные для использования в качестве средств контроля для интерфазного FISH-метода, как учебные материалы для подсчета FISH-сигналов, для обучения и для лабораторного контроля качества. Контрольные слайды ProbeChek могут быть использованы в качестве контроля для соответствующих условий гибридизации или как контроли для правильного приготовления реагентов. Этот продукт также полезен в качестве учебного пособия, при котором лаборатория сравнивает результаты подсчетов сигналов ДНК-зонда CEP, полученные от контрольных ProbeChek к ожидаемому количеству сигналов, определенному в спецификации к ProbeChek, описанному в этом документе.

РЕАГЕНТЫ И ИНСТРУМЕНТЫ

Поставляемые материалы

Упаковка контрольных слайдов ProbeChek состоит из:
ProbeCHEK Отрицательный контроль 0% Трисомия 8/12
Номер партии 30-805000/Кат. номер 07J21-001

Количество: 5 слайдов (две целевые области на слайд)
Состав: Лимфобластные клетки, фиксированные на слайдах для микроскопа

ProbeCHEK Положительный контроль 0% Трисомия 8/12
Номер партии 30-805002/Кат. номер 07J21-002

Количество: 5 слайдов (две целевые области на слайд)
Состав: Лимфобластные клетки, фиксированные на слайдах для микроскопа

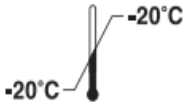
ВНИМАНИЕ: Для CEP 8 SpectrumOrange ДНК-набора и CEP 12 SpectrumOrange ДНК-набора (Номер партии 32-160012, Номер партии 07J22-012) ProbeCHEK контрольные слайды включены с набор.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

CEP 8 SpectrumOrange ДНК-набор (Номер партии 30-160008, Кат. номер 07J20-008) или CEP 12 SpectrumOrange ДНК-набор (Номер партии 30-160012, Номер партии 07J20-012) и все вспомогательные реагенты, компоненты и оборудование.

ВНИМАНИЕ: Для CEP 8 SpectrumOrange ДНК-набора (Номер партии 30-160008, Кат. номер 07J20-008) или CEP 12 SpectrumOrange ДНК-набора (Номер партии 30-160012, Номер партии 07J20-012) никакие дополнительные материалы не требуются.

Инструкция по хранению



Храните ProbeCHEK Контрольные слайды при -20°C в закрытом контейнере с осушителем для защиты от влажности

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD **Медицинское устройство для диагностики In Vitroj**

Предназначен только для диагностики *in vitro.*

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.
Дезактивации и утилизации всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами[4].

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА
Обратитесь к инструкции внутри упаковки CEP 8 SpectrumOrange ДНК-набор или CEP 12 SpectrumOrange ДНК-набор

ОГРАНИЧЕНИЯ
ProbeCHEK Отрицательный контроль 0% Трисомия 8/12 и ProbeCHEK Положительный контроль 0% Трисомия 8/12 не валидированы в качестве системы контроля для любой гибридизации зонда за исключением CEP 8 SpectrumOrange ДНК-набора и CEP 12 SpectrumOrange ДНК-набора Abbott Molecular. Пользовательская интерпретация и качество гибридизации могут повлиять на результаты анализа.

ОЖИДАЕМЫЕ ДАННЫЕ
ProbeCHEK Отрицательный контроль 0% Трисомия 8/12 и ProbeCHEK Положительный контроль 0% Трисомия 8/12 валидированы в специфическом диапазоне и достижимы пользователем, если они следуют рекомендованным инструкциям по подсчету сигналов. Если результаты выходят за пределы ожидаемого диапазона, обратитесь к разделу Контроль качества, представленному внутри упаковки для набора CEP 8 SpectrumOrange или CEP 12 SpectrumOrange ДНК-набора. Обратитесь к **Таблице, распределение сигналов для ProbeCHEK CEP 8 и CEP 12 Контрольных слайдов и Сертификатам анализа для фактического подсчета отдельных партий.**

Таблица. Распределение сигналов для ProbeCHEK CEP 8 и CEP 12 контрольных слайдов						
0% Трисомия 8 и 12 (Номер партии 30-805000, Кат. номер 07J21-001)						
	% 0 сигналы	**% 1 сигналы**	**% 2 сигналы**	**% 3 сигналы**	**% 4 сигналы**	**% >4 сигналов**
CEP 8	0.0-3.0	0.0-3.0	81.9-100.0	0.0-2.1	0.0-8.0	0.0-3.0
CEP 12	0.0-3.0	0.0-3.0	81.9-100.0	0.0-2.1	0.0-8.0	0.0-3.0
10% Трисомия 8 и 12 (Номер партии 30-805002, Кат. номер 07J21-002)						
	% 0 сигналы	**% XO сигналы**	**% YO сигналы**	**% XY сигналы**	**% XX сигналы**	**% других сигналов**
CEP 8	0.0-3.0	0.0-3.0	72.0-93.0	8.0-12.0	0.0-8.0	0.0-3.0
CEP 12	0.0-3.0	0.0-3.0	71.5-92.0	8.0-11.5	0.0-8.0	0.0-3.0

Распределение сигналов основано на гибридизации с использованием ДНК-наборов CEP 8 SpectrumOrange (Номер партии 32-160008, кат. номер 07J22-008) и CEP 12 SpectrumOrange (Номер партии 32-160012, кат. номер 07J22-012). Обратитесь к Сертификату анализа для актуального подсчета индивидуальных номеров партии.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

БИБЛИОГРАФИЯ

1. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
2. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030. Occupational Safety and Health Standards: *Bloodborne Pathogens*.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition.* CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
4. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. Geneva: World Health Organization, 2004.

Техническая помощь

Если Вам требуется техническая помощь, звоните в техническую службу компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) по телефону +496122-580 или заходите на http:\\www.abbottmolecular.com.

CEP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, и ProbeCheck являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт Молекуляр Инк. в различных юрисдикциях.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2000, 2012 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

МАРТ 2013
30-608324/R1

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ProbeChek ALK Negative Control Slides

en

REF 06N38-005

30-608496/R4

ProbeChek ALK
Negative Control Slides
REF 06N38-005
30-608496/R4

REF	Номер списка
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
LOT	Номер партии
	Температурные ограничения
	См. инструкцию по применению
EC REP	Уполномоченный представитель
	Законный производитель
	Биологический риск
	Содержание достаточно для <n> тестов
	Годен до

ОБСЛУЖИВАНИЕ ЗАКАЗЧИКОВ: 1-800-553-7042

МЕЖДУНАРОДНОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ ЗАКАЗЧИКОВ: СВЯЖИТЕСЬ С ВАШИМ ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВОМ АББОТТ

Внимательно почитайте инструкцию внутри упаковки перед использованием. Выполняйте исследования согласно инструкции. Надежность результатов исследования не может быть гарантирована, если Вы отклоняетесь от инструкции внутри упаковки.

НАЗНАЧЕНИЕ

The ProbeCheck ALK отрицательные контрольные слайды используются как контрольные образцы для анализа при соответствующих условиях

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

гибридизации во время рутинного исследования зонда Vysis ALK Break Apart Fish Probe Kit (№ 06N38).

The ProbeCheck ALK отрицательные контрольные слайды должны использоваться вместе с образцами слайдов согласно инструкции внутри упаковки для Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (№ 06N38).

СОСТАВ

- The ProbeCheck ALK отрицательные контрольные слайды (кат. номер 06N38-005) **(5 слайдов).** Фиксированные в формалин, заключенные в формалин культуры клеточных линий применяемые со слайдами микроскопа.

IVD

Предупреждение и меры предосторожности

Медицинское оборудование для диагностики in vitro

- Медицинское оборудование для диагностики in vitro
- Предназначен только для диагностики *in vitro*.
- Не использовать наборы и реагенты после даты, указанной на коробке или этикетке от реагентов.

Внимание: Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:

• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.

• Не пипетируйте ртом.

• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

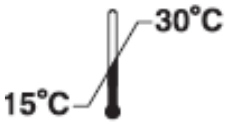
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.

Дезактивации и утилизации всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами.



Смотрите инструкцию по применению

Условия хранения



Хранить при температуре от 15 до 30 °C

Библиография

1. US Departments of Health and Human Service. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009.
2. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. Bloodborne Pathogens.
3. Clinical and Laboratory Standarts Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acqureid Infections: Approved Guideline - Third Edition. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standarts Institute; 2005.
4. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Техническая поддержка

Для технической поддержки, позвоните в службу технической поддержки Abbott Molecular 1-800-553-7042 (в США) или +49-6122-580 (в других странах) или посетите веб сайт Abbott Molecular http://www. Abbottmolecular.com.

Vysis является торговой маркой группы компании Abbott в различных областях.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Все другие торговые марки являются собственностью их непосредственных владельцев.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

Abbott GmbH & Co. KG
Max-Plank-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany

© 2011, 2013 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

Сентябрь 2013
30-608496/R4

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ProbeChek ALK Positive Control Slides

en

REF 06N38-010

30-608487/R5

ProbeChek ALK
Positive Control Slides
REF 06N38-010
30-608487/R5

ТЕСТ IN VITRO
Для диагностики In Vitro

Условные обозначения

GTIN	Глобальный номер товара
REF	Каталожный номер
IVD	Медицинское изделие для диагностики in vitro
LOT	Номер серии
	Температурный диапазон
	См. инструкцию по применению
EC REP	Авторизованный представитель в Европейском сообществе
	Изготовитель
	Биологический риск
	Достаточное для проведения <n> тестов
	Использовать до (срок годности)

СЕРВИСНАЯ ПОДДЕРЖКА: 1-800-553-7042
МЕЖДУНАРОДНАЯ СЕРВИСНАЯ ПОДДЕРЖКА: Позвоните Вашему регионарному представителю Abbott.

Перед использованием внимательно прочитайте данную инструкцию по применению. Необходимо точно следовать данной инструкции по применению. При отклонении от данной инструкции по применению надежность результатов теста не гарантируется.

Набор положительных контрольных слайдов ProbeChek ALK (далее в тексте контрольные слайды ProbeChek ALK Positive Control Slides) предназначены для использования в качестве контроля метода при соответствующих условиях гибридизации в ходе повседневного использования набора зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (кат. №6N38). Контрольные слайды ProbeChek ALK Positive Control Slides необходимо исследовать вместе со слайдами с образцами пользователя в соответствии с инструкцией по применению к набору зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (кат. №6N38).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СОДЕРЖИМОЕ

Контрольные слайды ProbeChek ALK Positive Control Slides (кат. номер №6N38-010) **(5 слайдов)**. Зафиксированные в формалине и залитые парафином (FFPE) культивированные клеточные линии на стеклах микроскопии.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- IVD Медицинское изделие для диагностики In Vitro
- Не используйте упаковки или реагенты по истечению сроков, указанных на этикетках упаковок или реагентов.

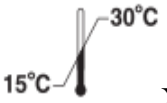
ВНИМАНИЕ: Данный продукт содержит полученные от человека и/или потенциально инфекционные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может полностью гарантировать, что полученные от человека продукты или инактивированные микроорганизмы не переносят инфекцию. С данными реагентами и образцами, полученными от человека, следует обращаться как с инфекционно опасными, следуя соответствующим правилам лабораторной безопасности, подобно приведенным в руководстве "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories"[1] и документе M29-A3 CLSI[3], а также согласно Стандартам по обращению с гемоконтактными патогенами, разработанным Управлением США по охране труда и промышленной гигиене (OSHA)[2] и другим приемлемым правилам биологической безопасности[4]
Поэтому все полученные от человека материалы следует считать инфекционными. Данные меры предосторожности включают, но не ограничиваются следующим:

- Используйте перчатки при работе с образцами или реагентами.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите, не накладывайте косметику или не дотрагивайтесь до контактных линз в помещениях, отведенных для работы с данными материалами.
- Очищайте и дезинфицируйте места попадания капель клинических образцов туберкулоцидным дезинфицирующим средством, например 1,0% гипохлоритом натрия, или другим подходящим дезинфектантом.
- Деконтаминируйте и утилизируйте все потенциально инфекционные материалы в соответствии с местными требованиями и рекомендациями[4]

См. инструкцию по применению

См. инструкцию по применению к тесту.

ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ



Хранить при температуре 15-30°C.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009.
2. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens*.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline —Third Edition.* CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
4. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual.* 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

За технической поддержкой обращайтесь в службу технической поддержки Abbott Molecular Technical Services по телефону 1-800-553-7042 (в США) или +49-6122-580 (вне США) или на сайт Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Vysis является торговой маркой группы компании Abbott в различных юрисдикциях.
Все другие торговые марки являются собственностью своих владельцев.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines. IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany

© 2011, 2015 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

Январь 2015
30-608478/R5

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

PROBECHEK HER-2/NEU КОНТРОЛЬНЫЕ СЛАЙДЫ ДЛЯ МЕТОДА FISH С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРА HER-2 DNA Probe Kit

ProbeChek HER-2/NEU КОНТРОЛЬНЫЕ СЛАЙДЫ ДЛЯ МЕТОДА FISH С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРА HER-2 DNA

REF 02J04-030, 02J05-030

30-608379/R1

Условные обозначения

	Официальный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
Σ	Количество достаточно для <n> тестов
30°C 15°C	Температурный режим
	Биологический риск
	Обратитесь к инструкции по применению
	Годен до
EC REP	Полномочный представитель

ProbeChek HER-2/NEU КОНТРОЛЬНЫЕ СЛАЙДЫ ДЛЯ МЕТОДА FISH С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРА HER-2 DNA
(Номер партии 30-805042, Кат. номер 02J04-030;
Номер партии 30-805093, Кат. номер 02J05-030)

ЗАПАНТЕНТОВАННОЕ НАЗВАНИЕ
ProbeChek HER-2/NEU контрольные слайды для флуоресцентной in situ гибридизации (FISH) с использованием набора PathVysion HER-2 ДНК набора.

ОБЩЕЕ ИЛИ ИСПОЛЬЗУЕМОЕ НАЗВАНИЕ
Реагенты для флуоресцентной in situ гибридизации

НАЗНАЧЕНИЕ
ProbeChek HER-2/NEU контрольные слайды это заключенные в парафин, фиксированные образцы клеток, помещенные на слайды для микроскопа. ProbeChek HER-2/NEU контрольные слайды предназначены для использования в качестве контролей для FISH анализа при соответствующих условиях гибридизации и в качестве контролей при надлежащей подготовке реагентов во время рутинного использования зонда PathVysion Her-2/neu на клинических образцах. ProbeChek HER-2/NEU контрольные слайды должны использоваться совместно с образцами слайдов пользователя согласно инструкции внутри набора PathVysion Her-2/neu.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КРАТКОЕ РАЗЪЯСНЕНИЕ

ProbeChek HER-2/NEU контрольные слайды изготовлены из культивированных линии клеток человека. Клетки собирают, фиксируют в суспензионном растворе, заключают в парафин и наносят на слайды для микроскопа. Процедуры, используемые для забора клеток и приготовления слайдов, оптимизированы для подготовки слайдов для интерфазного FISH-анализа. Оценка контроля слайдов выполняется путем подсчета флуоресцентных сигналов согласно правилам подсчета, описанным в инструкции (См. интерпретация результатов). Для подсчета сигналов необходим флуоресцентный микроскоп, снабженный одно или широкополосными фильтрами для возбуждения и эмиссии SpectrumOrange или SpectrumGreen флуорофоров, ртутной лампой 100-ватт и объективами с увеличением 63× и 100× Pro Plan. Пользователь должен произвести подсчет сигналов CEP и LSI при одинаковых условиях, чтобы провести сравнение при подсчете.

Для точного подсчета сигналов ДНК зондов CEP и LSI в образцах, в лабораториях должны использоваться стандартные методы подсчета. Изменчивость гибридизованного размера сигнала CEP и LSI, форма и интенсивность неизбежна из-за сжатия ДНК, пространственного расположения ДНК внутри ядра, эффективности гибридизации. Другие вариации могут возникать из-за изменчивой ядерной морфологии, различий в подготовке образца, остроты зрения и цветового восприятия и субъективного характера визуальной интерпретации. Опыт клинических испытаний продемонстрировал, что эти изменения могут быть минимизированы благодаря следующим стандартизированным методам подсчета, описанным во вкладыше внутри упаковки. Для проб LSI и CEP точность и достоверность подсчета отношения количества копий HER-2/neu к CEP 17 особенно важны при оценке образца на уровне или вблизи точки отсечения, поскольку неправильная интерпретация может приводить к ложноположительным или ложноотрицательным результатам.

ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Во время рутинного исследования на клинических образцах с использованием ДНК пробы Her-2/neu, контрольные слайды должны ставиться одновременно со слайдами пациента для контроля эффективности анализа и оценки точности подсчета сигналов. Контрольные слайды должны ставиться каждый день во время выполнения FISH-тестирования и с каждой новой партией PathVysion.

ProbeChek HER-2/neu контрольные слайды необходимы при каждой постановке. Результаты с контрольных слайдов должны находиться в пределах спецификации, перечисленных в **Таблице 1** ниже. ДНК-пробы PathVysion Her-2/neu и CEP 17 это меченые флуорохромами пробы SpectrumOrange и SpectrumGreen. Этот тест разработан для обеспечения метода для детекции и количественного определения гена Her-2/neu и 17 хромосомы в интерфазных ядрах методом FISH-диагностики.

РЕАГЕНТЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Необходимые материалы

Комплект контрольных слайдов ProbeChek HER-2/NEU включает в себя:

- **ProbeChek HER-2/NEU Cut-Off контрольные слайды**
  (Номер партии 30-805042/Кат. номер 02J04-030)

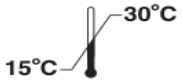
  Количество: **5 слайдов**
  Хранение: Храните контрольные слайды при температуре от 15°C до 30°C в закрытом контейнере с осушителем для защиты от влажности
  Состав: ProbeChek HER-2/NEU контрольные слайды для зонда PathVysion Her-2/neu Cut –off контроли (Отношение слабо амплифицированных сигналов), фиксированные в формалине, заключенные в парафин, культивированнные линии клеток молочной железы (Hs 578T), нанесенные на слайды для микроскопа.
- **ProbeChek PathVysion HER-2/NEU Нормальные контрольные слайды**
  (Номер партии 30-805093/Кат. номер 02J05-030)
  Количество: 5 слайдов
  Хранение: Храните контрольные слайды при температуре от 15°C до 30°C в закрытом контейнере с осушителем для защиты от влажности.
  Состав: ProbeChek HER-2/NEU контрольные слайды для PathVysion набора нормального контроля (нормальное отношение сигналов), фиксированные в формалине, заключенные в парафин, человеческие линии клеток рака молочной железы (MDA-MB-231), нанесенные на слайды для микроскопа.

Необходимые, но не поставляемые материалы:

Набор PathVysion Her-2/neu и все вспомогательные реагенты, компоненты и оборудование.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение и обработка



ProbeChek подготовленные слайды устойчивы до указанного срока годности при температуре от 15 до 30°C в закрытом контейнере с осушителем, чтобы защитить от влажности.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD **Медицинское устройство для диагностики In Vitro**

1. Предназначен только для диагностики *in vitro*
2.  **Внимание:** Этот препарат содержит выделенные из человека и/или потенциально инфицированные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может дать полной уверенности, что продукты, полученные от человека или инактивированные микроорганизмы не являются передатчиками инфекции. Этот реагент или образец от человека должны быть обработаны так, как будто они являются инфекционно опасными, в соответствии с безопасными лабораторными методами как те, что изложены в руководстве по биобезопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, OSHA Стандарты на патогенные компоненты крови, CLSI документ M29-A3, и 3 других соответствующих биобезопасности руководства.

Эти меры включают, но не ограничивают следующее:
• Надевайте перчатки при работе с образцами или реагентами.
• Не пипетируйте ртом.
• Не ешьте, не пейте, не курите, не наносите косметику, или контактными линзами в районах, где эти материалы используются.
• Очистите и продезинфицируйте разливы образцов используя средства, дезинфицирующее микобактерии туберкулеза, такие как 1,0% гипохлорита натрия или другое подходящее дезинфицирующее средство.
Дезактивации и утилизации всех потенциально инфекционных материалов проводится в соответствии с местными, государственными и федеральными правилами[4].

3. ProbeChek Her-2/neu контрольные слайды хранятся при температуре от 15 до 30°C до использования. Не подвергайте воздействию температур выше 30°C в течение длительного периода времени.
4. Невыполнение всех процедур по денатурации слайдов, гибридизации и обнаружению может привести к неприемлемым или ошибочным результатам анализа.
5. На условия гибридизации может неблагоприятно влиять использование реагентов, отличные от тех, которые предоставлены Abbott Molecular Inc.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Один контрольный слайд ProbeChek HER-2/neu обеспечивает одну 22×22 мм целевую область. PathVysion HER-2 гибридизации ДНК-зонда выполняется на контрольных и тестовых слайдах одновременно с использованием смеси ДНК-зонда PathVysion HER-2 в соответствии с рекомендациями выполнения анализа. Если качество гибридизованного слайда низкое, повторите FISH-исследование. Если качество сигнала приемлемо, выполните подсчет сигналов в 20 ядрах. Посчитайте среднее отношение числа копий HER-2/neu на клетку к CEP 17.
Примечание. См. вкладыш внутри упаковки для ДНК-зонда PathVysion HER-2 для получения подробной инструкции по процедуре FISH-анализа.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для интерпретации результатов обратитесь к инструкции **PathVysion HER-2 ДНК Probe** к набору внутри упаковки.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОДСЧЕТУ СИГНАЛОВ ДЛЯ ДВУХЦВЕТНЫХ ПРОБ

За рекомендациями по подсчету сигналов для двухцветных проб обратитесь к инструкции PathVysion Her-2/neu внутри упаковки.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для получения оптимальных результатов проводят гибридизацию и подсчет сигналов на контрольных слайдах ProbeChek HER-2/neu в соответствии с инструкциями, поставляемыми с набором ДНК-зонда PathVysion HER-2. Каждый гибридизованный слайд должен быть оценен относительно специфичности гибридизации, интенсивности сигнала, сигнала к фоновому шуму и общей читаемости с использованием соответствующего микроскопа, освещения и набора фильтров, как описано в инструкции к набору ДНК-зонда PathVysion HER-2 внутри упаковки. Гибридизованные слайды, не соответствующие этим критериям, не должны использоваться для подсчета сигналов. Оценка адекватности контрольных слайдов и выполнение подсчета сигналов в соответствии с руководствами по подсчету сигналов в секции для двухцветных проб.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Критерии адекватности слайдов должны быть удовлетворены, и результаты соотношения сигналов LSI HER-2/neu:CEP 17 должны быть в пределах установленных диапазонов для приемлемых результатов теста. См. **Таблицу 1** для приемлемых результатов контрольных слайдов ProbeChek HER-2/neu.
Ни в коем случае не выдавайте результаты FISH-исследований, если контрольные слайды не сработали. Если контрольные слайды не соответствуют критериям принятия, анализ не может быть выполнен должным образом, или, возможно, компоненты PathVysion Kit сработали неадекватно. Повторите анализ с новыми контрольными слайдами и слайдами с образцами пациентов, в случае необходимости. Если контрольные слайды соответствуют критериям приемлимости, но результаты подсчета находятся за пределами установленного диапазона, подсчет не может быть произведен корректно и независимо, поэтому целесообразно повторение анализа с этим же слайдом.
В случае неудачной гибридизации с образцом или контрольным слайдом, обратитесь к руководству по устранению неполадок в **Таблице 2** внутри упаковки PathVysion HER-2 ДНК-пробы.
Контроль образцов пациентов должен осуществляться в соответствии со стандартными требованиями лабораторных процедур. Качество гибридизации и подсчет результатов должны быть задокументированы в соответствующей форме. При оценке результатов следует учитывать эффективность и качество гибридизации.

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Контрольные слайды ProbeChek HER-2/neu не были валидированы в качестве контроля для ДНК-зондов, отличных от PathVysion Her-2/neu ДНК-зондов от Abbott Molecular Inc.Интерпретация сигнала пользователем и качество гибридизации может повлиять на результаты.
- Производительность PathVysion ProbeChek HER-2/neu контрольных слайдов была валидирована с использованием процедур, предусмотренных в листке-вкладыше внутри упаковки и листке-вкладыше к набору зондов PathVysion Her-2/neu. Модификации этих процедур могут изменить производительность анализа.
- Пользователи, осуществляющие подсчет FISH-сигналов, должны визуально отличать оранжевые и зеленые сигналы.

Ожидаемые значения

ProbeChek HER-2/neu контрольные слайды были валидированы Abbott Molecular Inc. Подсчет сигналов в пределах указанного диапазона выполним пользователем, если пользователь следует рекомендациям по подсчтету сигналов. Если результаты выходят за пределы ожидаемого диапазона, обратитесь к руководству по устранению неполадок, представленному во вкладыше в комплекте поставке к набору PathVysion Her-2/neu ДНК зонду. Для нормального HER-2/neu: отношение сигналов CEP 17 к контрольным слайдам ProbeChek HER-2/neu, обратитесь к инструкции-вкладышу внутри упаковки набора PathVysion Her-2/neu ДНК зонду.

Таблица 1
Для нормального HER-2/neu: отношение сигналов CEP 17 к контрольным слайдам ProbeChek HER-2/neu

Контроль	**Her-2/neu/CEP 17** **Диапазон значений**
Нормальное отношение сигналов для контрольных слайдов Номер партии № (02J05-030/Номер партии № 30-805093	от 0.75 до 1.25
Точка отсечения (слабая амплификация) отношение для контрольных слайдов Номер партии № (02J04-030/Номер партии № 30-805042)	от 1.6 до 2.0

Библиография

1. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
2. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011
4. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Техническая поддержка

Техническая помощь
Если Вам требуется техническая помощь, звоните в техническую службу компании Эбботт Молекуляр Инк. (Abbott Molecular Inc.) по телефону +1-800 553-7042 в США или по телефону +49-6122-580 в других странах или заходите на сайт http:\\www.abbottmolecular.com.
PathVysion, CEP, LSI, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, и ProbeCheck являются зарегистрированными торговыми марками группы компании Эбботт Молекуляр Инк. в различных юрисдикциях.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP
Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany

© 2012 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

Февраль 2012
30-608379/R1

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

VP 2000 Pretreatment Kit

en

REF 08N16-001

30-608915/R4

VP 2000 Pretreatment Kit
REF 08N16-001
30-608915/R4

Тест IN VITRO
Для диагностики In VITRO

ПРИМЕЧАНИЯ: ИЗМЕНЕНИЯ ВЫДЕЛЕНЫ

Используемые символы

GTIN	Глобальный номер товара
	Официальный производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер лота
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	Температурный режим
	См. инструкцию по применению
	Использовать до (срок годности)
	Официальный производитель
EC REP	Авторизованный представитель в Европейском сообществе

СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ: 1-800-553-7042
СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ ПО РАБОТЕ С КЛИЕНТАМИ: ПОЗВОНИТЕ В СЛУЖБУ В ПОДДЕРЖКИ В ВАШЕЙ СТРАНЕ.

НАЗНАЧЕНИЕ

Используется для приготовления парафиновых срезов ткани рака легкого, фиксированных на положительно заряженных стеклах при проведение флуоресцентной in situ гибридизации (FISH) с ДНК зондами Vysis.

РЕАГЕНТЫ

VP 2000 Реагент для пробоподготовки (Кат. номер 08N16-001)

1. Vysis Раствор для предварительной обработки SSC

(2 флакона, 250 мл на флакон) 1X хлорид натрия, цитрат натрия (SSC), pH 7;

2. Vysis Буфер Протеазы IV

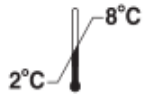
(2 флакона, 250 мл на флакон), 0.1N соляная кислота (HCl)

3. Vysis Протеаза IV

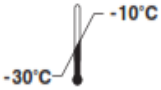
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

(1 флакон, 750 мг во флаконе), Пепсин от 2500 до 4000 ед./мг

4. Vysis Промывочный буфер I (2 флакона, 250 мл на флакон), 0,1% NP-40/2x SSC, pH 7;
5. Vysis Промывочный буфер II (2 флакона, 250 мл на флакон), 0,1% NP-40/2x SSC, pH 7;



VP 2000 набор для предподготовки устойчив до истечения срока годности при условии хранения от 2°C до 8°C.



При получении набора необходимо извлечь Протеазу IV и хранить при температуре от -20°C (±10°C).



См. инструкцию по применению

Обратитесь к инструкции по применению для конкретного анализа.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

VP 2000 набор для предподготовки транспортируется на хладоэлементах.

Если Вы получили реагенты, состояние которых противоречит рекомендациям на этикетки или они повреждены, обратитесь в службу технической поддержки Abbott Molecular.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD Медицинские изделия для диагностики in vitro

- Обращайтесь со всеми биологическими образцами как с перенсчиками инфекционных агентов. Инструкции по обращению с образцами доступны в Центрах по контролю за заболеваниями и профилактике (Centers for Disease Control and Prevention), США.
- Утилизируйте все опасные вещества в соответствии с инструкциями по утилизации опасных веществ.
- Правильное хранение компонентов набора является необходимым условием до истечения срока годности. Если компоненты набора хранятся при других условиях, это может отрицательно повлиять на результаты анализа.
- Не используйте набор или компоненты набора по истечению срока годности, указанной на самом наборе или этикетках на реагентах.
- Этот набор может использоваться только для автоматической обработки образцов.

Следующие предупреждения и меры предосторожности относятся к компонентам набора для пробоподготовки VP 2000.

ОПАСНОСТЬ



Компоненты продукта, несущие угрозу: соляная кислота (HCl), компоненты буфера Vysis для Протеазы IV

H290	Может вызывать коррозию металлов.
H314	Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.
P260	Избегать вдыхания тумана/паров/аэрозолей.
P280	Пользоваться защитными перчатками/ защитной одеждой/средствами защиты глаз.
P234	Хранить только в контейнере завода-изготовителя.
P264	После работы тщательно вымыть руки.
P303+P361+P353	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): Снять/удалить немедленно всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой/принять душ.
P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Острожно промыть водой в течение несколько минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз.
P310	Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕНТР или к специалисту/терапевту.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

P304+P340	ПРИ ВДЫХАНИИ: В случае затруднения дыхания вынести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить ему полный покой в удобном для дыхания положении.
P301+ P330+P331	ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: Прополоскать рот. НЕ вызывать рвоту.
P363	Перед повторным использованием постирайте загрязненную одежду
P405	Хранить под замком.
P406	Хранить в контейнере, стойком от коррозии с прочной внутренней прокладкой.
P501	Утилизировать содержимое/контейнер в соответствии с местными правилами.



Компоненты продукта, несущие угрозу: **Пепсин,** компоненты буфера Vysis для Протеазы IV



H315 Вызывает раздражение кожи.
H319 Вызывает серьезное раздражение глаз.
H334 При вдыхании может вызывать аллергические или астматические симптомы или затруднение дыхания.

H335	Может вызывать раздражение дыхательных путей.
P285	При отсутствии надежной вентиляции пользоваться средствами защиты органов дыхания.
P261	Избегать вдыхания тумана/паров/аэрозолей.
P280	Пользоваться защитными перчатками/ защитной одеждой/средствами защиты глаз.
P264	После работы тщательно вымыть руки.
P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Острожно промыть водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь или и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз.
P302+P352	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: Промытьбольшим количеством воды.
P304+P341	ПРИ ВДЫХАНИИ: В случае затруднения дыхания вынести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить ему полный покой в удобном для дыхания положении.
P312	Обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к специалисту/терапевту при плохом самочувствии.
P362	Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед использованием.
P405	Хранить под замком.
P501	Утилизировать содержимое/контейнер в соответствии с местными правилами.

Паспорта безопасности: Важная информация о безопасном обращении, транспортировке и утилизации данного продукта содержится в Паспортах безопасности.
ПРИМЕЧАНИЕ: За паспортами безопасности (SDS) для каждого реагента из набора обращайтесь в Службу технической поддержки Abbott Molecular.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Набор VP 2000 для предподготовки был оптимизирован для использования с образцами тканей рака легкого, фиксированных в формалине и заключенных в формалин.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Centers for Disease Control. Guidelines for prevention of transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis B virus to health-care and public-safety workers. *MMWR.* 1989;38(S-6):16.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА:

За технической поддержкой обращайтесь в Службу технической поддержки Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 (вне США) или посетите сайт Abbott Molecular: http://www.abbottmolecular.com.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Abbott Molecular Inc. легальный производитель набора для предподготовки VP 2000.

Vysis является торговой маркой группы компаний Abbott в различных юрисдикциях.

Все другие торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines. IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany

© 2013, 2015 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

Июнь 2015
30-608915/R4

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Набор реагентов для пробоподготовки Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer

ru

Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer Kit

REF 1N31-05

G0-3080/R08

B1N31R

Примечание: См. выделенные изменения

Используемые символы

GTIN	Глобальный номер товара
	Изготовитель
REF	Каталожный номер
IVD	Медицинское изделие для диагностики *In Vitro*
LOT	Номер серии
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	См. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
	Температурный режим
	См. инструкцию по применению
	Использовать до (Срок годности)
EC REP	Авторизованный представитель в Европейском Сообществе

МЕЖДУНАРОДНАЯ СЕРВИСНАЯ ПОДДЕРЖКА: ОБРАЩАЙТЕСЬ К МЕСТНОМУ ПРЕДСТАВИТЕЛЮ КОМПАНИИ ABBOTT

Перед использованием внимательно прочитайте данную инструкцию по применению. Необходимо точно следовать данной инструкции по применению. При отклонении от инструкции по применению надежность результатов теста не гарантируется.

НАЗНАЧЕНИЕ

Для подготовки залитых в парафин срезов раковой ткани легкого на предметных стеклах с положительно заряженной поверхностью для использования в процедуре флуоресцентной гибридизации In Situ (Fluorescence In Situ Hybridization - FISH) с использованием зондов Vysis DNA FISH.

ТЕСТ *IN VITRO*

Для диагностики *In Vitro*

ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ И ПРИНЦИПЫ

Клетки и ткани солидных опухолей обычно фиксируют в формалине и заливают парафином (FFPE) с целью сохранения их морфологии. Для подготовки таких препаратов были оптимизированы традиционные методологии окрашивания. Соответственно, ткани FFPE часто являются единственным типом образцов, доступным для анализа методом гибридизации In Situ. В технологии FISH используется процедура отжига одноцепочечного ДНК-зонда с комплементарными мишеневыми последовательностями. Результат гибридизации зонда со специфическим участком клеточной ДНК можно видеть с помощью флуоресцентной микроскопии, использующей зонд, непосредственно меченный флуорофором (напр., зонд, меченный флуорофором SpectrumOrange). ДНК-зонды FISH гибридизируются с клетками в образцах FFPE. Чем более доступна мишеневая ДНК для зонда, тем эффективнее анализ FISH в образце. Поэтому при подготовке образцов FFPE для FISH-анализа образцы депарафинизируют и предварительно обрабатывают с тем, чтобы максимально повысить проницаемость ткани и эффективность гибридизации.[1] ДНК образца и зонд одновременно денатурируют на предметном стекле и затем проводят гибридизацию. После гибридизации несвязанный зонд удаляется с помощью процедуры быстрой промывки, затем с помощью контрастного окрашивания определяется ядро клетки. Анализ проводится на основе суммирования сигналов зонда в ядре клетки. Для некоторых образцов может потребоваться более интенсивная предварительная обработка. Следующая процедура разработана с тем, чтобы максимально повысить проницаемость ткани при использовании ДНК-зондов FISH на препаратах FFPE ткани легкого.

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ VYSIS PARAFFIN PRETREATMENT IV & POST-HYBRIDIZATION WASH BUFFER KIT

- Раствор предварительной обработки Vysis Pretreatment Solution (5 флаконов по 50 мл)
  1N роданид натрия (NaSCN)
- Буфер протеазы Vysis Protease Buffer IV (5 флаконов по 50 мл)
  0,1 N соляная кислота (HCl)
- Протеаза Vysis Protease IV (5 флаконов по 75 мг)
  Пепсин, 2500 - 4000 Ед/мг
- Промывочный буфер Vysis Wash Buffer I (1 флакон, 250 мл)
  0,3% NP-40 / 0,7x хлорид натрия, цитрат натрия (SSC), pH 7
- Промывочный буфер Vysis Wash Buffer II (1 флакон, 250 мл)
  0,1% NP-40 / 2x хлорид натрия, цитрат натрия (SSC), pH 7

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Данная процедура разработана для использования образца FFPE раковой ткани легкого. Для других типов образцов и/или тканей может потребоваться изменение условий предварительной обработки, гибридизации и/или промывки.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD **Медицинское изделие для диагностики *In Vitro***

Меры предосторожности

- Обращайтесь со всеми биологическими образцами как с переносчиками инфекционных агентов. Инструкции по обращению с образцами доступны в Центрах по контролю за заболеваниями и профилактике (Centers for Disease Control and Prevention), США.[2]
- Утилизируйте все опасные материалы в соответствии с официальными инструкциями по утилизации опасных веществ.
- Инструкции по безопасному использованию см. в Руководстве по эксплуатации ThermoBrite, раздел "Hazards" (Опасности).

Следующие предупреждения и меры предосторожности относятся к компонентам набора реагентов для пробоподготовки Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer Kit:

Буфер протеазы Protease Buffer IV:



Опасность

Компоненты продукта, несущие угрозу:
Соляная кислота

H290	Может вызывать коррозию металлов.
H314	Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.
P260	Избегать вдыхания тумана/паров/аэрозолей.
P280	Пользоваться защитными перчатками/ защитной одеждой/средствами защиты глаз.
P234	Хранить только в контейнере завода-изготовителя.
P264	После работы тщательно вымыть руки.
P303+P361 +P353	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): Снять/удалить немедленно всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой/принять душ.
P305+P351 +P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Острожно промыть водой в течение несколько минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз.
P301+P330 +P331	ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: Прополоскать рот. НЕ вызывать рвоту.
P390	Абсорбировать пролившееся вещество, чтобы не допустить повреждения материалов.
P310	Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕНТР или к специалисту/терапевту.
P501	Утилизировать содержимое/контейнер в соответствии с местными правилами.

Протеаза Vysis Protease IV:



Опасность

Компоненты продукта, несущие угрозу: Пепсин А



H315	Вызывает раздражение кожи.
H319	Вызывает серьезное раздражение глаз.
H334	При вдыхании может вызывать аллергические или астматические симптомы или затруднение дыхания.
H335	Может вызывать раздражение дыхательных путей.
P285	При отсутствии надежной вентиляции пользоваться средствами защиты органов дыхания.
P261	Избегать вдыхания тумана/паров/аэрозолей.
P280	Пользоваться защитными перчатками/ защитной одеждой/средствами защиты глаз.
P264	После работы тщательно вымыть руки.
P305+P351 +P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Острожно промыть водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь или и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз.
P302+P352	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: Промыть большим количеством воды.
P304+P341	ПРИ ВДЫХАНИИ: В случае затруднения дыхания вынести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить ему полный покой в удобном для дыхания положении.
P312	Обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к специалисту/терапевту при плохом самочувствии.
P362	Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед использованием.
P405	Хранить под замком.
P501	Утилизировать содержимое/контейнер в соответствии с местными правилами.

Паспорта безопасности: Важная информация о безопасном обращении, транспортировке и утилизации данного продукта содержится в Паспортах безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: За паспортами безопасности (SDS) для каждого реагента из набора обращайтесь в Службу технической поддержки Abbott Molecular.

- Для обеспечения пригодности компонентов набора в течение указанного на этикетке срока годности необходимо правильно их хранить. Неправильные условия хранения компонентов набора могут неблагоприятно повлиять на результаты теста.
- Для измерения температур растворов, водных бань и инкубаторов требуются откалиброванные термометры.
- Перед каждым использованием обязательно измеряйте температуру раствора предварительной обработки и промывочных буферов в сосуде Коплина откалиброванным термометром.
- Данный набор не следует использовать при автоматизированной обработке образцов.

ИНСТРУКЦИИ ПО ОБРАЩЕНИЮ С РЕАГЕНТОМ И ЕГО ХРАНЕНИЮ

Компоненты набора реагентов для пробоподготовки Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer Kit остаются стабильными до истечения указанного срока годности, если хранились при температуре 2 – 8°C.

ПРИМЕЧАНИЕ: По получении достаньте протеазу из набора и храните ее при температуре –20°C (±10°C).

Условия транспортировки

Транспортируйте набор реагентов для пробоподготовки Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer Kit на хладоэлементах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Hemo-De (или равноценный заменитель, напр., d-лимонен) или ксилон
- Гематоксилин и эозин
- Этанол (100%). Хранить при комнатной температуре.
- Дистиллированная вода
- Каучуковый клей
- Покровные стекла 22 мм × 22 мм
- Микролитровый пипеттор (1 – 10 мкл) и стерильные наконечники
- Таймер
- Микротом
- Вортекс
- Микроцентрифуга
- Водяные бани статичные или с циркуляцией (37˚C)
- Водяные бани с циркуляцией (75˚C и 81˚C)*
- Водяные бани для дистиллированной воды (40˚C – 45˚C)
- Система денатурации/гибридизации ThermoBrite/ инкубатор с нагревом / термостат / нагревательная пластина (54 – 68˚C)
- Щипцы
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Сосуды Коплина (12 × 50 мл). Предлагаемый тип: вертикальный сосуд для окрашивания
- pH-метр и pH-бумага
- Откалиброванный термометр
- Коробка с крышкой и/или картонные папки для хранения предметных стекол

***ПРИМЕЧАНИЕ: Статичные водяные бани не обеспечивают требуемый температурный контроль для бань с высокой температурой.**

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Осветляющее вещество

Наполните 3 сосуда Коплина 50 мл Hemo-De или ксилона. Если сосуд не используется, он должен быть закрыт. Утилизируйте после 1-недельного использования.

Раствор для предварительной обработки

Налейте один флакон (50 мл) раствора для предварительной обработки в сосуд Коплина. Поместите сосуд в водяную баню с циркуляцией с температурой окружающей среды. Нагрейте водяную баню с циркуляцией до 81˚C. До депарафинирования препаратов убедитесь, что температура раствора составляет 80 ± 2˚C. Через 1 день утилизируйте раствор.

Раствор протеазы

Добавьте одну пробирку протеазы к 1 флакону буфера протеазы. Промойте пробирку небольшим количеством буфера протеазы и вылейте содержимое обратно во флакон с буфером протеазы. Закройте флакон и аккуратно переверните несколько раз, чтобы перемешать содержимое. Поместите раствор протеазы в сосуд Коплина, а сосуд поместите в водяную баню с температурой 37˚C. После перемешивания подождите минимум 1 час, чтобы перед использованием протеаза растворилась в растворе, а температура буфера составляла 37 ± 1˚C. Через 1 день утилизируйте раствор.

Дистиллированная вода

Наполните сосуд Коплина 50 мл дистиллированной воды. При использовании вода должна иметь температуру окружающей среды.

Растворы этанола

Подготовьте разведения этанола 70%, 85% и 100% об/об с использованием 100% этанола и дистиллированной воды. Разведения можно использовать в течение 1 недели, если не произошло выпаривания раствора, его излишнего разбавления или помутнения вследствие слишком интенсивного использования. Если разведение не используется, хранить при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах.

ПРИМЕЧАНИЕ: При использовании набора Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit следуйте инструкциям по процедуре теста в инструкции по применению продукта.

Процедура обработки образца

ПРИМЕЧАНИЕ: Если обработка образца оказалась слишком жесткой, о чем можно судить по результатам окрашивания красителем DAPI, может быть использована более умеренная процедура предварительной обработки. Если обработка образца была недостаточной, можно использовать более интенсивную процедуру предварительной обработки образца, или этот образец может быть обработан дополнительно. *См. раздел Устранение неисправностей инструкции по применениЮ к набору FISH Probe.*

Тщательно следуйте лабораторным процедурам, чтобы не допустить перекрестной контаминации при подготовке препаратов.

Количества рассчитываются для 4 препаратов с одной или двумя площадями образца по 22 × 22 мм.

ПРЕДГИБРИДИЗАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ

Депарафинизация препаратов

1. Погрузите препараты в первый сосуд с Hemo-De или равноценным заменителем (напр., d-лимоненом) или ксилоном на 5 минут при температуре окружающей среды.
2. Повторите дважды шаг 1, используя каждый раз новый Hemo-De (или равноценный заменитель) или ксилон.
3. Дегидрируйте препараты в 100% этаноле в течение 1 минуты при температуре окружающей среды. Повторите этот шаг 1 раз.
4. Просушите препараты в течение 2 – 5 минут (опционно).

Предварительная обработка препарата

Если в процессе обработки образец слишком разрушен, может быть использована более умеренная процедура предварительной обработки. Если обработка образца была недостаточной, можно использовать более интенсивную процедуру предварительной обработки образца. См. раздел Устранение неисправностей инструкции по применению к набору FISH Probe.

5. Погрузите препараты в раствор предварительной обработки с температурой 80 ± 2˚C на 12 ± 3 минут.
   При необходимости 2 препарата могут быть размещены "спина к спине" в каждом отделении сосуда Коплина, при этом 1 препарат помещается в каждом крайнем отделении. Стороны крайних препаратов со срезами ткани должны быть обращены к центру сосуда.
   Одновременно в сосуде Коплина могут быть обработаны максимум 8 препаратов.
6. Погрузите препараты в дистиллированную воду на 3 минуты.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ПРОТЕАЗОЙ

7. Выньте препараты из сосуда с дистиллированной водой.
8. Удалите лишнюю воду, промокнув края препаратов бумажным полотенцем.
9. Погрузите препараты в раствор протеазы с температурой 37 ± 1˚C на 20 ± 2 минуты.
   При необходимости 2 препарата могут быть размещены "спина к спине" в каждом отделении сосуда Коплина, при этом 1 препарат помещается в каждом крайнем отделении. Стороны крайних препаратов со срезами ткани должны быть обращены к центру сосуда.
10. Погрузите препараты в дистиллированную воду на 3 минуты.

Процедура гибридизации

См. инструкции по процедуре гибридизации в инструкции по применению к набору FISH Probe.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОЦЕДУРА ПОСТ-ГИБРИДИЗАЦИИ

Промывка препаратов

ПРИМЕЧАНИЕ: Препараты, прошедшие этап гибридизации, должны быть промыты в день завершения гибридизации.

Налейте 50 мл промывочного буфера I (0,3% NP-40/0,7X SSC) в сосуд Коплина. Поместите сосуд в водяную баню комнатной температуры. Перед использованием нагревайте водяную баню до 75°C в течение минимум 30 минут. До промывки препаратов убедитесь в том, что температура промывочного раствора составляет 74 ± 1°C. Раствор можно использовать 1 день, затем его необходимо утилизировать.

Налейте 50 мл промывочного буфера II (0,1% NP-40/2X SSC) в другой сосуд Коплина и используйте его при комнатной температуре для проведения описанных ниже шагов 1 и 4. Раствор можно использовать 1 день, затем его необходимо утилизировать.

Для поддержания требуемой температуры промывочного буфера I промывайте одновременно только 4 препарата. Если у вас менее 4 препаратов, добавьте пустые препараты до общего количества в 4 единицы. Начинайте отсчет времени с момента погружения 4го препарата.

ПРИМЕЧАНИЕ: Оставьте препараты в системе ThermoBrite System до начала процедуры.

1. Удалите каучуковый клей с 1 препарата, при этом стараясь минимально сдвинуть покровное стекло, и погрузите препарат в промывочный буфер II комнатной температуры. Требование удаления каучукового клея с минимальным сдвигом покровного стекла обусловлено необходимостью минимизировать потерю ткани. Повторите процедуру на других препаратах и оставьте их на 2 – 5 минут, чтобы покровные стекла отмокли от них.
2. Погрузите препарат в промывочный буфер I с температурой 74 ± 1°C. Аккуратно взболтайте в течение 1 – 3 секунд. Повторите на других препаратах.
3. Удалите препараты из буфера после 2 минут.
4. Погрузите препараты в промывочный буфер II с температурой окружающей среды.
5. Аккуратно перемешайте раствор с содержащимися в нем препаратами в течение 1 – 3 секунд. Извлеките препараты через 5 секунд – 1 минуту.

   ПРИМЕЧАНИЕ: До промывки других 4 препаратов убедитесь в том, что температура промывочного буфера I составляет 74±1°C.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ГИБРИДИЗИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА

См. инструкции по процедуре визуализации в инструкции по применению к набору FISH Probe.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Hopman A, Claessen S, Speel E. Multi-colour brightfield in situ hybridisation on tissue sections. *Histochem Cell Biol* 1997;108:291-298.
2. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in healthcare settings. *MMWR* 1987;36:(suppl no. 2S):1-18.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА:

За технической поддержкой обращайтесь в Службу технической поддержки Abbott Molecular по телефону +49-6122-580 (вне США) или посетите сайт Abbott Molecular: http://www.abbottmolecular.com.

Abbott Molecular Inc. является законным изготовителем набора реагентов для пробоподготовки Vysis Paraffin Pretreatment IV and Post-Hybridization Wash Buffer Kit.

Vysis является торговой маркой группы компаний Abbott в различных юрисдикциях.

Все другие торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany

© 2011, 2015 Abbott Laboratories

www.abbottmolecular.com

Июнь 2015 г.

Авторизованный представитель изготовителя на территории России и других стран СНГ:

ООО «Эбботт Лэбораториз», 125171, Россия, г. Москва, Ленинградское шоссе, 16А, строение 1,
Тел: +7 (495) 258 42 70 (80); факс: +7 (495) 258 42 71 (81)

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit

ru

Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit

REF 08N29-021

H06382R02

B8N29R

ПРИМЕЧАНИЕ: См. выделенные изменения

Используемые символы	
REF	Каталожный номер
LOT	Номер серии
IVD	Медицинское изделие для диагностики In Vitro
In Vitro Test	Тест In Vitro
6q22 ROS1 (Cen) SpectrumGreen Probe	6q22 ROS1 (Cen) Зонд SpectrumGreen
6q22 ROS1 (Tel) SpectrumOrange Probe	6q22 ROS1 (Tel) Зонд SpectrumOrange
	Биологический риск
	Достаточно для проведения <n> теста(-ов)
	Температурный диапазон
	Использовать до (срок годности)
	См. инструкцию по применению
EC REP	Авторизованный представитель в Европейском Сообществе
	Изготовитель

СЕРВИСНАЯ ПОДДЕРЖКА: 1-800-553-7042
МЕЖДУНАРОДНАЯ СЕРВИСНАЯ ПОДДЕРЖКА: ОБРАЩАЙТЕСЬ К ПРЕДСТАВИТЕЛЮ КОМПАНИИ ABBOTT

Строго следуйте инструкциям. При отклонении от данных инструкций надежность результатов анализа не гарантируется.

ПРИМЕЧАНИЕ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

В случае связанного с изделием серьезного инцидента необходимо сообщить об инциденте производителю, а также в соответствующий компетентный орган страны пользователя и/или пациента. Для сообщения производителю см. контактную информацию в разделе о технической поддержке настоящей инструкции.

НАЗВАНИЕ

Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit представляет собой качественный анализ для определения приобретенных патогенетических изменений гена ROS1 в локусе 6q22 методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) в зафиксированных в формалине и залитых парафином (FFPE) образцах, полученных от человека.

Анализ ROS1 методом FISH используется в сочетании с другой клинической и диагностической информацией; его нельзя применять в качестве единственного основания для диагностических или терапевтических решений. Данный анализ можно выполнить вручную или полуавтоматическим способом.

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ

Предполагаемые пользователи (внешние заинтересованные лица):

- Руководство и персонал выполняющих анализ лабораторий
- Врачи, использующие результаты выполненных анализов
- Пациенты, для которых выполняются анализы

Места использования:

- Контрольные диагностические лаборатории
- Частные диагностические лаборатории
- Диагностические лаборатории на базе больниц

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

В системе Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit (LN 08N29-021) используется технология флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) для обнаружения перестроек гена ROS1 в локусе 6q22, которые затрагивают ген рецептора тирозинкиназы (ROS1).[1,2] ROS1 (ROS протоонкоген 1) — это ген, кодирующий белок ROS, являющийся рецептором тирозинкиназы (RTK), входящей в семейство инсулиновых рецепторов.

Перестройка гена ROS1 может приводить к образованию рекомбинантных белков, в которых киназный домен ROS1 становится конститутивно активным, способствуя трансформации потенциала ROS1. Описанные в литературе патогенетические перестройки гена ROS1 связаны с 3`-концом гена ROS1, который включает тирозинкиназный домен (экзоны 36–42), до 5`-конца соседнего гена. Технология FISH с разделенными зондами широко применяется для обнаружения перестроек гена ROS1.[3,4]

Перестройка гена ROS1 происходит у 0,2–2,4 % пациентов с колоректальным раком (CRC)[5,6] и у 1–2 % пациентов с немелкоклеточным раком легкого (NSCLC), приводя к его онкогенной активации.[7,8] Перестройка ROS1 также обнаруживалась у пациентов с аденокарциномой желудка,[9] различными типами меланомы,[10,11] воспалительной миофибробластической опухолью,[12] ангиосаркомой и эпителиоидной гемангиоэндотелиомой.[7,13] Перестройка гена ROS1 вызывает устойчивую активацию тирозинкиназы (TK), ведущую к росту пролиферации и выживаемости трансформированных клеток.[14,15] Угнетение ROS1 TK ингибиторами тирозинкиназы (TKI), включая, среди прочих, кризотиниб, церитиниб, бригатиниб, лорлатиниб, карбозатиниб и энтректиниб, способствует отмиранию клеток опухоли, что благотворно сказывается на проходящих курс лечения пациентах и повышает уровень выживаемости.[14–15, 16–20]

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ПРОЦЕДУРЫ

Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) представляет собой метод обнаружения специфических хромосомных нуклеотидных последовательностей в клеточном препарате. Более конкретно, в технологии FISH используется процедура гибридизации одноцепочечной молекулы флуоресцентно-меченого

ДНК-зонда с комплементарными таргетными последовательностями. Гибридизация зонда с таргетным участком клеточной ДНК визуально заметна с помощью флуоресцентной микроскопии.

Зафиксированные формалином и залитые в парафин препараты тканей (FFPE) размещают на предметных стелках.

Выполняют предварительную подготовку ткани для обеспечения доступа к клеточной ДНК-мишени в ткани для гибридизации. ДНК денатурируют до одноцепочечной формы, а затем выполняют гибридизацию с ДНК-зондами. После гибридизации несвязанный зонд удаляется в результате серии промывок, а ядра контр-окрашивают ДАПИ (4,6-Диамидино-2-фенилиндолом), специфическим красителем ДНК, флуоресценирующим синим цветом. Гибридизацию зондов ROS1 оценивают с помощью флуоресцентного микроскопа, соответствующими возбуждающим и эмиссионным фильтрами, и позволяющего осуществить

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

визуализацию оранжевых и зеленых флуоресцентных сигналов.

Описание зонда

Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit состоит из 2 меченых флуорофором ДНК-зондов в буфере ТЕ с блокирующей ДНК:

- Зонд Vysis 6q22 ROS1 (Cen) SpectrumGreen [3′]
- Зонд Vysis 6q22 ROS1(Tel) SpectrumOrange [5′]

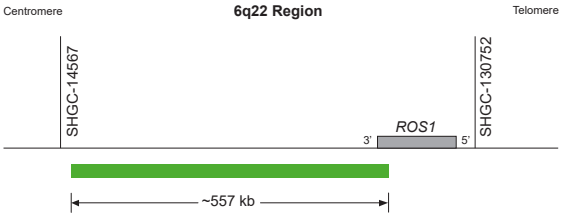
Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit состоит из двух зондов, локализованных на 3` и 5` концах областей гена ROS1, которые подвержены структурным изменениям.

Зонд 3`-ROS1, гибридизующийся центромерно относительно участка гена ROS1, подверженного структурным изменениям, имеет размер приблизительно 557 п.н. и мечен флуорофором SpectrumGreen. Зонд гибридизуется в локусе 6q22 хромосомы 6 (chr6: 117070689 - 117626753; Сборка февраля 2009 г., Калифорнийский университет г. Санта-Круз [UCSC], Геном человека), захватывая экзоны 42 и 43 гена ROS1, а также нижележащий (центрометрический) от гена ROS1 участок.

Зонд 5`-ROS1, гибридизующийся теломерно относительно участка гена ROS1, подверженного структурным изменениям, имеет размер приблизительно 317 п.н. и мечен флуорофором SpectrumOrange. Зонд располагается в локусе 6q22 хромосомы 6 (chr6: 117654720 - 117970851; Сборка февраля 2009 г., Калифорнийский университет г. Санта-Круз [UCSC], Геном человека). Он гибридизуется на участок телометрически выше гена ROS1, включает промотор гена ROS1 и заканчивается в интроне 31 гена ROS1.

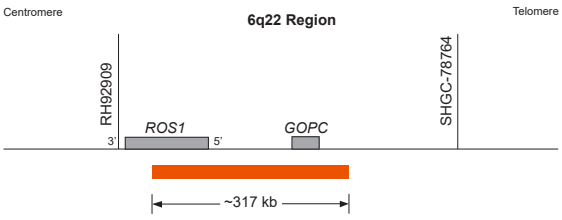
При гибридизации с Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe участок 6q22 ROS1 в нативном состоянии будет виден как 2 непосредственно примыкающих или наслоившихся (частично совпадающих) сигнала: оранжевый и зеленый (желтый). Однако при обнаружении хромосомной перестройки на участке, подверженном структурным изменениям, 6q22 ROS1 будут видны 1 оранжевый и 1 зеленый сигналы, разделенные диаметром по крайней мере одного сигнала. Альтернативно может быть виден единичный зеленый сигнал (с удалением оранжевого сигнала) в дополнение к наслоившемуся или частично прерванному сигналу.

Карта зонда Vysis 6q22 ROS1 (Cen) SpectrumGreen



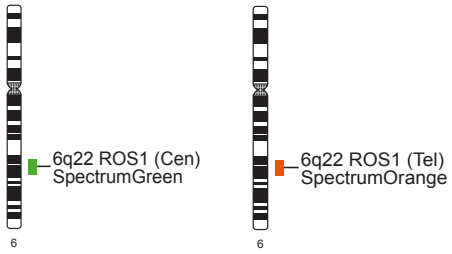
6q22 ROS1 (Cen) SpectrumGreen Probe

Карта зонда Vysis 6q22 ROS1 (Tel) SpectrumOrange

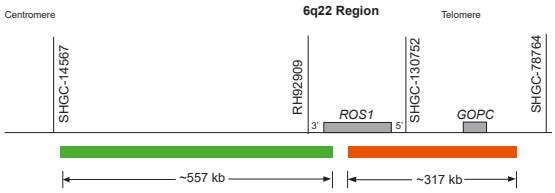


6q22 ROS1 (Tel) SpectrumOrange Probe

Идеограммы зондов Vysis 6q22 ROS1 (Cen) SpectrumGreen и Vysis 6q22 ROS1 (Tel) SpectrumOrange



Относительное расположение зонда Vysis 6q22 ROS1 (Cen) SpectrumGreen и зонда Vysis 6q22 ROS1 (Tel) SpectrumOrange



6q22 ROS1 (Cen) SpectrumGreen Probe and (Tel) SpectrumOrange Probe

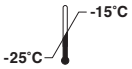
РЕАГЕНТЫ

Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit, (кат. № 08N29-021)

(10 тест-систем)

- 1 пробирка, 10 мкл на пробирку, зонд Vysis 6q22 ROS1 (Cen) SpectrumGreen (200 нг/мкл) в буфере ТЕ с блокирующей ДНК
- 1 пробирка, 10 мкл на пробирку, зонд Vysis 6q22 ROS1 (Tel) SpectrumOrange (50 нг/мкл) в буфере ТЕ с блокирующей ДНК

ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ



Систему Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit следует хранить при температуре от -25 до -15 °C и защищать от света

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

Набор Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit поставляется на сухом льду. В страны, где применение сухого льда не допускается, набор поставляется с использованием хладпакетов. Если применение хладпакетов также ограничено, допускается использование упакованного в пластиковую сумку льда.

В случае получения реагентов в состоянии, не соответствующем рекомендациям, приведенным на этикетках продукции, или в поврежденной упаковке обращайтесь в Службу сервисной поддержки Abbott Molecular.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD Медицинское изделие для диагностики In Vitro

Заявление о биологической безопасности компонентов набора

- Зонд 6q22 ROS1 (Tel) SpectrumOrange и зонд 6q22 (Cen) SpectrumGreen

ВНИМАНИЕ: Данные препараты содержат полученные от человека и/или потенциально инфекционные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не предоставляет полной гарантии, что биоматериалы человека или инактивированные микроорганизмы не переносят инфекции. С данными реагентами и образцами, полученными от человека, следует обращаться как с инфекционно опасными, следуя соответствующим правилам лабораторной безопасности, подобно приведенным в руководстве «Биологическая безопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях»,[21] стандартах OSHA о гемоконтактных патогенах,[22] документе CLSI M29-A4[23] и прочих соответствующих нормах по биологической безопасности.[24] Поэтому все биоматериалы человека следует считать потенциально инфекционными.

Данные меры предосторожности включают, без ограничений, следующее:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Надевайте перчатки при работе с клиническими образцами или реагентами.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите, не накладывайте косметику или не дотрагивайтесь до контактных линз в помещениях, отведенных для работы с данными материалами.
- Очищайте и дезинфицируйте места попадания капель клинических образцов туберкулоцидным дезинфицирующим средством, например 1,0%-м гипохлоритом натрия, или другим подходящим дезинфектантом.[21]
- Деконтаминируйте и утилизируйте все потенциально инфекционные материалы в соответствии с местными или федеральными законами.[24]
- Для эксплуатации процессора VP 2000 и инструмента ThermoBrite см. отдельные инструкции по безопасности.

Паспорта безопасности: Важная информация по безопасности при обращении, транспортировке и утилизации продукта содержится в его паспорте безопасности.

Примечание: Паспорт безопасности (SDS) используемого в системе реагента можно получить в Службе сервисной поддержки Abbott Molecular.

Меры предосторожности при работе в лаборатории

- Необходимо избегать воздействия на образцы кислот, сильных оснований или чрезвычайно высоких температур. Известно, что такие условия повреждают ДНК, а потому могут привести к сбою в работе тест-системы FISH.
- Для идентификации областей-мишеней необходимо выполнять окраску гематоксилин-эозином каждое 10-е предметное стекло в рамках одного и того же тканевого блока.
- Правильное хранение компонентов набора крайне важно для обеспечения указанного на этикетке срока службы.
- Если рабочие реагенты выпадают в осадок или становятся мутными, их следует утилизировать и подготовить свежие растворы.
- При воздействии света флуорофоры подвергаются фотообесцвечиванию. С целью ограничения такого ухудшения со всеми содержащими флуорофоры растворами и предметными стеклами следует работать при приглушенном свете.
- Для измерения температуры растворов, водяных ванн и инкубаторов требуются откалиброванные термометры.
- Всегда проверяйте температуру предварительных растворов и промывочных буферов перед каждым использованием путем измерения температуры раствора в сосуде Коплина откалиброванным термометром.
- Все опасные материалы следует утилизировать в соответствии с нормативами конкретного учреждения по утилизации опасных материалов.
- Использование наборов или реагентов по истечении указанных на этикетках наборов или реагентов дат запрещено.
- Несоблюдение процедур по денатурации предметных стекол, гибридизации и обнаружению может привести к получению ошибочных и неприемлемых результатов.
- Использование иных реагентов, кроме тех, что предоставлены Abbott Molecular, может негативно влиять на условия гибридизации.

МАТЕРИАЛЫ

Поставляемые материалы

- Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit, кат. № 08N29-021 (10 тест-систем)

Требуемые, но не поставляемые материалы

- Универсальный набор реагентов для предварительной обработки и промывки FFPE тканей Vysis IntelliFISH (кат. № 08N85-085)
- Универсальный набор протеазы для предварительной обработки FFPE тканей Vysis IntelliFISH (75 мг) (кат. № 08N85-083)
- Универсальный набор протеазы для предварительной обработки FFPE тканей Vysis IntelliFISH (750 мг) (кат. № 08N85-084)
- Буфер гибридизации Vysis IntelliFISH: кат. № 08N87-010 (1 пробирка на набор) или
- Буфер гибридизации Vysis IntelliFISH: кат. № 08N87-015 (5 пробирок на набор)
- Vysis IntelliFISH DAPI I Контрастный краситель для образцов FFPE (кат. № 09N54-010)

Лабораторные реагенты

- Окраска гематоксилин-эозином (H&E)
- Hemo-De или ксилол
- Этанол 100 % или обезвоживатель 100 %
- Очищенная вода
- Резиновый клей
- Иммерсионное масло, подходящее для флуоресцентной микроскопии

Лабораторное оборудование и принадлежности

- Статичные или циркулирующие водяные ванны (37 ºC)
- Покровное стекло 24 мм x 30 мм
- Покровное стекло 22 мм x 22 мм
- Положительно заряженные микроскопные предметные стекла
- Откалиброванные микролитровые пипеточные дозаторы объемом от 1 до 20 мкл
- Наконечники микролитровых пипеточных дозаторов объемом от 1 до 20 мкл (стерильные)
- Микротом
- Таймер
- Микроцентрифуга
- Вортекс
- Пинцет
- Скрайбер с алмазным наконечником (или эквивалент)
- Стеклянные сосуды Коплина 50 мл
- Градуированные цилиндры (от 100 мл до 1000 мл)
- Флуоресцентный микроскоп с рекомендуемыми фильтрами
- Откалиброванный термометр
- Платформа ThermoBrite®
- Карточки-индикаторы влажности ThermoBrite®

Дополнительные реагенты / лабораторные материалы для протокола ручного анализа

- Циркулирующие водяные ванны (73 ˚C и 80 ˚C)

ПРИМЕЧАНИЕ: Статичные водяные ванны не обеспечивают надлежащего контроля высоких температур

Дополнительные реагенты / лабораторные материалы для протокола автоматического анализа (VP 2000)

- Процессор VP 2000

Оборудование и принадлежности для микроскопа

Микроскоп

Для просмотра результатов гибридизации требуется эпи-флуоресцентный микроскоп. Необходимо проверять микроскоп на предмет правильности его работы для обеспечения оптимального просмотра образцов при анализе FISH. Микроскоп, применяемый с общими средствами для окрашивания ДНК, такими как DAPI, йодид пропидия и хинокрин, может не подойти для анализов FISH. Рекомендуется регулярная очистка и периодическое техническое обслуживание микроскопа техническим специалистом производителя, в особенности регулировка ртутной лампы.

Источник света возбуждения

Рекомендуемым источником возбуждения является ртутная лампа 100 ватт или иная лампа аналогичной яркости. Необходимо обратиться к техническому специалисту производителя и подтвердить, что флуоресцентная система подходит для просмотра образцов для анализа FISH. Отмечайте количество часов эксплуатации лампы и замените лампу до истечения ее номинального срока службы. Обеспечьте правильную регулировку лампы.

Объективы

Используйте маслопогружные флуоресцентные объективы с числовой апертурой ≥ 0,75 при применении микроскопа с ртутной лампой 100 ватт или иной лампой аналогичной яркости и спектрального излучения. Масляный объектив 20X и 40X в сочетании с окулярами 10X подходит для общей оценки предметного стекла и выбора участков для регистрации. Для регистрации сигналов FISH удовлетворительные результаты можно получить при использовании маслопогружного ахроматического объектива 60X или 63X. Дополнительно при необходимости можно использовать маслопогружной ахроматический объектив 100X.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Иммерсионное масло

Иммерсионное масло, используемое с маслопогружными объективами, должно по составу подходить для низкой аутофлуоресценции и специально предназначаться для флуоресцентной микроскопии.

Фильтры микроскопа

Гибридизация зонда Vysis 6q22 ROS1 (Tel) SpectrumOrange на участке-мишени ДНК отмечается флуоресценцией оранжевым цветом.

Гибридизация зонда Vysis 6q22 ROS1 (Cen) SpectrumGreen на участке-мишени ДНК отмечается флуоресценцией зеленым цветом.

Докрашенные DAPI ядра флуоресцируют синим цветом.

Компания Abbott Molecular предлагает наборы однополосовых и двухполосовых фильтров, оптимизированные для применения с наборами зондов ДНК FISH, для большинства моделей микроскопов. Рекомендуемые фильтры для применения с Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit: двухполосовой Vysis (V2) – зеленый/оранжевый фильтр, однополосовой фильтр Vysis DAPI, однополосовой оранжевый фильтр Vysis и однополосовой зеленый фильтр Vysis.

ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Перед подготовкой образцов см. раздел **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ** настоящей инструкции.

Отбор и обработка образцов

Следующая процедура оптимизирована для использования с любыми FFPE образцами, такими как хирургические резекции, пункционные биопсии или клеточные осадки FFPE (например, тонкоигольные пунктаты). Необходимо избегать воздействия на образцы кислот, например декальцинирующих агентов, сильных оснований или чрезвычайно высоких температур. Известно, что такие условия повреждают ДНК, а потому могут привести к сбою в работе тест-системы FISH.

Используют зафиксированные в 10%-м забуференном нейтральном формалите образцы тканей, прошедшие надлежащую обработку и образующие наглядные тканевые срезы. Предпочтительное время фиксации для образцов тканей составляет 6–48 часов.

Подготовка предметного стекла FFPE образца

1. Выполните 2 или более последовательных парафиновых среза толщиной 5 ± 1 мкм с помощью микротома.
2. Опустите срезы в дистиллированную воду в бане с температурой 37-50 ˚C на период до 30 минут.
3. Установите срезы на положительно заряженные предметные стекла.
4. Позвольте предметному стеклу высохнуть естественным образом.
5. Выполните стандартную окраску гематоксилин-эозином 1 предметного стекла с образцом.

ПРИМЕЧАНИЕ: Препарат образца, использованный в процедуре исследования, должен состоять из 10 серийных срезов образца, окрашенного гематоксилин-эозином.

ПРИМЕЧАНИЕ: Этап 6 выполняет патолог.

6. Изучите и отметьте максимально возможный(-ые) участок(-и) опухоли на предметном стекле с окраской гематоксилин-эозином, исключая некротические участки, с помощью устойчивого к растворителю маркера или скрайбера с алмазным наконечником.
7. С помощью скрайбера перенесите отметку с предметного стекла с окраской гематоксилин-эозином на соответствующие участки неокрашенного предметного стекла, выполнив отметки на предметном стекле напротив среза ткани.
8. Храните подготовленные предметные стекла при температуре окружающей среды до сушки перед процедурой депарафинизации предметных стекол.
9. Перед запуском протоколов автоматического (VP 2000) или ручного анализов высушите неокрашенный образец в течение 2–24 часов при температуре 60 ˚C в ThermoBrite или воздушном инкубаторе / печи.

ОБРАБОТКА ПРЕДМЕТНОГО СТЕКЛА FFPE ОБРАЗЦА

ПРИМЕЧАНИЕ: Обработку предметных стекол можно осуществить с помощью полуавтоматического (VP 2000) протокола или ручного протокола

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКОЛ

A. ПРОЦЕДУРА ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКОЙ (VP 2000) ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ

ПРИМЕЧАНИЕ: При использовании протокола анализа VP 2000 за один запуск можно обработать максимум 50 предметных стекол (резервуар 500 мл).

10. Введите и/или подтвердите универсальный протокол предварительной обработки (**таблица 1)** в окне редактора протокола. Более подробно об использовании инструмента см. в «Руководстве по эксплуатации процессора Abbott VP 2000».

Таблица 1. Универсальный протокол предварительной обработки

Этап	Описание	Резервуар	Реагент	Время	Температура
1	Hemo-De[a]	**4**	Hemo-De[a]	5 мин	Окр. среды
2	Hemo-De[a]	**5**	Hemo-De[a]	5 мин	Окр. среды
3	Hemo-De[a]	**6**	Hemo-De[a]	5 мин	Окр. среды
4	100%-й этанол[b]	**7**	100%-й этанол[b]	1 мин	Окр. среды
5	100%-й этанол[b]	**8**	100%-й этанол[b]	1 мин	Окр. среды
6	Раствор SSC для предвар. обработки	**1**	Раствор SSC для предвар. обработки	25 мин[c]	80 °C
7	Очищенная вода	**9**	Очищенная вода	3 мин	Окр. среды
8	Протеазный буфер	**3**	Протеазный буфер	20 мин[d]	37 °C
9	Очищенная вода	**10**	Очищенная вода	3 мин	Окр. среды
10	70%-й этанол[b]	**12**	70%-й этанол[b]	1 мин	Окр. среды
11	85%-й этанол[b]	**13**	85%-й этанол[b]	1 мин	Окр. среды
12	100%-й этанол[b]	**14**	100%-й этанол[b]	1 мин	Окр. среды
13	Сушка воздухом	**Сушильная станция**	Сушка воздухом	5 мин	Окр. среды

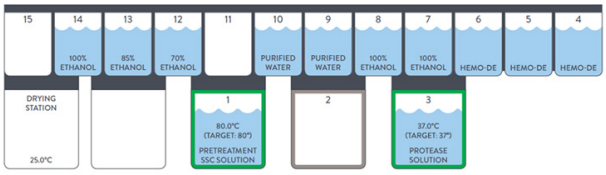
[a] Hemo-De можно заменить на ксилол

[b] Растворы этанола можно заменить на растворы обезвоживателя

[c] Допустимый диапазон времени инкубации для раствора SSC для предварительной обработки Vysis IntelliFISH составляет от 15 до 35 минут.

[c] Допустимый диапазон времени инкубации для раствора протеазы для предварительной обработки Vysis IntelliFISH составляет от 10 до 30 минут. Если повторный анализ требуется из-за недостаточной обработки тканей, увеличьте время обработки до 30 минут. Если повторный анализ требуется из-за избыточной обработки тканей, уменьшите время обработки до минимум 10 минут. Время обработки может варьироваться в зависимости от типа опухоли.

Рис. 1: Карта реагентов (пример)



11. Подготовьте рабочие реагенты для VP 2000

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Подготовка рабочих реагентов для предварительной обработки VP 2000

ПРИМЕЧАНИЕ: Расположение резервуаров с реагентами см. на карте реагентов (см. рис. 1).

Выбор объема резервуаров комнатной температуры и нагретых резервуаров, а также размеры стоек для предметных стекол в зависимости от количества тестируемых предметных стекол см. в **таблице 2**.

Таблица 2. Выбор объема резервуаров и размера стоек для предметных стекол

Количество предметных стекол	Объем резервуара	Размер стойки для предметных стекол
1–8	150 мл	Стойка на 8 предметных стекол
1–20	250 мл	Стойка на 20 предметных стекол
1–50	500 мл	Стойка на 50 предметных стекол

ПРИМЕЧАНИЕ: Для раствора SSC и раствора протеазы для предварительной обработки смотрите инструкции по подготовке реагентов для каждого размера резервуара в таблице 3.

Подготовка Hemo-De: Наполните резервуары 4, 5 и 6 Hemo-De. При неиспользовании накройте крышкой. Утилизируйте через 7 дней.

Подготовка раствора SSC для предварительной обработки: Добавьте раствор SSC Vysis IntelliFISH для предварительной обработки в резервуар 1. На экранной форме работы подтвердите достижение заданной температуры 80 ˚C перед предварительной обработкой предметных стекол. Утилизируйте через 1 день использования (максимум 2 запуска). Объем раствора SSC для предварительной обработки в зависимости от размера резервуара смотрите в **таблице 3**.

Подготовка раствора протеазы: Добавьте протеазный буфер Vysis IntelliFISH в резервуар 3. Добавьте протеазу Vysis IntelliFISH в резервуар 3. Ополосните флакон небольшим количеством протеазного буфера Vysis IntelliFISH и возвратите в резервуар 3. Загрузите резервуар 3 в VP 2000. Подождите минимум 1 час для промежуточного смешивания перед началом анализа. Визуально убедитесь, что протеаза растворилась (видимые частицы отсутствуют), и на экране работы подтвердите достижение заданной температуры 37 ˚C перед использованием. Утилизируйте раствор через 1 день использования (максимум 2 прохода). Объем раствора протеазы для предварительной обработки в зависимости от размера резервуара смотрите в **таблице 3**.

Таблица 3. Подготовка реагентов VP 2000

	Резервуар 150 мл (1–8 предметных стекол)	Резервуар 250 мл (1–20 предметных стекол)	Резервуар 500 мл (1–50 предметных стекол)
Раствор SSC Vysis IntelliFISH для предварительной обработки	отмерить 150 мл	1 X 250 мл Флакон	2 X 250 мл Флаконы
Протеазный буфер Vysis IntelliFISH	отмерить 150 мл	1 X 250 мл Флакон	2 X 250 мл Флаконы
Протеаза Vysis IntelliFISH (для 500 мл)	-------	---------	1 X 750 мг Флакон
Протеаза Vysis IntelliFISH (для 50 мл)	3 X 75 мг Флаконы	5 X 75 мг Флаконы	-------

Подготовка очищенной воды: Наполните резервуары 9 и 10 очищенной водой. Меняйте воду после каждого прохода.

Подготовка растворов этанола (70 %, 85 % и 100 %): Подготовьте растворы об/об (объем/объем) 70 % и 85 % с использованием 100%-го этанола (или обезвоживателя) и очищенной воды. При неиспользовании храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах.

Наполните резервуары 7, 8 и 14 100%-м этанолом (или обезвоживателем).

Наполните резервуар 12 70%-м этанолом (или обезвоживателем).

Наполните резервуар 13 85%-м этанолом (или обезвоживателем).

Растворы можно использовать в течение 1 недели. В случае испарения или разведения или помутнения раствора из-за чрезмерного использования утилизируйте растворы и подготовьте новые.

12. Добавьте предметные стекла с образцами и/или контрольные предметные стекла на стойку для предметных стекол VP 2000 и прикрепите стойку для предметных стекол к роботизированному манипулятору VP 2000. По достижении раствором SSC для предварительной обработки температуры 80 ˚C запустите протокол предварительной обработки VP 2000.
    - Используйте стойку на 8 предметных стекол с резервуаром 150 мл.
    - Используйте стойку на 20 предметных стекол с резервуаром 250 мл.
    - Используйте стойку на 50 предметных стекол с резервуаром 500 мл.
13. По завершении протокола предварительной обработки VP 2000 снимите стойку с предметными стеклами из VP 2000 и удалите предметные стекла из стойки.

ПРИМЕЧАНИЕ: Во время предварительной обработки VP 2000 подготовьте смесь зондов согласно разделу «Подготовка смеси зондов» настоящей инструкции по применению.

Перейдите к процедуре гибридизации

B. РУЧНАЯ ПРОЦЕДУРА ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ

Подготовка рабочих реагентов для ручного анализа:

Подготовка Hemo-De: Наполните 3 сосуда Коплина 50 мл Hemo-De (или ксилола). При неиспользовании накройте крышкой. Храните в вентилируемом помещении при температуре окружающей среды и утилизируйте через 7 дней.

Подготовка раствора для предварительной обработки: Наполните 1 сосуд Коплина 50 мл раствора SSC Vysis для предварительной обработки. Перенесите сосуд Коплина в циркулирующую водяную ванну при температуре окружающей среды и увеличьте температуру водяной ванны до 81 ± 2 ˚C (немного выше желаемой температуры внутри сосуда Коплина) перед депарафинизацией предметных стекол. Перед использованием убедитесь, что температура раствора достигла 80 ± 2 ˚C. Утилизируйте раствор через 1 день использования.

Подготовка раствора протеазы: Добавьте 1 флакон протеазы Vysis IntelliFISH (для 50 мл) в 1 флакон протеазного буфера Vysis IntelliFISH. Ополосните флакон небольшим количеством протеазного буфера Vysis IntelliFISH и возвратите в флакон протеазного буфера Vysis IntelliFISH. Закройте крышкой и аккуратно переверните несколько раз для смешивания. Перенесите подготовленный раствор в сосуд Коплина и поместите сосуд Коплина в водяную ванну при температуре 37 ˚C. Подождите минимум 1 час после смешивания для обеспечения растворения протеазы (отсутствия видимых частиц) и убедитесь, что температура буфера равняется 37 ± 1 ˚C, перед использованием. Утилизируйте раствор через 1 день.

Подготовка очищенной воды: Наполните 1 сосуд Коплина 50 мл очищенной воды. Используйте при температуре окружающей среды. Меняйте после каждого использования.

Подготовка растворов этанола (70 %, 85 % и 100 %) — Подготовьте раствор об/об (объем/объем) 70 % и 85 % с использованием 100%-го этанола (или обезвоживателя) и очищенной воды. При неиспользовании храните при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах. Растворы можно использовать в течение 1 недели при отсутствии испарения, разведения или помутнения раствора из-за чрезмерного использования.

Процедура депарафинизации предметных стекол

14. Погрузите предметные стекла в первый сосуд Коплина, содержащий Hemo-De, на 5 минут при температуре окружающей среды.

ПРИМЕЧАНИЕ: При необходимости в каждый слот сосуда Коплина можно поместить по 2 предметных стекла тыльной стороной друг к другу, а в каждый торцевой слот — по 1 предметному стеклу. Что касается предметных стекол в торцевых слотах, то сторона предметного стекла со срезом ткани должна быть обращена к центру сосуда, максимум по 8 предметных стекол на сосуд Коплина за раз.

15. Повторите этап 14 дважды, каждый раз с использованием свежего Hemo-De.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

16. Выполните обезвоживание предметных стекол в 100%-м этаноле (или обезвоживателе) в течение 1 минуты при температуре окружающей среды. Повторите во втором сосуде Коплина со 100%-м этанолом (или обезвоживателем).
17. Позвольте предметным стеклам естественным образом высохнуть в течение 2–5 минут (необязательно).

Предварительная обработка предметных стекол

18. Для предварительной обработки погрузите до 8 предметных стекол в раствор SSC Vysis IntelliFISH, предварительно нагретый до 80 ± 2 ˚C, на 25 ± 10 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: При необходимости в каждый слот сосуда Коплина можно поместить по 2 предметных стекла тыльной стороной друг к другу, а в каждый торцевой слот — по одному предметному стеклу. Что касается предметных стекол в торцевых слотах, то сторона предметного стекла со срезом ткани должна быть обращена к центру сосуда, максимум по 8 предметных стекол на сосуд Коплина за раз.

19. Погрузите предметные стекла в очищенную воду на 3 минуты.
20. Достаньте предметные стекла из очищенной воды. Удалите излишки воды, промокнув края предметных стекол бумажным полотенцем.
21. Погрузите предметные стекла в раствор протеазы, предварительно нагретый до 37 ± 1 ˚C, на 20 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Допустимый диапазон времени инкубации для раствора протеазы для предварительной обработки Vysis IntelliFISH составляет от 10 до 30 минут. Если повторный анализ требуется из-за недостаточной обработки тканей, увеличьте время обработки до 30 минут. Если повторный анализ требуется из-за избыточной обработки тканей, уменьшите время обработки до минимум 10 минут. Время обработки может варьироваться в зависимости от типа опухоли.

22. Погрузите предметные стекла в очищенную воду на 3 минуты.
23. Погрузите предметные стекла в 70%-й этанол (или обезвоживатель) на 1 минуту.
24. Погрузите предметные стекла в 85%-й этанол (или обезвоживатель) на 1 минуту.
25. Погрузите предметные стекла в 100%-й этанол (или обезвоживатель) на 1 минуту.
26. Высушите предметные стекла естественным образом в течение 2–5 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: Во время предварительной обработки подготовьте смесь зондов согласно разделу «Подготовка смеси зондов» настоящей инструкции по применению.

ПОДГОТОВКА СМЕСИ ЗОНДОВ

Подготовьте смесь зондов с помощью буфера гибридизации Vysis IntelliFISH
(кат. № 08N87-010 или 08N87-015).

27. Удалите буфер гибридизации Vysis IntelliFISH из хранилища с температурой -20 ˚C и доведите его до температуры окружающей среды. Тщательно перемешайте для обеспечения гомогенности буфера.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для снижения вязкости буфер можно предварительно нагреть до 37 ˚C.

28. Добавьте реагенты в центрифужную пробирку при температуре окружающей среды, как показано в **таблице 4**. В этой таблице перечислены значения объема на 1 мишень гибридизации. При подготовке мастер-микса для множества мишеней увеличьте объемы пропорциональным образом.

Таблица 4. Подготовка смеси зондов

Название реагента	Подготовка смеси зондов с использованием буфера гибридизации Vysis IntelliFISH (на 1 анализ)
Зонд Vysis 6q22 ROS1 (Cen) SpectrumGreen	1 мкл
Зонд Vysis 6q22 ROS1 (Tel) SpectrumOrange	1 мкл
Буфер гибридизации Vysis IntelliFISH (кат. № 08N87-010 или 08N87-015)	12 мкл
Очищенная вода	1 мкл
Общий объем	15 мкл

29. Центрифугируйте пробирку на 1–3 секунды.
30. Перемешайте и повторно центрифугируйте до гомогенности. Убедитесь в гомогенности раствора и отсутствии видимого расслаивания.

ПРИМЕЧАНИЕ: В случае неиспользования храните подготовленную смесь зондов при -20 ˚C в течение 1 рабочего дня.

Если зонд не используется для гибридизации сразу после подготовки смеси зондов, перемешайте и центрифугируйте до гомогенности перед применением зонда на предметных стеклах с образцами.

ПРОЦЕДУРА ГИБРИДИЗАЦИИ

ПРИМЕЧАНИЕ: На этапах денатурации и гибридизации необходимо использовать ThermoBrite. Более подробно об эксплуатации инструмента см. в «Руководстве оператора ThermoBrite».

31. Тщательно смочите карточки-индикаторы влажности водой и поместите в слоты под карточки ThermoBrite.
32. Убедитесь, что поверхность пластины ThermoBrite является чистой и свободной от загрязнений. При необходимости очистите поверхность для удаления остатков или частиц.
33. Установите температуру денатурации (Melt Temp), время денатурации (Melt Time), температуру гибридизации и время гибридизации (Hyb Time) согласно **таблице 5** ниже для смеси зондов в буфере гибридизации Vysis IntelliFISH.

Таблица 5. Установки Thermobrite

Смесь зондов	Температура со-денатурации	Время со-денатурации	Температура гибридизации	Время гибридизации
Буфер гибридизации смеси зондов Vysis IntelliFISH	73 ºC	5 минут	37 ºC	2 часа[a]

[a]Диапазон времени гибридизации зондов Vysis ROS1 Break Apart FISH в буфере гибридизации Vysis IntelliFISH составляет от 1 до 24 часов. Оптимальные результаты достигаются через 2 часа гибридизации.

34. В случае хранения смеси зондов в замороженном виде доведите смесь зондов до температуры окружающей среды, затем перемешайте с помощью вортекса и центрифугируйте в течение 2–3 секунд с помощью микроцентрифуги. Убедитесь в гомогенности раствора и отсутствии видимого расслоения.
35. Нанесите 15 мкл смеси зондов на каждую мишень гибридизации, затем сразу же нанесите покровное стекло 22 X 22 мм. Перед нанесением покровного стекла убедитесь в отсутствии в смеси зондов пузырьков воздуха.

ПРИМЕЧАНИЕ: Высыхание зондов на предметных стеклах перед нанесением покровного стекла может негативно отразиться на результатах анализа. Не помещайте предметные стекла на нагреватель или ThermoBrite при использовании зондов.

36. Герметизируйте края покровного стекла резиновым клеем. Убедитесь в герметичности всех краев покровного стекла.
37. Поместите предметные стекла на ThermoBrite и запустите программу гибридизации.
38. В конце периода гибридизации перейдите к процедуре промывки предметных стекол.

ПРИМЕЧАНИЕ: Оставьте предметные стекла на ThermoBrite до момента готовности к началу этапа удаления резинового клея в рамках процедуры промывки предметных стекол.

ПРОЦЕДУРА ПРОМЫВКИ ПОСЛЕ ГИБРИДИЗАЦИИ

А. ПРОЦЕДУРА ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКОЙ (VP 2000) ПРОМЫВКИ ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКОЛ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИМЕЧАНИЕ: Гибридизированные предметные стекла необходимо промыть в день завершения гибридизации.

39. Введите и/или подтвердите протокол промывки предметных стекол VP 2000 (**таблица 6**) в окне редактора протокола. Более подробно об использовании инструмента см. в «Руководстве по эксплуатации процессора Abbott VP 2000».

ПРИМЕЧАНИЕ: Начните нагрев VP 2000 приблизительно за 45–60 минут до завершения этапа гибридизации, чтобы у промывочного буфера гибридизации было достаточно времени для достижения заданной температуры.

Таблица 6. Протокол промывки предметных стекол VP 2000

Этап	Описание	Резервуар	Реагент	Время	Температура
1	Буфер промывки после гибридизации Vysis IntelliFISH	**1**	Буфер промывки после гибридизации Vysis IntelliFISH	3 мин	73 ºC
2	Сушка воздухом	**Сушильная станция**	-----	5 мин	Окр. среды

ПРИМЕЧАНИЕ: Откройте протокол промывки предметных стекол VP 2000 ПЕРЕД использованием

40. Добавьте буфер промывки после гибридизации Vysis IntelliFISH в резервуар 1 (нагретый). Добавьте соответствующий объем в зависимости от размера резервуара **(таблица 7**). На экранной форме работы подтвердите достижение заданной температуры 73 ˚C перед началом промывки. Утилизируйте раствор через 1 день использования (максимум 2 прохода).

Таблица 7. Объемы реагентов при промывке

Реагент	Резервуар 150 мл (1–8 предметных стекол)	Резервуар 250 мл (1–20 предметных стекол)	Резервуар 500 мл (1–50 предметных стекол)
Буфер промывки после гибридизации Vysis IntelliFISH	отмерить 150 мл	1 X 250 мл Флакон	2 X 250 мл Флакон

41. Налейте 50 мл буфера промывки после гибридизации Vysis IntelliFISH в один или несколько сосудов Коплина. Используйте при температуре окружающей среды. Утилизируйте раствор через 1 день использования.
42. По достижении буфером промывки после гибридизации в VP 2000 температуры 73 ˚C удалите резиновый клей с предметного стекла (стекол), минимально воздействуя на покровное стекло, и погрузите предметное(-ые) стекло(-а) в буфер промывки после гибридизации Vysis IntelliFISH при температуре окружающей среды. Подождите 2–10 минут, пока покровные стекла не отойдут от предметных стекол. Убедитесь, что все покровные стекла отошли от предметных; при необходимости аккуратно удалите покровные стекла. После того, как покровные стекла со всех предметных стекол в сосуде Коплина отошли или были удалены, немедленно переходите к следующему этапу.

ПРИМЕЧАНИЕ: На этом этапе предметные стекла можно поместить в сосуд Коплина парами, тыльной стороной друг к другу; общее количество может составлять до 8 предметных стекол.

43. Вставьте предметные стекла в стойку для предметных стекол VP 2000.

ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что остатки резинового клея тщательно удалены с тыльной и передней сторон предметных стекол перед загрузкой в стойку для предметных стекол.

44. Немедленно присоедините стойку для предметных стекол к роботизированному манипулятору VP 2000 и запустите протокол промывки предметных стекол VP 2000.

ПРИМЕЧАНИЕ: Минимизируйте время нахождения предметных стекол вне раствора. Высыхание предметных стекол между удалением покровных стекол и промывкой при температуре 73 ˚C может отрицательно сказаться на работе тест-системы.

45. По завершении протокола промывки предметных стекол VP 2000 снимите стойку с предметными стеклами из VP 2000 и удалите предметные стекла из стойки.
46. Переходите к **процедуре контрастного окрашивания.**

B. ПРОЦЕДУРА РУЧНОЙ ПРОМЫВКИ ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКОЛ

ПРИМЕЧАНИЕ: Гибридизированные предметные стекла необходимо промыть в день завершения гибридизации.

47. Залейте 50 мл буфера промывки после гибридизации Vysis IntelliFISH в сосуд Коплина. Используйте при температуре окружающей среды. Используйте раствор в течение 1 дня, затем утилизируйте.
48. Залейте 50 мл буфера промывки после гибридизации Vysis IntelliFISH в дополнительный сосуд Коплина. Поместите сосуд Коплина в водяную ванну при температуре окружающей среды перед нагреванием во избежание поломки сосуда. Перед использованием нагревайте сосуд до 73 ± 1 ˚C в течение минимум 30 минут. Используйте раствор в течение 1 дня, затем утилизируйте.
49. Удалите резиновый клей с одного препарата, минимально воздействуя на покровное стекло, и погрузите предметное стекло в буфер промывки после гибридизации Vysis IntelliFISH при температуре окружающей среды. Повторите процедуру с другими предметными стеклами и оставьте их на 2–10 минут, чтобы покровные стекла отошли от предметных стекол. При необходимости аккуратно удалите покровные стекла.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для поддержания надлежащей температуры буфера промывки после гибридизации Vysis IntelliFISH выполняйте промывку только 4 предметных стекол одновременно. Если количество предметных стекол менее 4, добавьте пустые предметные стекла, чтобы довести общее количество до 4. Начните отсчет времени после погружения четвертого предметного стекла.

50. Немедленно погрузите предметное стекло в буфер промывки после гибридизации Vysis IntelliFISH при 73 ± 1 ˚C. Мягко перемешивайте в течение 1–3 секунд. Повторите с другими предметными стеклами.
51. Удалите предметные стекла через 3 минуты.

ПРИМЕЧАНИЕ: Перед промывкой следующих 4 предметных стекол убедитесь, что температура буфера промывки после гибридизации Vysis IntelliFISH вновь достигла 73 ± 1 ˚C.

ПРИМЕЧАНИЕ: В качестве эквивалента допускается применение набора для пробоподготовки Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer kit (кат. № 01N31-005) в соответствии с инструкцией по применению к набору Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer Kit.

ПРОЦЕДУРА КОНТРАСТНОГО ОКРАШИВАНИЯ

52. Высушите предметное(-ые) стекло(-а) естественным образом, защищая от света, при температуре окружающей среды.
53. Растопите контрастный краситель DAPI I при температуре окружающей среды, затем аккуратно перемешайте с помощью вортекса и центрифугируйте в течение 2–3 секунд с помощью микроцентрифуги. Нанесите 10 мкл контрастного красителя DAPI I на участок-мишень предметного стекла, поместите покровное стекло и храните в защищенном от света месте в течение минимум 5 минут.
54. Выполните оценку предметного стекла в течение 24 часов или храните при -20 ˚C (±10 ˚C).

Процедура архивирования (необязательно)

Храните гибридизированные предметные стекла при -20 ˚C (±10 ˚C) в защищенном от света месте.

В таких условиях предметные стекла могут храниться до 3 недель после нанесения контрастного красителя DAPI I без существенных потерь в интенсивности флуоресцентного сигнала.

ПРИМЕЧАНИЕ: Перед оценкой доведите предметные стекла до температуры окружающей среды.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОЦЕДУРА ОЦЕНКИ ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКОЛ

Оценку предметных стекол выполняют с использованием отвечающего требованиям фильтра, установленного на оптимально функционирующий флуоресцентный микроскоп (см. **«Оборудование и принадлежности для микроскопа»** в разделе **«Требуемые, но не поставляемые материалы»**).

Определите место рассмотрения области-мишени

55. Используйте препарат,окрашенный гематоксилин-зозином, для подтверждения области-мишени.
56. Определите и изучите отмеченный скрайбером участок опухоли с помощью объектива 10-20X и полосно-пропускающего фильтра DAPI.
57. Используйте объектив 40X-63X и полосно-пропускающий фильтр DAPI для определения нужного гибридизированного участка и изучите морфологию ткани. Избегайте некротических участков и участков с размытыми ядерными границами. Не рассматривайте ядра с недостаточным для определения границ контрастным окрашиванием..

Оценка адекватности и качества гибридизации предметных стекол с образцами

58. Используйте объектив 40X-63X и предписанные фильтры для сканирования всей отмеченной скрайбером зоны, переключаясь между DAPI, оранжевым и зеленым фильтрами для изучения качества сигналов ROS1 FISH. Настройте фокус и ознакомьтесь с размером и формой сигналов мишени и помехами (дебрис). Убедитесь, что фон предметного стекла отображается темным цветом, и на нем в значительной степени отсутствуют флуоресцирующие помехи, которые могут затруднить оценку.
59. Оцените адекватность предметного стекла по следующим критериям:

Некроз тканей: Образцы с обширным некрозом тканей (недостаток доступных для оценки клеток) следует отбраковать с проведением повторного анализа на дополнительном срезе.

Морфология ядра: Границы ядер опухоли, наблюдаемые благодаря DAPI, в целом должны быть различимыми, а ядра должны демонстрировать достаточную целостность.

Фон: Фон не должен содержать мешающих оценке частиц.

ПРИМЕЧАНИЕ: За пределами ядер может наблюдаться флуоресцентная дымка / флуоресцентное свечение, однако если флуоресцентная дымка / флуоресцентное свечение не закрывает ядра и не затрудняет оценку, это считается приемлемым.

Интенсивность сигнала зонда: Сигналы должны быть яркими, четкими и с легкостью оцениваемыми. Чрезмерно рассеянных сигналов следует избегать.

Этим критериям качества должна соответствовать большая часть просматриваемого участка-мишени.

Просматриваемый участок-мишень должен содержать минимум 50 оцениваемых клеток.

Если критерии адекватности и качества гибридизации предметного стекла с образцом не выполнены, образец помечают как неинформативный. Для предметного стекла с неинформативным образцом необходимо запросить дополнительные предметные стекла для повторного анализа.

Выбор и регистрация клеток на участке-мишени

60. Оценка всего участка-мишени

61. Выберите области с хорошей морфологией опухоли и хорошим распределением ядер (т. е. области, в которых можно различить отдельные ядра).
62. Отметьте распределение сигнала между клетками опухоли. Выберите репрезентативные области для регистрации следующим образом:
    - Определите область(-и) с наибольшим числом клеток опухоли с явно положительными сигналами ROS1. Выберите эту(-и) область(-и) в качестве репрезентативной(-ых) области(-ей) для регистрации.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для уменьшения числа ложноположительных результатов не следует сканировать весь срез на предмет отдельных положительных клеток. Небольшое количество ядер с явно положительным сигнальным паттерном, как правило, присутствует в отрицательных образцах из-за усечения ядер и/или хроматиновой структуры. Поэтому при оценке двух или менее отдельных положительных клеток на поле зрения (FOV) объектива 63X следует соблюдать осторожность.

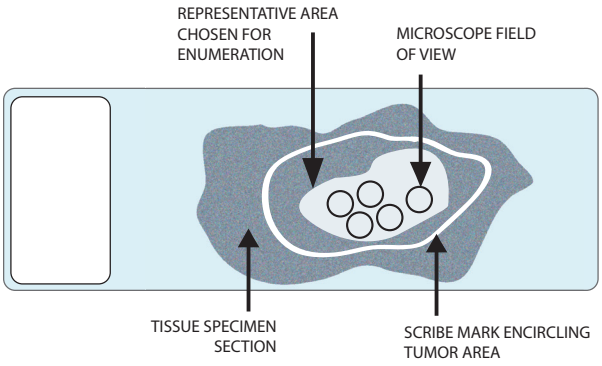
- При отсутствии областей, содержащих более одной клетки опухоли с явно положительными сигналами ROS1, выберите область(-и) с хорошей морфологией клеток опухоли и высоким качеством сигнала в качестве репрезентативных областей для регистрации.
- Выберите области с высоким, в целом, качеством (т. е. сигналы яркие, четкие и с легкостью подлежащие оценке) как для оранжевых, так и для зеленых сигналов.

ПРИМЕЧАНИЕ: Определение положительных и отрицательных сигналов ROS1 FISH см. на рис. 3.

63. В пределах выбранных для регистрации репрезентативных областей используйте объектив 63X-100X и предписанные оранжевые и зеленые фильтры для выбора приблизительно 5 микроскопических полей зрения (FOV) и выполните регистрацию клеток в каждом FOV (**рис. 2**).
64. Выполните регистрацию в среднем 10 клеток в каждом поле зрения.
65. В пределах каждого поля зрения выполните регистрацию клеток с репрезентативными сигнальными паттернами и отметьте сигналы для каждой зарегистрированной клетки. В областях с клетками опухоли с явно положительными сигналами ROS1 выполните регистрацию репрезентативных по положительному сигнальному паттерну клеток опухоли (**рис. 2**). После регистрации всех клеток с положительными сигнальными паттернами ROS1 в FOV выполните регистрацию клеток с отрицательными сигнальными паттернами ROS1 общим числом приблизительно 10 клеток.

ПРИМЕЧАНИЕ: Диаметр диафрагмы осветителя микроскопа может быть сужен до диаметра интересующих вас клеток, чтобы облегчить регистрацию.

Рисунок 2. Оценка участка-мишени



66. Если клетки опухоли с явно положительными сигналами ROS1 не обнаружены, выберите клетки опухоли с репрезентативной для оцениваемого образца морфологией.
67. Остановитесь после регистрации 50 выбранных из репрезентативной(-ых) области(-ей) клеток.

ПРИМЕЧАНИЕ: При выборе клеток для регистрации:

- Убедитесь, что ядерная граница четко видна и что ядра не перекрывают друг друга.
- Избегайте клеток, которые кажутся поврежденными или необычно мелкими по сравнению с другими клетками в поле зрения.
- Увеличивайте и уменьшайте фокус для обнаружения всех присутствующих в ядре сигналов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Правила суммирования сигналов

- Клетки с 2 или более зелеными сигналами при отсутствии оранжевых или смешанных оранжевых/зеленых сигналов можно регистрировать, если окружающие клетки в FOV имеют легко оцениваемые оранжевые сигналы. Клетки с 1 зеленым сигналом при отсутствии оранжевых или смешанных оранжевых/зеленых сигналов не подлежат регистрации.
- Клетки только с оранжевыми сигналами при отсутствии зеленых или смешанных оранжевых/зеленых сигналов не подлежат регистрации.
- При оценке разделения сигналов в пределах заданного ядра в качестве меры диаметра сигнала следует использовать больший сигнал в сигнальной паре.
- Выполните регистрацию сигналов в пределах ядерной границы каждой выбранной интерфазной клетки опухоли. Избегайте клеток с сигналами, расположенными на самом краю, либо за пределами ядерной границы.

Диспозиция клеток в соответствии с инструкциями на **рис. 3**.

Клетки считаются отрицательными (не реаранжированными), если:

- Зеленые и оранжевые сигналы являются смежными или смешанными (отображаются желтым цветом под фильтром Green/Orange V2). Оранжевые и зеленые сигналы, расходящиеся менее чем на 1 диаметр сигнала, считаются единым смешанным сигналом (**рис. 3, панель 1**).

ПРИМЕЧАНИЕ: В зависимости от конкретной опухоли и состояния геномной ДНК на момент фиксации смешанный сигнал может проявиться либо в виде непосредственно прилегающих друг к другу оранжевого и зелёного сигналов, либо в виде единого желтого сигнала. Пары оранжевых/зеленых сигналов иногда будут отображаться в немного разделенном виде из-за вторичной структуры геномной ДНК. В некоторых типах опухолей сигналы могут быть больше и более рассеянными, чем в других типах опухолей.

- Имеется единичный оранжевый сигнал без соответствующего зеленого сигнала в дополнение к смешанным и/или разделенным сигналам **(рис. 3, панель 1**).

Клетки считаются положительными (реаранжированными), если:

- Минимум 1 набор зеленых и оранжевых сигналов разделен более чем на 1 диаметр сигнала или более (**рис. 3, панель 2**).
- Имеется единичный зеленый сигнал без соответствующего оранжевого сигнала в дополнение к смешанным и/или разделенным сигналам (**рис. 3, панель 2**)
- 2 или более отдельных зеленых сигнала при отсутствии оранжевых или смешанных оранжевых/зеленых сигналов, если окружающие клетки в FOV имеют легко оцениваемые оранжевые сигналы.

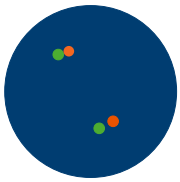
Рисунок 3. Руководство по регистрации сигналов ROS1

● Отдельный оранжевый сигнал
● Отдельный зеленый сигнал
● Примыкающие друг к другу или смешанные оранжевые и зеленые сигналы

Нереаранжированные отрицательные сигнальные паттерны

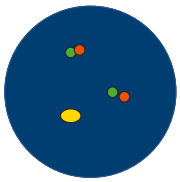
Панель 1: Смежные или смешанные оранжевые и зеленые сигналы

1A



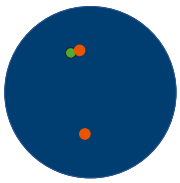
1A и 1B. На этих примерах показаны наслоившиеся оранжевые и зеленые сигналы. Сигналы либо перекрываются (отображаются как желтый сигнал), либо примыкают друг к другу с разделением менее чем на 1 диаметр сигнала.

1B



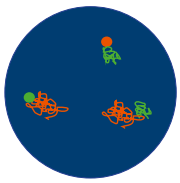
ПРИМЕЧАНИЕ: В одном ядре может наблюдаться множество смешанных и/или разделенных сигналов.

1C



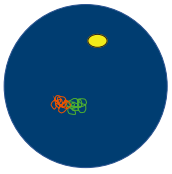
1C. Отдельный оранжевый сигнал без соответствующего зеленого сигнала в дополнение к смешанным сигналам и/или смежным сигналам (сигналам, разделенным менее чем на 1 диаметр сигнала) обозначает делецию зеленого участка зонда ROS1 и считается отрицательным.

1D



1D и 1E. Рассеянные сигналы могут иметь неясную, удлиненную или волокнистую ДНК и должны регистрироваться как отдельный сигнал. Если рассеянные сигналы являются смежными (разделены менее чем на 1 диаметр сигнала) или соединены волокном, их следует регистрировать как смешанный сигнал.

1E



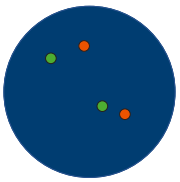
ПРИМЕЧАНИЕ: Ядра, для которых наблюдается менее 2 сигналов только одного цвета, не подлежат регистрации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Реаранжированные положительные сигнальные паттерны

Панель 2: Разделенные сигналы или удаленный оранжевый сигнал

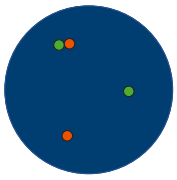
2A



Эти ядра содержат реаранжированные или «разделенные» сигналы, т. е. сигналы на расстоянии, превышающем диаметр 1 сигнала. Выполните оценку разделения с помощью среднего размера сигнала.

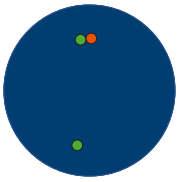
2A. Ядро может содержать более одного набора разделенных сигналов.

2B



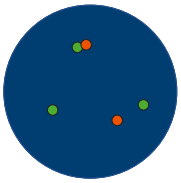
2B. Ядро может содержать смешанный(-ые) сигнал(-ы) и разделенный(-ые) сигнал(-ы).

2C



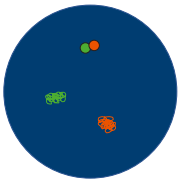
2C. Ядро может содержать отдельный зеленый сигнал (с удаленным оранжевым сигналом) в дополнение к смешанному(-ым) и/или разделенному(-ым) сигналу(-ам).

2D



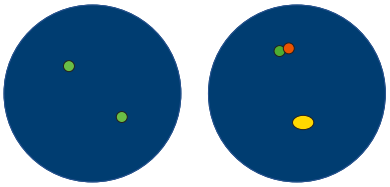
2D. Одно и то же ядро может содержать смешанные сигналы, разделенные сигналы и делеции.

2E



2E. Ядро может содержать рассеянные зеленые и оранжевые сигналы на расстоянии более одного диаметра сигнала друг от друга.

2F



2F. Ядро может содержать 2 или более отдельных зеленых сигналов и ни одного оранжевого сигнала несмотря на наличие в окружающих ядрах как зеленых, так и оранжевых сигналов.

ПРИМЕЧАНИЕ: Ядро с 1 отдельным зеленым сигналом не подлежит регистрации; ядро только с оранжевыми сигналами также не подлежит регистрации.

Зарегистрируйте сигнальные паттерны минимум для 50 ядер.

- Для каждого ядра отметьте количество смешанных (смежных) сигналов.
- Для каждого ядра отметьте количество отдельных оранжевых сигналов.
- Для каждого ядра отметьте количество отдельных зеленых сигналов.
- Отдельную клетку считают только один раз, независимо от количества содержащихся в ней реаранжировок и/или делеций.
- Клетки с 2 или более зелеными сигналами (при отсутствии смешанных и/или разделенных сигналов) можно регистрировать, если окружающие клетки содержат четкие оранжевые сигналы (отдельные или входящие в смешанный сигнал).

Следующие ядра не подлежат регистрации:

- Без сигналов (зеленых или оранжевых).
- Только с оранжевыми сигналами.
- Содержащие менее 2 сигналов зеленого цвета (без смешанного и/или разделенного сигнала).
- При наличии в ядре слабых или чрезмерно рассеянных сигналов.

ПРИМЕЧАНИЕ: В литературе установлено предельное значение в 15 % реаранжированных клеток ROS1 с привлечением второго специалиста для неоднозначных образцов,[8,9,18,25–29] однако каждая лаборатория должна установить свое собственное предельное значение в зависимости от области применения.

Руководство по диагностике и устранению неисправностей приводится в **приложении A.**

ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

- **ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO**
- Оптимальная работа тест-системы требует правильного обращения, подготовки и хранения образцов, как описывается в настоящей инструкции по применению.
- Система Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit оптимизирована только для определения и регистрации перестроек гена ROS1 в зафиксированных в формалине и залитых парафином (FFPE) образцах. Анализ необходимо проводить только на человеческих тканях в 10%-м забуференном нейтральном формалине. Использование других типов образцов или фиксаторов не допускается.
- Рабочие характеристики системы Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit была установлена с использованием процедур, приведенных исключительно в данной инструкции по применению. Изменения этих процедур могут привести к изменению рабочих характеристик системы.
- Клиническую интерпретацию результатов анализа следует оценивать в контексте истории болезни пациента и результатов других диагностических лабораторных анализов.
- В случае ненадлежащего качества и/или подготовки образца результаты анализа FISH могут быть неинформативными.
- Специалисты, выполняющие регистрацию сигналов FISH, должны быть в состоянии визуально различать оранжевые, зеленые и желтые сигналы.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Локализация зондов на метафазных хромосомах

Место гибридизации зондов в Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit оценивали на метафазных пластинках (всего 5) из культурированных лимфоцитных препаратов на предметных стеклах с использованием технологии инвертированного ДАПИ-дифференциального окрашивания хромосом.

Зонд 6q22 ROS1 (Cen) SpectrumGreen и зонд 6q22 ROS1 (Tel) SpectrumOrange, компоненты системы Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit, продемонстрировали гибридизацию в целевом локусе (6q22) на 5 метафазных пластинках, без гибридизации в других локациях.

Аналитическая чувствительность и специфичность

Аналитическая чувствительность определяется как процент хромосомных

мишеней с ожидаемым нормальным сигнальным паттерном. Аналитическая специфичность определяется как процент сигналов с гибридизацией в правильном локусе без гибридизации в других локациях.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Аналитическая чувствительность и аналитическая специфичность зонда 6q22 ROS1 (Cen) SpectrumGreen и зонда 6q22 ROS1 (Tel) SpectrumOrange, являющихся компонентами системы Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit, оценивали с использованием метафазных хромосом, подготовленных из 5 периферийных гемокультур кариотипически нормальных образцов от 5 отдельных доноров (5 групп предметных стекол). Всего выполнена оценка 100 метафазных пластинок (по 20 на донора).

Для расчета аналитической чувствительности сигналы для зонда 6q22 ROS1(Cen) SpectrumGreen (ROS1 (Cen) SG) и зонда 6q22 ROS1 (Tel) SpectrumOrange (ROS1 (Tel) SO) регистрировали для каждой метафазной пластинки (норма = 2 сигнала). Всего для каждого зонда ожидалось 200 сигналов (2 сигнала на клетку × 20 метафазных пластинок на группу × 5 групп предметных стекол).

Для расчета аналитической специфичности регистрировали количество метафазных

пластинок с ожидаемым сигнальным паттерном. Всего выполнена оценка 100

метафазных пластинок (20 метафазных пластинок × 5 групп предметных стекол). Для каждого зонда расчетная аналитическая чувствительность составила 100 % (200/200)(95 % CI 98 % – 100 %) **(таблица 8)**, а расчетная аналитическая специфичность составила 100 % (100/100)(95 % CI 96 % – 100 %) (**таблица 9**).

Таблица 8. Аналитическая чувствительность

	Кол-во метафазных хромосомных сигналов		Чувствительность	
Зонд	Итого истинно положительных	Итого ожидаемых	Точечная оценка (%)	95 % CI (%)
ROS1 (Cen) SG	200	200	100	(98, 100)
ROS1 (Tel) SO	200	200	100	(98, 100)

Таблица 9. Аналитическая специфичность

	Кол-во метафазных хромосомных пластинок		Специфичность	
Зонд	Итого ложноположительных	Итого пластинок	Точечная оценка (%)	95 % CI (%)
ROS1 (Cen) SG	0	100	100	(96, 100)
ROS1 (Tel) SO	0	100	100	(96, 100)

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Uguen A, De Braekeleer M. ROS1 fusions in cancer: a review. Future Oncol. 2016;12(16):1911-1928.
2. Pal P, Khan Z. ROS1 [corrected]. J Clin Pathol. 2017;70(12):1001-1009.
3. Bergethon K., Shaw A.T., Ou S.I., et al. ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. J Clin Oncol. 2012;30(8):863-870.
4. Bubendorf L. Büttner R., Al-Dayel, F., et al. Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. Virchows Arch. 2016;469:489-503.
5. Pietrantonio F, Di Nicolantonio F, Schrock AB, et. al. ALK, ROS1, and NTRK Rearrangements in Metastatic Colorectal Cancer. J Natl Cancer Inst. 2017;109(12):djx089
6. Aisner DL, Nguyen TT, Paskulin DD, Le AT, at. al. ROS1 and ALK fusions in colorectal cancer, with evidence of intratumoral heterogeneity for molecular drivers. Mol Cancer Res. 2014;12(1):111-118.
7. Davies, K.D. and Doebele, R.C. Molecular Pathways - ROS1 Fusion Proteins in Cancer. Clin Cancer Res. 2013;19(15):4040–4045.
8. McCoach, C.E, Le, A.T., Gowan, K., et al. Resistance mechanisms to Targeted Therapies in ROS1+ and ALK+ Non-small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res. 2018;24(14):3334-3347.
9. Lee J, Lee SE, Kang SY, et. al. Identification of ROS1 rearrangement in gastric adenocarcinoma. Cancer. 2013;119(9):1627-1635.
10. Turner J, Couts K, Sheren J, Saichaemchan S, et. al. Kinase gene fusions in defined subsets of melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. 2017;30(1):53-62.
11. Couts KL, McCoach CE, Murphy D, et. al. Acral Lentiginous Melanoma Harboring a ROS1 Gene Fusion with Clinical Response to Entrectinib. JCO Precision Oncology. 2017;2017(1):1-7.
12. Lovly CM, Gupta A, Lipson D, Otto G, Brennan T, et. al. Inflammatory myofibroblastic tumors harbor multiple potentially actionable kinase fusions. Cancer Discov. 2014;4(8):889-895.
13. Giacomini CP, Sun S, Varma S, Shain AH, et.al. Breakpoint analysis of transcriptional and genomic profiles uncovers novel gene fusions spanning multiple human cancer types. PLoS Genet. 2013;9(4):e1003464.
14. Du Z, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. Mol Cancer. 2018;17(1):58.
15. Lange AM, Lo HW. Inhibiting TRK Proteins in Clinical Cancer Therapy. Cancers (Basel). 2018;10(4):E105.
16. Lin J.J. and Shaw A.T. Recent Advances in Targeting ROS1 in Lung Cancer. J. Thoracic Oncol. 2017;12(11):1611-1625.
17. Shaw A.T, Felip E., Bauer T.M., et al. Lorlatinib in ALK – or ROS1-rearranged non-small cell lung cancer: an international, multicenter, open-label phase 1 trial. Lancet Oncol. 2017;18(12):1590-1599.
18. Lim S.M., Kim H.R., Lee L.S., et al. Open-label, multicenter, phase II study of cerifinib in patients with non-small-cell lung cancer harboring ROS1 rearrangement. Journal of Clinical Oncology. 2017; 35(23):2613-2618.
19. Dong J., Li B., Lin D., et al. Advances in Targeted Therapy and Immunotherapy for non-small cell lung cancer based on accurate molecular typing. Front Pharmacol. 2019;10:230.
20. Shaw A.T., Riely G.J., Bang Y.-J., et al. Crizotinib in ROS1-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): updated results including overall survival, from PROFILE 1001. Ann Oncol. 2019;30(7):1121-1126.
21. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. Verfügbar unter: http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm. Abgerufen am 19. Februar 2020
22. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030, Bloodborne Pathogens.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline - Fourth Edition. CLSI Document M29-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
24. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
25. Bozzetti C, Nizzoli R, Tiseo M., et al. ALK and ROS1 rearrangements tested by fluorescence in situ hybridization in cytological smears from advanced non-small cell lung cancer patients. Diagn Cytopathol. 2015;43(11):941-946.
26. Davies KD.,Le AT, Theodoro MF., et.al. Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2012;18(17):4570-4579.
27. Selinger CI, Li BT, Pavkalis N, et.al., Screening for ROS1 gene rearrangements in non-small-cell lung cancers using immunohistochemistry with FISH confirmation is an effective method to identify this rare target. Histopathology. 2017;70(3):402-411.
28. Shan L, Lian F, Guo L, et. al., Detection of ROS1 gene rearrangement in lung adenocarcinoma: comparison of IHC, FISH and real-time RT-PCR. PLoS One. 2015;10(3):e0120422.

Lee J, Park CK, Yoon HK, et al., PD-L1 expression in ROS1-rearranged non-small cell lung cancer: A study using simultaneous genotypic screening of EGFR, ALK, and ROS1. Thorac Cancer. 2019;10(1):103-110.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Для получения технической поддержки обращайтесь в Службу сервисной поддержки Abbott Molecular по телефону +1-800-553-7042 в США или +49-6122-580 за пределами США, либо посетите веб-сайт Abbott Molecular http://www.abbottmolecular.com.

Abbott Molecular является законным производителем системы Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit.

В Европейский Союз система Vysis ROS1 Break Apart FISH Probe Kit импортируется компанией Abbott Diagnostics GmbH, расположенной по адресу Max-Planck-Ring 2, 65205 Wiesbaden, Germany (Германия).

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany

© 2020 Abbott. Все права защищены.
Vysis и IntelliFISH являются торговыми марками компании Abbott. Все другие торговые марки являются собственностью своих владельцев.

www.abbottmolecular.com

Июнь 2020 г

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ A. РУКОВОДСТВО ПО ДИАГНОСТИКЕ И УСТРАНЕНИЮ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

При оценке результатов анализа FISH убедитесь, что микроскоп правильно установлен и функционирует надлежащим образом.

В следующей таблице приводится ряд неоптимальных результатов, с которыми можно столкнуться при эксплуатации зондов Vysis FISH. Также указываются возможные причины и рекомендации по улучшению производительности системы.

Проблема	Метод	Возможная причина	Возможное решение
• Нет сигнала или слабый сигнал	• Оценка предметного стекла	• Использовано некорректное иммерсионное масло	• Убедитесь, что иммерсионное масло подходит для флуоресцентной микроскопии
		• Неподходящие лампы (т. е. ксеноновые или вольфрамовые)	• Используйте ртутную лампу (рекомендация: 100 ватт)
		• Разрегулировка ртутной лампы	• Отрегулируйте лампу
		• Ртутная лампа используется слишком долго	• Замените новой лампой
		• Неподходящий для просмотра предметных стекол набор фильтров	• Используйте рекомендуемые фильтры
		• Ухудшение качества флуоресцентного фильтра	• Замените флуоресцентный фильтр
		• Загрязнение или растрескивание коллекторных линз	• Очистите или замените линзу
		• Загрязненное или сломанное зеркало в ламповом блоке	• Очистите или замените зеркало
		• Ухудшение компонентов на световой траектории	• Обратитесь к техническому представителю производителя микроскопа и при необходимости замените компоненты
		• Микроскоп не работает надлежащим образом	• Обратитесь к техническому представителю производителя
	• Ручная обработка предметных стекол или обработка предметных стекол на VP 2000	• Чрезмерная фиксация среза (границы клеток четкие)	• Увеличенное время фиксации ткани может привести к прогрессирующему ухудшению интенсивности сигнала и потребовать увеличения времени обработки
		• Неправильная предварительная обработка предметных стекол	• Проверьте время и температуру раствора для предварительной обработки • Отрегулируйте время для раствора для предварительной обработки в пределах допустимого диапазона
		• Неправильная протеазная обработка	• Проверьте время и температуру раствора протеазы • Отрегулируйте время для раствора протеазы в пределах допустимого диапазона
		• Попавшие под покровное стекло пузырьки воздуха мешают доступу зондов	• Нанесите покровное стекло, вначале прикоснувшись к поверхности смеси зондов
		• Чрезмерное высыхание предметного стекла перед или во время процедуры промывки после гибридизации	• Повторите анализ с новым предметным стеклом
		• Неправильное время гибридизации	• Проверьте время гибридизации
		• Неправильная температура промывки после гибридизации	• Проверьте температуру буфера промывки
	• Обработка предметных стекол на VP 2000	• Использован неправильный протокол VP 2000	• Проверьте протокол VP 2000
		• Неправильное наполнение резервуара(-ов) с реагентами VP 2000	• Инструкции по наполнению см. в разделе **«Подготовка рабочих реагентов для VP 2000»**
		• Неправильное расположение реагентов VP 2000	• Проверьте расположение реагентов VP 2000 по карте реагентов
• Неинформативный результат	• Оценка предметного стекла	• Слишком мало ядер опухоли для регистрации	• Повторите анализ с новым предметным стеклом
	• Обработка предметных стекол на VP 2000	• Использован неправильный протокол VP 2000	• Проверьте протокол VP 2000
		• Неправильное наполнение резервуара(-ов) с реагентами VP 2000	• Инструкции по наполнению см. в разделе **«Подготовка рабочих реагентов для VP 2000»**
		• Неправильное расположение реагентов VP 2000	• Проверьте расположение реагентов VP 2000 по карте реагентов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ A. РУКОВОДСТВО ПО ДИАГНОСТИКЕ И УСТРАНЕНИЮ НЕИСПРАВНОСТЕЙ (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

Проблема	Метод	Возможная причина	Возможное решение
• Множество фоновых шумов	• Ручная обработка предметных стекол или обработка предметных стекол на VP 2000	• Недостаточная промывка	• Проверьте время и температуру буфера промывки
	• Оценка предметного стекла	• Использовано некорректное иммерсионное масло	• Убедитесь, что иммерсионное масло подходит для флуоресцентной микроскопии
		• Ухудшение качества флуоресцентного фильтра	• Замените флуоресцентный фильтр
• Варьирование интенсивности сигнала на срезе ткани	• Ручная обработка предметных стекол или обработка предметных стекол на VP 2000	• Зонды неравномерно распределены по предметному стеклу из-за пузырьков воздуха под покровным стеклом • Неправильное смешивание смеси зондов перед гибридизацией	• Повторите анализ на следующем смежном срезе того же блока ткани и убедитесь в отсутствии пузырьков воздуха под покровным стеклом • Нанесите покровное стекло, вначале прикоснувшись к поверхности смеси зондов • Повторите анализ на следующем смежном срезе того же блока ткани
		• Пузырьки воздуха или иммерсионное масло попали под покровное стекло после нанесения DAPI	Нанесите покровное стекло повторно. При необходимости удаления и повторного нанесения покровного стекла следуйте данному протоколу: • Погрузите предметные стекла в 70%-й этанол на период до 15 минут или до тех пор, пока покровное стекло не отойдет • Погрузите предметные стекла в 85%-й этанол на 3 минуты • Погрузите предметные стекла в 100%-й этанол на 3 минуты • Высушите предметные стекла естественным образом, защитив их от света, при температуре окружающей среды в течение 2–5 минут • Нанесите 10 мкл DAPI I на каждое предметное стекло, повторно установите покровное стекло и храните в защищенном от света месте в течение минимум 5 минут • Выполните регистрацию образцов с помощью флуоресцентного микроскопа в течение 24 часов или храните при -20 ± 10 ˚C
• Некроз тканей, низкий объем клеточного содержимого или ухудшение морфологии тканей	• Ручная обработка предметных стекол или обработка предметных стекол на VP 2000	• Использованы неправильные предметные стекла	• Используйте положительно заряженные предметные стекла
		• Недостаточная фиксация среза ткани (плохое окрашивание DAPI)	• Проверьте время протеазной обработки • Уменьшите время протеазной обработки в пределах допустимого диапазона
		• Неправильная сушка предметных стекол	• Проверьте температуру инструмента ThermoBrite • Увеличьте время сушки в пределах допустимого диапазона
		• Потеря ДНК (плохое окрашивание DAPI)	• Проверьте условия фиксации
		• Чрезмерная предварительная обработка	• Проверьте время и температуру раствора для предварительной обработки • Уменьшите время для предварительной обработки раствора в пределах допустимого диапазона
		• Чрезмерная обработка (раствор протеазы)	• Проверьте температуру раствора протеазы • Уменьшите время для раствора протеазы в пределах допустимого диапазона
		• Чрезмерная денатурация	• Проверьте время денатурации
		• Разрыв среза ткани при удалении покровного стекла после гибридизации	• Отмочите покровное стекло в промывочном буфере в течение дополнительного времени
• Покровное стекло 22 мм × 22 мм не может полностью покрыть срез ткани	• Ручная обработка предметных стекол или обработка предметных стекол на VP 2000	• Срезы тканей слишком большие.	• Используйте покровные стекла большего размера с отрегулированным объемом зондов или DAPI I: Используйте 1 покровное стекло 22 мм × 30 мм с 14 мкл зондов или DAPI I; или используйте 2 покровных стекла 22 мм × 22 мм с 10 мкл зондов или DAPI I под каждым покровным стеклом; или используйте 1 покровное стекло 24 мм × 50 мм с 20 мкл зондов или DAPI I

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis IntelliFISH Universal FFPE Tissue Pretreatment Protease (75 mg) Kit

en

REF 08N85-083
30-608530/R2

REF 08N85-083
30-608530/R2

Условные обозначения

	Производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Тест in vitro
	Vysis IntellFISH Протеаза (на 50 мл)
	Для диагностики in vitro
	Обратитесь к инструкции по применению
	Годен до
	Температурный режим
	См. меры предосторожности
	См. меры предосторожности
	Полномочный представитель
	Производитель
	Обратитесь к инструкции по применению
	Полномочный представитель

СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ: 1-800-553-7042
СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ ПО РАБОТЕ С КЛИЕНТАМИ: ПОЗВОНИТЕ В СЛУЖБУ В ПОДДЕРЖКИ В ВАШЕЙ СТРАНЕ

НАЗНАЧЕНИЕ

Универсальный набор Протеаз Vysis IntellFISH FFPE для предварительной обработки тканей фиксированных в формалине и заключенных в парафин, предназначен для предварительной

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

обработки тканей при проведении флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) с ДНК-зондами Vysis.

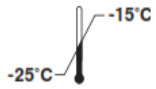
РЕАГЕНТЫ

Vysis IntellFISH универсальный фермент для предварительной обработки парафиновых срезов (75мг) (Кат. номер 08N85-083).

Vysis IntellFISH Протеаза

- (5 флаконов, 75 мл во флаконе) Пепсин, 2500-4000 ед./мг

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ



Vysis IntellFISH универсальный фермент для предварительной обработки парафиновых срезов устойчив до истечения срока годности при условии хранения от -25°C до -15°C.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

Vysis IntellFISH универсальный фермент для предварительной обработки парафиновых срезов поставляется на хладоэлементах.

Если Вы получили реагенты, состояние которых противоречит рекомендациям на этикетки или они повреждены, обратитесь в службу технической поддержки Abbott Molecular.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD **Предназначены только для диагностики in vitro**

Ниже приведены сведения об опасностях, связанных с компонентами Vysis IntellFISH универсального фермента для предварительной обработки парафиновых срезов.





H315	Вызывает повреждение кожных покровов.
H319	Вызывает повреждение глаз.
H334	Может вызывать аллергию и симптомы астмы или затрудненное дыхание.
H335	Может вызывать раздражение дыхательных путей
P284	В случае недостаточной вентиляции надевайте защитную одежду.
P261	Не вдыхайте пары/аэрозоли
P280	Надевайте защитные перчатки, защитную одежду, используйте защиту для глаз.
P264	Тщательно мойте руки после работы.
P305+P351+P338	В случае попадания в глаза: тщательно промойте водой в течении нескольких секунд. Снимите контактные линзы при их наличии и продолжайте промывать водой.
P302+P352	При попадании на кожу: тщательно промойте водой.
P304+P341	При вдыхании паров: переместите человека на открытый воздух и обеспечьте ему положение для свободного доступа воздуха.
P312	Вызовите скорую/врача при плохом самочувствии.
P362	Выбросите загрязненную одежду.
P405	Хранить под замком
P501	Утилизировать содержимое в контейнер в соответствии с местными правилами утилизации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПАСПОРТА БЕЗОПАСНОСТИ: Важная информация по безопасной эксплуатации, транспортировке, и утилизации данного продукта содержится в паспортах безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (SDS) для всех реагентов, представленых в комплекте, предоставляются по запросу от Молекулярного подразделения Abbott отдела технического обслуживания.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ:

Обратитесь к вкладышу внутри упаковки ДНК-зондов для информации обо всех необходимых реагентах, компонентах и оборудовании.

ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ АНАЛИЗА

Обратитесь к инструкции –вкладышу внутри упаковки для получения информации по подготовке, обработке, подсчету и интерпретации результатов.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Vysis IntellFISH универсальный фермент предназначен для предварительной обработки парафиновых срезов (75 мг).

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Для получения технической поддержки, позвоните в Службу технической поддержки Abbott Molecular по телефону (1-800-553-7042) (в пределах США) или +49-6122-580 (за пределами США) или посетите сайт Abbott Molecular: http:// www.abbottmolecular.com

Vysis является торговой маркой группы компании Abbott.

Все остальные торговые марки являются собственостью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany

© 2020 Abbott. All Rights Reserved.
www.abbottmolecular.com CE

Июнь 2020
30-608530/R2

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis IntelliFISH Universal FFPE Tissue Pretreatment Protease (750 mg) Kit

en

REF 08N85-084

30-608531/R2

REF 08N85-084
30-608531/R2

Примечания: **Изменения** **выделены**

Условные обозначения

	Производитель
	Номер списка
	Номер партии
	Предназначен только для диагностики in vitro
	Тест in vitro
	Vysis IntellFISH Протеаза (на 500 мл)
	Для диагностики in vitro
	Обратитесь к инструкции по применению
	Годен до
	Температурный режим
	См. меры предосторожности
	См. меры предосторожности
	Полномочный представитель

СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ: 1-800-553-7042
СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ ПО РАБОТЕ С КЛИЕНТАМИ: ПОЗВОНИТЕ В СЛУЖБУ В ПОДДЕРЖКИ В ВАШЕЙ СТРАНЕ

НАЗНАЧЕНИЕ

Универсальный набор Протеаз Vysis IntellFISH FFPE для предварительной обработки тканей фиксированных в формалине и заключенных в парафин, предназначен для предварительной обработки тканей при проведении флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) с ДНК-зондами Vysis.

РЕАГЕНТЫ

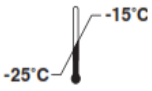
Vysis IntellFISH универсальный фермент для предварительной обработки парафиновых срезов (750 мг) (Кат. номер 08N85-084).

Vysis IntellFISH Протеаза

- (1 флакон, 750 мл во флаконе) Пепсин, 2500-4000 ед./мг

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ



Vysis IntellFISH универсальный фермент для предварительной обработки парафиновых срезов (750 мг) устойчив до истечения срока годности при условии хранения от -25°C до -15°C.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

Vysis IntellFISH универсальный фермент для предварительной обработки парафиновых срезов поставляется на хладоэлементах.

Если Вы получили реагенты, состояние которых противоречит рекомендациям на этикетки или они повреждены, обратитесь в службу технической поддержки Abbott Molecular.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD **Предназначены только для диагностики in vitro**

Ниже приведены сведения об опасностях, связанных с компонентами Vysis IntellFISH универсального фермента для предварительной обработки парафиновых срезов.

Ниже приведены сведения об опасностях, связанных с компонентами Vysis IntellFISH (750 мг) универсального фермента для предварительной обработки парафиновых срезов.



H315	Вызывает повреждение кожных покровов.
H319	Вызывает повреждение глаз.
H334	Может вызывать аллергию и симптомы астмы или затрудненное дыхание.
H335	Может вызывать раздражение дыхательных путей
P284	В случае недостаточной вентиляции надевайте защитную одежду.
P261	Не вдыхайте пары/аэрозоли
P280	Надевайте защитные перчатки, защитную одежду, используйте защиту для глаз.
P264	Тщательно мойте руки после работы.
P305+P351+P338	В случае попадания в глаза: тщательно промойте водой в течении нескольких секунд. Снимите контактные линзы при их наличии и продолжайте промывать водой.
P302+P352	При попадании на кожу: тщательно промойте водой.
P304+P341	При вдыхании паров: переместите человека на открытый воздух и обеспечьте ему положение для свободного доступа воздуха.
P312	Вызовите скорую/врача при плохом самочувствии.
P362	Выбросите загрязненную одежду.
P405	Хранить под замком
P501	Утилизировать содержимое в контейнер в соответствии с местными правилами утилизации.

ПАСПОРТА БЕЗОПАСНОСТИ: Важная информация по безопасной эксплуатации, транспортировке, и утилизации данного продукта содержится в паспортах безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (SDS) для всех реагентов, представленых в комплекте, предоставляются по запросу от Молекулярного подразделения Abbott отдела технического обслуживания.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ:

Обратитесь к вкладышу внутри упаковки ДНК-зондов для информации обо всех необходимых реагентах, компонентах и оборудовании.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ АНАЛИЗА

Обратитесь к инструкции –вкладышу внутри упаковки для получения информации по подготовке, обработке, подсчету и интерпретации результатов.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Vysis IntellFISH универсальный фермент предназначен для предварительной обработки парафиновых срезов (750 мг).

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Для получения технической поддержки, позвоните в Службу технической поддержки Abbott Molecular по телефону (1-800-553-7042) (в пределах США) или +49-6122-580 (за пределами США) или посетите сайт Abbott Molecular: http:// www.abbottmolecular.com

Vysis является торговой маркой группы компании Abbott.

Все остальные торговые марки являются собственостью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany

© 2020 Abbott. All Rights Reserved.
www.abbottmolecular.com CE

Июнь 2020
30-608530/R2

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis IntelliFISH Universal FFPE Tissue Pretreatment and Wash Reagent Kit

en

REF 08N85-085

30-608533/R3

REF 08N85-085
30-608533/R3

Примечания: Изменения выделены

Условные обозначения

	Производитель
REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Тест in vitro
For In Vitro Diagnostic Use	Предназначен только для диагностики in vitro
Vysis IntelliFISH Protease Buffer	Vysis IntelliFISH Буфер для Протеазы
Vysis IntelliFISH Pretreatment SSC Solution	Vysis IntelliFISH раствор для предподготовки SSC
Vysis IntelliFISH Post-Hybridization Wash Buffer	Vysis IntelliFISH Постгибридизационный промывочный буфер
	Обратитесь к инструкции по применению
	Годен до
	Температурный режим
	См. меры предосторожностин
EC REP	Полномочный представитель
EC REP	Полномочный представитель
	Производитель
	Обратитесь к инструкции по применению
EC REP	Полномочный представитель

СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ: 1-800-553-7042

СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ ПО РАБОТЕ С КЛИЕНТАМИ: ПОЗВОНИТЕ В СЛУЖБУ В ПОДДЕРЖКИ В ВАШЕЙ СТРАНЕ.

НАЗНАЧЕНИЕ

Универсальный реагент предназначен для предварительной обработки и постгибридизационной отмывки заключенной в парафин ткани при проведении флуоресцентной in situ гибридизации (FISH) с ДНК пробами Vysis на фиксированных в формалине и заключенных в парафин образцах тканей.

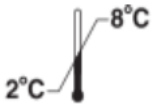
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

РЕАГЕНТЫ

Универсальный реагент Vysis IntelliFISH для предподготовки и промывки парафиновых срезов (Номер 08N85-085).

- **Vysis IntelliFISH раствор SSC для предподготовки** (2 флакона, 250 мл в каждом) 1X хлорид натрия,
  цитрат Натрия (SSC) pH 7.
- **Vysis IntelliFISH Буфер для Протеазы** (2 флакона, 250 мл в каждом), 0.1 N Соляная кислота (HCl).
- **Vysis IntelliFISH постгибридизационный буфер (**3 флакона, 250 мл в каждом) 2X SSC/0,3% Tween-20, pH 7.

Инструкция по хранению



Универсальный реагент Vysis IntelliFISH для предподготовки и промывки парафиновых срезов устойчивы до истечения срока годности при хранении от 2 до 30 °C.

УСЛОВИЯ ДОСТАВКИ

Универсальный реагент Vysis IntelliFISH для предподготовки и промывки парафиновых срезов транспортируется при температуре окружающей среды.

Если Вы получили реагенты в условиях противоположных рекомендациям инструкции, или с повреждениями, обратитесь в Службу поддержки Abbott Molecular.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD **Предназначены только для диагностики in vitro**

Ниже приведены сведения об опасностях, связанных с компонентами Vysis IntellFISH для предподготовки и промывки парафиновых срезов.

Vysis IntelliFISH Буфер для Протеазы



Опасность
Компоненты продукта, несущие угрозу:
соляная кислота

H290	Может вызывать коррозию металлов.
H314	Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.
P260	Избегать вдыхания тумана/паров/аэрозолей.
P280	Пользоваться защитными перчатками/ защитной одеждой/средствами защиты глаз.
P234	Хранить только в контейнере завода-изготовителя.
P264	После работы тщательно вымыть руки.
P303+P361+P353	ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): Снять/удалить немедленно всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой/принять душ.
P305+P351+P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Острожно промыть водой в течение несколько минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз.
P310	Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕНТР или к специалисту/терапевту.
P301+ P330+P331	ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: Прополоскать рот. НЕ вызывать рвоту.
P390	Адсорбировать пролитое вещество, чтобы предотвратить повреждение материала.
P501	Утилизировать содержимое/контейнер в соответствии с местными правилами.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Паспорта безопасности: Важная информация о безопасном обращении, транспортировке и утилизации данного продукта содержится в Паспортах безопасности.
ПРИМЕЧАНИЕ: За паспортами безопасности (SDS) для каждого реагента из набора обращайтесь в Службу технической поддержки Abbott Molecular.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ:

Обратитесь к вкладышу внутри упаковки ДНК-зондов для информации обо всех необходимых реагентах, компонентах и оборудовании.

ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ АНАЛИЗА

Обратитесь к инструкции –вкладышу внутри упаковки для получения информации по подготовке, обработке, подсчету и интерпретации результатов.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Универсальный реагент Vysis IntelliFISH для предподготовки и промывки парафиновых срезов предназначен для использования с образцами тканей, заключенными в парафин.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Для получения технической поддержки, позвоните в Службу технической поддержки Abbott Molecular по телефону (1-800-553-7042) (в пределах США) или +49-6122-580 (за пределами США) или посетите сайт Abbott Molecular: http:// www.abbottmolecular.com
Vysis является торговой маркой группы компании Abbott.
Все остальные торговые марки являются собственостью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany

© 2020 Abbott. All Rights Reserved.
www.abbottmolecular.com

CE

Июнь 2020
30-608533/R3

Abbott

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis IntelliFISH Hybridization Buffer

en

REF 08N87-015

30-608553/R2

Vysis IntellFISH Гибридизационный буфер (5 флаконов)

Примечания: Изменения выделены

REF 08N87-015

30-608553/R2

Условные обозначения

REF	Номер списка
LOT	Номер партии
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
In Vitro Test	Тест in vitro
MIX	Смешивать
Σ	Количество достаточно для <n> тестов
	Температурный режим
	Опасность
	Годен до
	Обратитесь к инструкции по применению
EC REP	Полномочный представитель
	Производитель
	Обратитесь к инструкции по применению
EC REP	Полномочный представитель

СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ: 1-800-553-7042

СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ ПО РАБОТЕ С КЛИЕНТАМИ: ПОЗВОНИТЕ В СЛУЖБУ В ПОДДЕРЖКИ В ВАШЕЙ СТРАНЕ.

Необходимо тщательно следовать прилагаемой инструкции. Достоверность результатов анализа не может быть гарантирована, если были произведены какие-либо отклонения от инструкции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

Если в отношении этого устройства произошел серьезный инцидент, обстоятельства данного инцидента должны быть сообщены производителю и соответствующему компетентному органу государства, в котором находится пользователь и/или пациент. Чтобы сообщить производителю, см. контактную информацию, приведенную в разделе технической помощи данной инструкции.

НАЗВАНИЕ

Vysis IntellFISH Гибридизационный буфер

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis IntellFISH Гибридизационный буфер предназначен для использования с флуоресцентными зондами при проведении флуоресцентной in situ гибридизации для облегчения гибридизации ДНК-зондов Vysis с мишенью. Подробное описание использования дано в соответствующей инструкции внутри упаковки.

Предполагаемые пользователи

Предполагаемые пользователи (внешние заинтересованные стороны) включают следующие:

- Лабораторный персонал и руководство лаборатории, которые будут выполнять тестирование.
- Квалифицированные специалисты в области здравоохранения, которые будут выполнять интерпретацию результатов для каждого образца.
- Клиницисты, которые будут использовать результаты выполненных тестов
- Пациенты, которым будет проводиться тестирование

Места использования включают следующее:

- Справочные диагностические лаборатории
- Частные диагностические лаборатории
- Больницы, оборудованные диагностическими лабораториями
- Медицинские учреждения, обеспечивающие уход за пациентами.

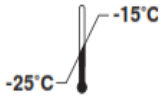
РЕАГЕНТЫ

Vysis IntellFISH Гибридизационный буфер (Номер 08N87-015).

- 5 флаконов (250 мкл во флаконе)

Vysis IntellFISH Гибридизационный буфер содержит сульфат декстрана, формамид, гуанидин тиационат в солевом растворе цитрата натрия (SSC буфер).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ



Vysis IntellFISH Гибридизационный буфер должен храниться при температуре от -25 до -15 °C.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

Vysis IntellFISH Гибридизационный буфер транспортируется ну сухом льду. Доставка в страны, в которых не допускается использование сухого льда, осуществляется с помощью хладоэлементов. Если есть ограничения по хладоэлементам, можно использовать пластиковые пакеты со льдом. Если Вы получили реагенты, состояние которых противоречит рекомендациям на этикетки или они повреждены, обратитесь в службу технической поддержки Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Предназначены только для диагностики in vitro

Ниже приведены сведения об опасностях, связанных с компонентами Vysis IntellFISH гибридизационного буфера.



Компоненты, обозначенные на этикетке, и указывающие на опасность:

H360	Оказывает влияние на репродуктивную функцию
EUH032	При контакте с кислотами выделяется токсичный газ
P201	Перед использованием ознакомьтесь с инструкциями
P202	Не открывайте до тех пор, пока не будут соблюдены все меры безопасности
P280	Надевайте защитные перчатки, защитную одежду, защитные очки
P308+P313	В случае контакта обратитесь за медицинской помощью
P405	Хранить под замком
P501	Утилизировать содержимое в контейнер в соответствии с местными правилами

ПАСПОРТА БЕЗОПАСНОСТИ: Важная информация по безопасной эксплуатации, транспортировке, и утилизации данного продукта содержится в паспортах безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (SDS) для всех реагентов, представленых в комплекте, предоставляются по запросу от Молекулярного подразделения Abbott отдела технического обслуживания.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ:

Обратитесь к вкладышу внутри упаковки ДНК-зондов для информации обо всех необходимых реагентах, компонентах и оборудовании.

ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ АНАЛИЗА

Обратитесь к инструкции –вкладышу внутри упаковки для получения информации по подготовке, обработке, подсчету и интерпретации результатов.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Только для диагностики in vitro

Vysis IntellFISH Гибридизационный буфер был оптимизирован для использования с цитологическими образцами, образцами парафиновых блоков вместе с ДНК-зондами Vysis как описано внутри упаковки-вкладыше к ДНК пробам. Результаты FISH –анализа могут быть неинформативными если качество образца или подготовка предметных стекол была проведена неадекватно.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Для получения технической поддержки, позвоните в Службу технической поддержки Abbott Molecular по телефону (1-800-553-7042) (в пределах США) или +49-6122-580 (за пределами США) или посетите сайт Abbott Molecular: http:// www.abbottmolecular.com

Vysis является торговой маркой группы компании Abbott.
Все остальные торговые марки являются собственостью их владельцев.

Abbott Molecular Inc. является легальным производителем Vysis IntellFISH Гибридизационного буфера.

Vysis IntellFISH Гибридизационный буфер импортируется в Европу Abbott Diagnostic GmbH, расположенного по адресу Макс-Планк Ring 2, 65205 Висбаден, Германия.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany

© 2020 Abbott. Все права защищены.

Vysis и IntellFISH являются собственностью Abbott. Все другие торговые марки являются собственностью их владельцев.

www.abbottmolecular.com

Июнь 2020
30-608553/R2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Vysis IntelliFISH DAPI I Counterstain for FFPE Specimens

en

REF 09N54-010

30-608544/R2

REF 09N54-010
30-608544/R2

ПРИМЕЧАНИЯ: Изменения выделены

	Производитель
REF	Номер списка
IVD	Предназначен только для диагностики in vitro
In Vitro Test	Тест in vitro
DAPI I Counterstain for FFPE Specimens	Контркраситель DAPI I для парафиновых срезов
For In Vitro Diagnostic Use	Для диагностических целей in vitro
	Обратитесь к инструкции
	Использовать до
	Предельная температура
EC REP	Полномоченный представитель

СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ: 1-800-553-7042
СЛУЖБА ПОДДЕРЖКИ ПО РАБОТЕ С КЛИЕНТАМИ: ПОЗВОНИТЕ В СЛУЖБУ В ПОДДЕРЖКИ В ВАШЕЙ СТРАНЕ.

НАЗНАЧЕНИЕ

Vysis IntellFISH Контркраситель DAPI I предназначен для проведения флуоресцентной гибридизации in situ для связывания с ядерной ДНК, что вызывает голубое свечение фиксированных в формалине и заключенных в парафин образцах.

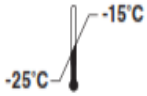
РЕАГЕНТЫ

Vysis IntellFISH Контркраситель DAPI I для образцов парафиновых срезов (**Кат. номер 09N54-010).** Этот набор содержит количество реагентов, достаточное для проведения 20 исследований. Для проведения анализа определяется целевая область размером 22 мм ×22 мм.

- **Контркраситель DAPI I для образцов парафиновых срезов**

(1 флакон, 300 мкл на флакон) контркраситель DAPI I для образцов парафиновых срезов состоит из DAPI (4,6 – диамидино – 2-фенилиндол *2HCl) и фенилендиамидин в глицероле и фосфатно-солевой буфер (300 мкл/флакон, 1 мг/мл).

ИНСТРУКЦИЯ ПО ХРАНЕНИЮ



Vysis IntellFISH Контркраситель DAPI I для парафиновых образцов хранится при температуре от -25°C до - 15°C в защищенном от света месте.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

Vysis IntellFISH Контркраситель DAPI I транспортируется на хладоэлементах в Соединенных Штатах Америки и на сухом льду за пределами Соединенных Штатов Америки.

Если Вы получили реагенты в условиях, противоположных рекомендациям инструкции, или с повреждениями, обратитесь в Службу поддержки Abbott Molecular.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD

Для диагностики IN VITRO

ПАСПОРТА БЕЗОПАСНОСТИ: Важная информация по безопасной эксплуатации, транспортировке, и утилизации данного продукта содержится в паспортах безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (SDS) для всех реагентов, представленых в комплекте, предоставляются по запросу от Молекулярного подразделения Abbott отдела технического обслуживания.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Обратитесь к вкладышу внутри упаковки ДНК-зондов для информации обо всех необходимых реагентах, компонентах и оборудовании.

ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ АНАЛИЗА

Обратитесь к инструкции –вкладышу внутри упаковки для получения информации по подготовке, обработке, подсчету и интерпретации результатов.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Только для диагностики in vitro

Vysis IntellFISH Контркраситель DAPI I используется только с ДНК-пробами только на заключенных в парафин образцах.

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Для получения технической поддержки, позвоните в Службу технической поддержки Abbott Molecular по телефону (1-800-553-7042) (в пределах США) или +49-6122-580 (за пределами США) или посетите сайт Abbott Molecular: http:// www.abbottmolecular.com

Vysis является торговой маркой группы компании Abbott.

Все остальные торговые марки являются собственостью их владельцев.

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA

EC REP Abbott GmbH
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany

© 2020 Abbott. Все права защищены.

CE

www.abbottmolecular.com

Июнь 2020
30-608544/R2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru