

« УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «СервисИнструмент»

В.М. Гуськов В.М. Гуськов

« 19 » марта 2013 г.



Инструкция по применению

на

**«Наборы реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe для выявления
перестройки гена киназы у больных немелкоклеточным раком
лёгких»**

Производства: Abbott Molecular, Inc, США

СОДЕРЖАНИЕ:

1. ОПИСАНИЕ СИМВОЛОВ.....	3
2. ОПИСАНИЕ ПРОДУКТА.....	3
3. НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
4. СОСТАВ ИЗДЕЛИЯ.....	4
5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ МЕТОДА	6
6. ИНСТРУКЦИЯ ПО ХРАНЕНИЮ И МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ	7
7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА.....	9
8. ТЕХНИЧЕСАЯ ПОДДЕРЖКА	24

1. ОПИСАНИЕ СИМВОЛОВ

	Производитель
	Каталожный номер
	Номер партии
	Медицинское устройство для диагностики in vitro
	Температура хранения
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам
	Годен до
	Смотрите инструкцию по применению
	Биологическая опасность
	Уполномоченный представитель

2. ОПИСАНИЕ ПРОДУКТА

Рак легкого занимает 1-е место в структуре смертности от злокачественных новообразований (как у мужчин, так и у женщин); ежегодно от немелкоклеточного рака легкого, например в США умирают 166000 человек. Основной фактор риска рака легкого - курение. Именно курение (активное и пассивное) предопределяет до 90% случаев рака легкого, причем риск смерти от этого заболевания у курящих в 20 раз выше по сравнению с некурящими. Другие факторы риска - контакт с асбестом, воздействие ионизирующего излучения, а также различных органических и неорганических канцерогенов. Продолжаются исследования, посвященные оценке роли питания и генетических факторов риска.

Для немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) характерны многочисленные нарушения на молекулярно-генетическом уровне, которые влияют на клеточный цикл и апоптоз. К типичным для НМРЛ молекулярно-генетическим нарушениям относятся мутации или повышенная экспрессия онкогенов *ras*, *c-erbB-2*, *bcl-2* и *mys*, а также утрата активности генов-супрессоров опухолевого роста *p53*, *RB* и *p16*. Немаловажную роль в опухолевой трансформации и пролиферации играют теломеразная активность, экспрессия рецепторов, обладающих собственной тирозинкиназной активностью (*EGRF*, *HER2/neu* и *PDGFR*), а также факторов ангиогенеза, в частности фактора роста эндотелия (*VEGF*).

Более 80% случаев рака легкого представлены НМРЛ (по гистологическому строению - аденокарцинома, плоскоклеточный рак и крупноклеточный рак). Исторически именно плоскоклеточный рак составлял большую часть случаев НМРЛ, однако в последние 35 лет аденокарцинома стала встречаться в 2 раза чаще, чем плоскоклеточный рак, что, возможно, связано с изменением состава сигарет. Бронхиолоальвеолярный рак представляет собой

высокодифференцированную форму аденокарциномы, характеризующуюся большей выживаемостью. Считается, что рост числа случаев аденокарциномы в основном обусловлен увеличением заболеваемости бронхолегочным раком или опухолями сходного гистологического строения.

Набор реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe использует технологию флуоресцентной гибридизации для выявления перестройки хромосомы 2p23. Перестройка локуса ALK в 2p23 непосредственно связана с развитием НМРЛ (NSCLC). Ген ALK определяет трансмембранный гликопротеин с активностью тирозинкиназы. Внутренняя перестройка с известными сливающимися клетками ставит домен ALK киназы под контроль другого генетического активатора. Данное слияние приводит к образованию гибридного белка с определяющей активностью тирозинкиназы, которая, как было обнаружено, играет важную роль в контроле пролиферации клеток.

При НМРЛ перестроение гена ALK изначально отождествлялось с геном белка иглокожих, ассоциированным с микротрубочками, тип 4 (EML4). Структурные слияния генов EML4-ALK, выявленные на данный момент, включают варианты, содержащие многочисленные точечные разрывы гена EML4 в экзонах 2, 6, 13, 14, 15, 18, и 20, и все варианты, начиная с участка ALK гена, закодированного экзон 20. Кроме гена EML4, как было выявлено, ген ALK также формирует сливающиеся клетки в опухолях НМРЛ с генами TFG и KIF5B.

На данный момент не существует других стандартных методов диагностики, кроме Vysis ALK Break Apart FISH, для выявления ALK-зависимого НМРЛ. Согласно положениям Национальной онкологической сети (версия 3.2011) о немелкоклеточном раке легких, большим преимуществом FISH-пробы является то, что имеющийся на рынке тест применяется для выявления ALK-перестройки при аденокарциноме легких. Иммуногистохимические исследования, применяемые для выявления ALK перестроений в клинических лабораториях по всему миру, не способны выявить большую часть ALK-измененных аденокарцином легких.

Немелкоклеточный рак легких является основной причиной смерти от рака во всем мире. При коэффициенте заболеваемости 85–95% за 5 лет, существует острая необходимость в усовершенствовании идентификации пациентов, поддающихся особому лечению. Ингибиторы тирозинкиназы показали способность снижать пролиферацию клеток рака легких, что приводит к подавлению роста опухоли.

Терапевтическая эффективность ингибирования ALK в опухолях, которые были отобраны при помощи ALK положительной FISH пробы, была продемонстрирована в ранней фазе клинических испытаний низкомолекулярных ингибиторов тирозинкиназы ALK. Кроме того, исследование показало, что шестьдесят три из восьмидесяти двух пациентов все еще находились на лечении на момент окончания сбора данных с расчетной вероятностью выживаемости без прогрессирования 72%.

3. НАЗНАЧЕНИЕ

Наборы реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe предназначены для выявления перестановки гена анапластической лимфомы киназы (ALK), методом флуоресцентной гибридизации (FISH) в зафиксированных в формалине и залитых парафином (FFPE) образцах ткани немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) с целью выявить пациентов, которым подходит лечение препаратом XALKORI®.

Применяется только по предписанию врача.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

4. СОСТАВ ИЗДЕЛИЯ

- Набор зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe
- Набор реагентов для пробоподготовки Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer
- Набор отрицательных контрольных слайдов ProbeChek ALK
- Набор положительных контрольных слайдов ProbeChek ALK

Набор зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe.

Набор зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe – это смесь, состоящая из двух меченых флуорофором ДНК проб в буферном растворе для гибридизации, содержащем сульфат декстрана, формамид и раствор цитрата и хлорида натрия (SSC) с блокирующей ДНК:

- Vysis LSI 3'-ALK SpectrumOrange (Локус-специфическая проба 3'-ALK, меченая флуорофором SpectrumOrange)
- Vysis LSI 5'-ALK SpectrumGreen (Локус-специфическая проба 5'-ALK, меченая флуорофором SpectrumGreen)

Мишени гибридизации данных проб находятся на противоположных сторонах, по бокам от точечного разрыва гена ALK. 3'-ALK проба, которая проходит гибридизацию в теломерной области от точечного разрыва, примерно равна 300 т.п.н. и мечена флуорофором SpectrumOrange. 5'-ALK проба, которая проходит гибридизацию в центромерной области от точечного разрыва, примерно равна 442 т.п.н. и мечена флуорофором SpectrumGreen.

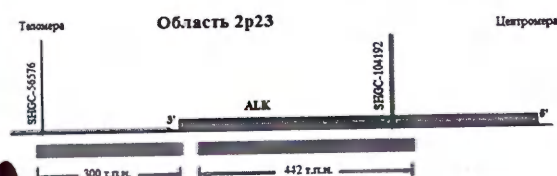


Схема двухцветной LSI пробы перестройки ALK, основанной на принципе Break Apart (точка отрыва)



Состав набора:

1. Двухцветная LSI Vysis ALK Break Apart FISH Probe

(1 ампула, 200 мкл в ампуле) 50 нг/10 мкл и 200 нг/10 мкл, меченых флуорофорами SpectrumOrange и SpectrumGreen ДНК-проб в буферном растворе для гибридизации, содержащем сульфат декстрана, формамид и раствор цитрата и хлорида натрия (SSC) с блокирующей ДНК.

2. Контрастный флуоресцентный краситель DAPI I

(1 ампула, 300 мкл в ампуле) 1 мкг/мл, DAPI (4', 6-диамидин-2-фенилиндола + 2HCl(хлороводород)) в смеси фенилендиамин дигидрохлорида, глицерина и забуференного фосфатом физиологического раствора.

Набор реагентов для пробоподготовки Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer

Набор реагентов для пробоподготовки Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer предназначен для подготовки обработанных парафином образцов ткани немелкоклеточного рака легких, закрепленных на положительных слайдах, для проведения флуоресцентной гибридизации (FISH) с Набором реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe.

Состав набора:

1. Vysis Pretreatment Solution (5 флаконов, по 50 мл) 1N Sodium thiocyanate (NaSCN)
2. Vysis Protease Buffer IV (5 флаконов, по 50 мл) 0.1N hydrochloric acid (HCl)
3. Vysis Protease IV (5 флаконов, по 75 мг) Pepsin, 2500 - 4000 units/mg
4. Vysis Wash Buffer I (1 флакон, 250 мл) 0.3% NP-40 / 0.7x Sodium chloride, Sodium citrate (SSC), pH 7
5. Vysis Wash Buffer II (1 флакон, 250 мл) 0.1% NP-40 / 2x Sodium chloride, Sodium citrate (SSC), pH 7

Набор отрицательных контрольных слайдов ProbeChek ALK

Набор отрицательных контрольных слайдов ProbeChek ALK предназначен для использования в качестве контрольного образца соответствия условий гибридизации для получения воспроизводимого, соответствующего отрицательного ответа во время применения Набора реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe для выявления перестройки гена киназы анапластической лимфомы (ALK) по описанной методике. Отрицательные контрольные слайды ProbeChek ALK следует анализировать вместе с тестируемыми образцами в соответствии с инструкцией к Набору реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe для выявления перестройки гена киназы анапластической лимфомы (ALK).

Состав набора:

1. ProbeChek ALK Отрицательные контрольные слайды (5 слайдов). Фиксированная в формалине и обработанная парафином (FFPE) клеточная культура, нанесенная на слайды для микроскопирования.

Набор положительных контрольных слайдов ProbeChek ALK

Набор положительных контрольных слайдов ProbeChek ALK предназначен для использования в качестве контрольного образца соответствия условий гибридизации для получения воспроизводимого, соответствующего положительного ответа во время применения Набора реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe для выявления перестройки гена киназы анапластической лимфомы (ALK) по описанной методике. Положительные контрольные слайды ProbeChek ALK следует анализировать вместе с тестируемыми образцами в соответствии с инструкцией к Набору реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe для выявления перестройки гена киназы анапластической лимфомы (ALK).

Состав набора:

1. ProbeChek ALK Положительные контрольные слайды (5 слайдов). Фиксированная в формалине и обработанная парафином (FFPE) клеточная культура, нанесенная на слайды для микроскопирования.

5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ МЕТОДА

Флуоресцентная гибридизация (FISH) – это метод, который позволяет визуализировать специфические нуклеотидные последовательности хромосом в клеточном препарате. В частности, FISH-реакция включает точный отжиг одноцепочечной, меченой флуорофором, ДНК-пробы с целью дополнить последовательности мишени. Гибридизация пробы с областью сателлитной ДНК видима при прямом детектировании с использованием флуоресцентной микроскопии.

Зафиксированные в формалине и залитые парафином срезы ткани помещают на стекло. ДНК подвергается денатурации до одноцепочечной формы, а затем происходит гибридизация с ДНК-пробами. После гибридизации, несвязанная проба вымывается, и ядра докрашивают флуоресцентным красителем DAPI (4,6-диамидин-2-фенилиндол) – краской, которая специфически связывается с ДНК и дает голубую флуоресценцию. Гибридизация ALK пробы просматривается при помощи флуоресцентного микроскопа, оборудованного соответствующими фильтрами возбуждения и эмиссии, которые позволяют визуально отображать оранжевые и зеленые сигналы флуоресценции. При гибридизации с Vysis ALK Break Apart FISH Probe, ALK область 2p23 в неактивном состоянии будет просматриваться как два примыкающих вплотную или объединенных (перекрывающихся) оранжевых / зеленых сигнала. Однако если произошла хромосомная перестройка в 2p23 в области точечного разрыва ALK, то будет виден один оранжевый и один зеленый сигнал, разделенные расстоянием как минимум двух диаметров сигнала. Кроме того, может быть виден одиночный оранжевый сигнал (при отсутствии зеленого сигнала) в дополнение к объединенному или разъединенному сигналу.

6. ИНСТРУКЦИЯ ПО ХРАНЕНИЮ И МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Условия хранения:

Набор реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe должен храниться при температуре от -30°C до -10°C в защищенном от света месте.

Набор реагентов для пробоподготовки Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer должен храниться при температуре от $+2^{\circ}\text{C}$ до $+8^{\circ}\text{C}$.

!!! После получения протеазы должны быть выделены из набора и храниться при температуре -20°C ($\pm 10^{\circ}\text{C}$).

Набор отрицательных контрольных слайдов ProbeChek ALK должен храниться при температуре от $+15^{\circ}\text{C}$ до $+30^{\circ}\text{C}$.

Набор положительных контрольных слайдов ProbeChek ALK должен храниться при температуре от $+15^{\circ}\text{C}$ до $+30^{\circ}\text{C}$.

Условия транспортировки:

Набор реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe перевозится в сухом льду.

Набор реагентов для пробоподготовки Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer перевозится в условиях поддержания окружающей температуры не более $+8^{\circ}\text{C}$.

Наборы контрольных слайдов не требуют особых условий транспортировки.

Если вы получите реагенты в состоянии, отличающемся от рекомендованного на этикетке, или в поврежденном виде, свяжитесь со службой технической поддержки компании Abbott Molecular.

Меры безопасности:

IVD Медицинское устройство для диагностики *in vitro*

Предназначено для использования только в лабораторных условиях.

Наборы реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe предназначены для использования только с 10% нейтральными, забуференными, зафиксированными в формалине и залитыми парафином образцами ткани НКРЛ.

Меры безопасности.

При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

Примечание: при производстве набора не использовались консерванты.



ВНИМАНИЕ: Данные препараты содержат материалы человеческого происхождения и/или потенциально заразные компоненты. Ни один из известных методов анализа не может дать полной гарантии, что материалы, полученные от человека, или инактивированные микроорганизмы не будут распространять инфекцию. Таким образом, все материалы человеческого происхождения следует считать потенциально заразными. Рекомендуются обращаться с данными реагентами и образцами человеческого происхождения в соответствии с положениями Биологической безопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях, нормой Закона об охране труда (OSHA) касающейся передающихся с кровью патогенных микроорганизмов, документом M29-A3 Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) и другими нормами биологической безопасности.

Эти меры включают, но не ограничиваются, следующим:

- Надевайте перчатки при работе с пробами или реагентами.
- Не принимать внутрь.
- Запрещается есть, пить, курить, наносить косметику или надевать контактные линзы в месте, где работают с данными материалами.
- Очистите и продезинфицируйте места разливов проб с добавлением уничтожающего микроорганизмы туберкулеза дезинфицирующего средства, такого как 1.0% раствор гипохлорита натрия, или другого подходящего дезинфицирующего средства.
- Обеззаражьте и уничтожьте все потенциально заразные материалы в соответствии с местными, государственными и федеральными нормами.
- Необходимо избегать контакта образцов с кислотами, щелочами и высокой температурой. При данных условиях ДНК повреждается и FISH анализ может быть неудачным.
- Чтобы идентифицировать целевые участки, окраска гематоксилином и эозином должна проводиться на каждом 10-ом стекле одного и того же тканевого блока.
- Соответствующее хранение компонентов набора необходимо для обеспечения указанного срока годности.
- Если рабочие реагенты выпадают в осадок или становятся мутными, необходимо утилизировать их и приготовить новые растворы.
- Флуорофоры легко обесцвечиваются под воздействием света. Чтобы уменьшить эту деградацию, работайте со всем растворами и стеклами, содержащими флуорофор, при пониженной освещенности.
- Для измерения температуры растворов, водяной бани и термостатов для культур клеток требуются калиброванный термометры.
- Всегда проверяйте температуру раствора для предварительной обработки, раствора для денатурации и промывочных буферов перед каждым применением, измеряя температуру раствора калиброванным термометром в сосуде Коплина.
- Все опасные вещества должны быть утилизированы в соответствии с руководством по утилизации опасных веществ вашей организации.
- Не используйте наборы или реагенты после окончания срока годности.
- Несоблюдение всех инструкций по денатурации, гибридизации и диагностике препарата может привести к неприемлемым или ошибочным результатам.
- На условиях гибридизации может отрицательно сказаться использование реагентов, не предусмотренных компанией Abbott Molecular.

Двухцветная LSI Vysis ALK Break Apart FISH Probe классифицируется в соответствии с применимым стандартом 29 CFR 1910.1200 и Директивами Европейского сообщества (ЕС) как: Токсичное вещество (T). Ниже приводятся соответствующие коды риска (R) и безопасности (S):



R41 Риск серьезного повреждения глаз.

R61 Может причинить вред будущему ребенку.

S45 При несчастном случае или плохом самочувствии незамедлительно обратитесь за медицинской помощью (покажите этикетку по возможности).

S53 Избегайте контакта: получите специальные инструкции перед применением.

Примечания по процедуре: Перед использованием позвольте реагентам оттаять при комнатной температуре, перемешайте на вортексе, а затем центрифугировать каждую пробирку от 2 до 3 секунд, используя стандартную настольную микро-центрифугу.

Набор реагентов для пробоподготовки Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer классифицируется в соответствии с применимым стандартом 29 CFR 1910.1200 и Директивами Европейского сообщества (ЕС) как: Едкое (C) и Вредное вещество (Xn). Ниже приводятся соответствующие коды риска (R) и безопасности (S):

R32 При контакте с кислотами выделяет очень токсичный газ.

R34 Вызывает ожоги.

R36/37/38 Вызывает раздражение глаз, дыхательных путей и кожи.



R42 Может вызывать раздражение при вдыхании.

S22 Не вдыхать частицы.

S24 Избегать контакта с кожей.

S26 В случае попадания в глаза, промыть немедленно большим количеством проточной воды и обратиться за медицинской помощью.



S35 Материал и упаковка должны быть утилизированы в соответствии с требованиями.

S36/37/39 Надевайте защитную одежду, перчатки и очки.

S45 При несчастном случае или плохом самочувствии незамедлительно обратитесь за медицинской помощью (покажите этикетку по возможности).

S46 В случае проглатывания немедленно обратитесь за медицинской помощью и предъявите упаковку или этикетку Набора.

S60 Материал и упаковка должны быть утилизированы как едкие вещества.

- Соответствующее хранение компонентов набора необходимо для обеспечения указанного срока годности. Результаты анализа могут быть ошибочными при использовании реагентов, хранившихся не в соответствии с требованиями.

- Для измерения температуры растворов, водяной бани и термостатов для культур клеток требуются калиброванный термометры.

Всегда проверяйте температуру раствора для предварительной обработки, раствора для денатурации и промывочных буферов перед каждым применением, измеряя температуру раствора калиброванным термометром в сосуде Коплина.

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Необходимые материалы

- Наборы реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe (Каталожный номер 06N38-020)
- Комплект Vysis предварительной подготовки парафином IV и пост-гибридизационного промывочного буфера (Каталожный номер 01N31-005)
- Набор отрицательных контрольных слайдов ProbeChek ALK (Каталожный номер 06N38-005)
- Набор положительных контрольных слайдов ProbeChek ALK (Каталожный номер 06N38-010)

Лабораторные реактивы

- Нето-De (или эквивалент, например, d-лимонен)
- Красители гематоксилин и эозин (H&E)
- Иммерсионное масло, подходящее для флуоресцентной микроскопии
- Этиловый спирт (100%). Хранить при комнатной температуре.
- Очищенная вода
- Каучуковый клей

Лабораторное оборудование

- Положительно заряженные предметные стекла микроскопа
- Покровные стекла 22 мм x 22 мм
- Наконечники для микро-дозатора объемом от 1 до 10 мкл (стерильные)
- Микро-дозатор объемом от 1 до 10 мкл
- Таймер
- Микротом
- Микро-центрифуга
- Мерные цилиндры
- Водяные бани с циркуляцией или статичные (37°C)
- Водяные бани с циркуляцией (74°C и 80°C) Примечание: Статические водяные бани не обеспечивают адекватного контроля температуры при более высоких температурах.
- Водяная баня с очищенной водой (37°C до 42°C)

- Алмазные резцы
- Маркер, устойчивый к растворителям (опционально)
- Щипцы
- Шприц однократного применения (5 мл)
- Сосуды Коплина (12 x 50 мл) Рекомендуемый тип: вертикальные сосуды для окрашивания
- Флуоресцентный микроскоп, оборудованный рекомендованными фильтрами Калиброванный термометр
- Вортекс-миксер
- Коробка предметных стекол с крышкой и/или картонные папки-планшеты
- ThermoBrite® (Каталожный номер 7J68-020)
- Карты влажности ThermoBrite (Каталожный номер 7J68-001)

Обснащение микроскопа и вспомогательные принадлежности

Микроскоп

Для просмотра результатов гибридизации требуется эпифлуоресцентный микроскоп. Микроскоп необходимо проверить, чтобы убедиться, что он работает нормально для обеспечения наилучшего качества просмотра образцов FISH анализа. Микроскоп, применяемый с общими красителями ДНК, такими как DAPI, пропидиум иодид и квиакрин, может работать некорректно при FISH анализе. Рекомендуется обычная очистка микроскопа и периодическое обслуживание у технического представителя завода-изготовителя, особенно настройка ртутной лампы.

Источник света возбуждения

100-ваттная ртутная лампа является рекомендуемым источником возбуждения. Зафиксируйте количество часов работы лампы и замените ее прежде, чем она превысит номинальное время работы. Убедитесь, что лампа правильно настроена.

Объективы

Используйте иммерсионные флуоресцентные объективы с числовой апертурой $\geq 0,75$ при использовании микроскопа с 100-ваттной ртутной лампой. 10X до 25X объективы, в сочетании с 10X окулярами, подходят для сканирования образца с целью выявить области для подсчета. Удовлетворительные результаты для подсчета FISH сигналов можно получить с 60X до 100X иммерсионными объективами ахроматического типа.

Иммерсионное масло

Иммерсионное масло, используемое с иммерсионными объективами, должно быть специально разработано для низкой фоновой флуоресценции и предназначено для использования во флуоресцентной микроскопии.

Фильтры

Гибридизация ALK пробы с областями-мишенями ДНК отмечена оранжевой и зеленой флуоресценцией. Все остальные присутствующие ДНК будут светиться голубым в результате контрастирующей окраски DAPI I. Наборы одно- и двухполосных фильтров для флуоресцентного микроскопа, оптимизированных для использования с наборами FISH проб ДНК, имеются у Abbott Molecular для большинства моделей микроскопов.

Рекомендуемыми фильтрами для работы с набором реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe являются: Двухполосный фильтр Vysis (V2) – зеленый, оранжевый, Однополосный DAPI фильтр Vysis, Однополосный Оранжевый фильтр Vysis, и Однополосный Зеленый фильтр Vysis.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Обратитесь к разделу **меры предосторожности** данной инструкции перед подготовкой образцов.

Сбор и обработка образцов

Следующая процедура была оптимизирована для зафиксированных в формалине и залитых парафином образцов ткани рака легких. Необходимо избегать контакта образцов с кислотами, такими как декальцинирующие препараты, щелочами и высокой температурой. При данных условиях ДНК повреждается и FISH анализ может быть неудачным.

Используйте образцы тканей рака легких, зафиксированные в формалине (10% нейтральный буферный формалин), и которые были хорошо обработаны и дают хорошие срезы образцов. Предпочтительный срок фиксации для образцов ткани от 6 до 48 часов.

Подготовка препарата FFPE образцов ткани NSCLC

Примечание: Начните обработку образцов, для которых доступен только микроскопический препарат, а не блоки образца, с 5 этапа.

1. Сделайте два или более последовательных парафиновых среза, толщиной 5 ± 1 мкм, используя микротом.
2. Положите срезы на поверхность водяной бани с очищенной водой, установленной на $40 \pm 2^\circ\text{C}$.
3. Разместите срезы на положительно заряженных предметных стеклах.
4. Позвольте стеклам высохнуть на воздухе
5. Выполните окрашивание гематоксилином и эозином одного предметного стекла.

Примечание: Предметное стекло, используемое для процедуры анализа должно находиться на расстоянии 10 последовательных срезов от окрашенного H&E стекла.

Примечание: Этап 6 должен выполняться патологоанатомом.

6. Изучите и пометьте наибольшие возможную область опухоли на H&E окрашенном стекле, исключая области омертвения, области карциномы *in situ*, и области мелкоклеточного рака, используя маркер, устойчивый к растворителям или алмазный резец.
7. Используя алмазный резец, перенесите метку с окрашенного H&E стекла на соответствующие области неокрашенного стекла, пометив предметное стекло на противоположной стороне срезов ткани.
8. Храните подготовленные образцы при температуре окружающей среды до момента термообработки перед процедурой депарафинизации срезов.

Подготовка рабочих реагентов

9. **Подготовка Немо-Де** Заполните три сосуда Коплина 50 мл Немо-Де. Держите закрытыми, когда они не используются. Хранить в вентилируемом помещении при температуре окружающей среды и утилизировать через семь дней.

10. **Подготовка раствора для предварительной обработки** Заполните сосуд Коплина 50 мл раствор для предварительной обработки. Переместите сосуд Коплина на водяную баню с циркуляцией при температуре окружающей среды и повысьте температуру водяной бани до $81 \pm 2^\circ\text{C}$ (чуть выше, чем желаемая температура внутри сосуда Коплина) перед депарафинизацией проб. Убедитесь, что температура раствора достигла $80 \pm 2^\circ\text{C}$ перед использованием. Утилизируйте раствор после одного дня использования.

11. **Подготовка раствора протеазы** Добавьте одну ампулу Vysis протеазы IV к одной ампуле Vysis буфера протеазы IV. Промойте ампулу небольшим объемом буфера протеазы IV от Vysis и верните раствор в ампулу Vysis буфера протеазы IV. Замените крышку и аккуратно переверните несколько раз, чтоб перемешать. Переместите готовый раствор в сосуд Коплина, и поместите его на водяную баню при 37°C . Подождите как минимум один час после смешивания, чтоб протеаза находилась в растворе, и убедитесь, что температура буфера составляет $37 \pm 1^\circ\text{C}$ перед использованием. Утилизируйте раствор после одного дня использования.

12. Подготовка очищенной воды

Наполните один сосуд Коплина 50 мл очищенной воды. Используйте при температуре окружающей среды. Меняйте после каждого использования.

13. Подготовка раствора этилового спирта (70%, 85%, и 100%) -

Подготовьте растворы с объемным содержанием 70% и 85%, используя 100% этиловый спирт и очищенную воду. Хранить при комнатной температуре в плотно закрытых контейнерах, когда не используется. Растворы могут быть использованы в течение одной недели, если только не происходит их испарения, или раствор становится разбавленным или мутным из-за чрезмерного использования.

Процедура депарафинизации предметных стекол

Примечание: Добавьте одно стекло ProbeChek для отрицательного контроля и одно стекло ProbeChek для положительного контроля начиная с 14 этапа.

14. Провести термообработку неокрашенных образцов и контрольных стекол от 2 до 24 часов при температуре 60°C в ThermoBrite.
15. Погрузите предметные стекла в первый сосуд Коплина, содержащий Немо-Де на 5 минут при комнатной температуре.
16. Повторите шаг 15 дважды, используя каждый раз свежий Немо-Де.

7. Дегидрируйте предметные стекла в 100% этиловом спирте в течение 1 минуты при температуре окружающей среды. Повторите процедуру во втором сосуде Коплина с 100 % этиловым спиртом.
8. Позвольте стеклам высохнуть на воздухе от 2 до 5 минут (опционально).

Предварительная обработка предметных стекол

19. Погрузите до восьми стекол в Раствор для предварительной обработки Vysis, который заранее был подогрет до $80 \pm 2^\circ\text{C}$ на 12 ± 3 минут.

Примечание: При необходимости, два стекла могут быть помещены вплотную в каждом пазе сосуда Коплина, а одно стекло помещается в каждом торцевом пазе. Для стекол в торцевых пазах, сторона стекла с образцом ткани должна быть обращена к центру сосуда. Максимум восемь стекол можно поместить в сосуд Коплина одновременно.

20. Погрузите стекла в очищенную воду на 3 минуты.

Предварительная обработка протеазой

21. Уберите стекла из очищенной воды.
22. Удалите излишек воды, осушив края стекол о бумажное полотенце.
23. Погрузите предметные стекла в раствор протеазы, заранее подогретый до $37 \pm 1^\circ\text{C}$ на 20 ± 2 минут.
24. Погрузите стекла в очищенную воду на 3 минуты.

Процедура гибридизации

Необходимо использовать ThermoBrite для этапов денатурации и гибридизации. Обратитесь к руководству по эксплуатации ThermoBrite для получения инструкций по использованию аппарата.

25. Погрузите стекла в 70% раствор этилового спирта на одну минуту.
26. Погрузите стекла в 85% раствор этилового спирта на одну минуту.
27. Погрузите стекла в 100% раствор этилового спирта на одну минуту.
28. Позвольте стеклам высохнуть на воздухе от 2 до 5 минут.
29. Смочите карту влажности водой и поместите ее в отделение для карт ThermoBrite. Убедитесь, что поверхность ThermoBrite чистая и свободная от мусора.
30. Установите температуру денатурации (Melt Temp) на 73°C и время денатурации (Melt Time) на три минуты. Установите температуру гибридизации (Hyb Temp) на 37°C , а время гибридизации (Hyb Time) от 14 до 24 часов.
31. Нанесите 10 мкл смеси пробы на предметное стекло и незамедлительно накройте покровным стеклом. Убедитесь, что в смеси пробы нет пузырьков воздуха, перед тем как накрыть покровным стеклом.
32. Запечатайте покровное стекло каучуковым клеем.
33. Поместите предметные стекла в ThermoBrite и запустите программу гибридизации. Проводите гибридизацию на стеклах в течение суток от 14 до 24 часов.
- По окончании процедуры гибридизации, переходите к **процедуре промывки предметных стекол.**

Примечание: Оставьте стекла в ThermoBrite до готовности начать работу.

Процедура промывки предметных стекол

Примечание: Стекла, прошедшие гибридизацию, необходимо промыть в день, когда гибридизация была завершена.

34. Налейте 50 мл промывочного буфера I в сосуд Коплина. Применять при температуре окружающей среды. Используйте в течение одного дня, а затем утилизируйте.
35. Налейте 50 мл промывочного буфера II в сосуд Коплина. Поместите сосуд Коплина на водяную баню при комнатной температуре перед нагреванием, чтобы предотвратить повреждение сосуда. Дайте сосуду нагреться до $74 \pm 1^\circ\text{C}$ перед использованием, по крайней мере, за 30 минут до использования. Используйте в течение одного дня, а затем утилизируйте.
36. Удалите каучуковый клей с одного стекла, минимально затрагивая покровное стекло, и погрузите предметное стекло в промывочный буфер I при температуре окружающей среды. Повторите с остальными стеклами и оставьте на 2-5 минут, чтобы покровные стекла отделились от предметных стекол.

Примечание: Для поддержания нужной температуры промывочного буфера II, промывайте только четыре предметных стекла одновременно. Если есть меньше, чем четыре стекла, то

добавить пустые стекла, чтоб довести общее число до четырех. Начинайте отсчет времени после погружения четвертого стекла.

37. Сразу же погрузите стекла в промывочный буфер II при температуре $74 \pm 1^\circ\text{C}$. Аккуратно помешайте в течение 1 - 3 секунд. Повторите процедуру с остальными стеклами.

38. Вытащите стекла через 2 минуты.

Примечание: Убедитесь, что температура промывочного буфера II равна $74 \pm 1^\circ\text{C}$ перед промывкой следующих четырех стекол.

Процедура контрастного окрашивания

39. Позвольте стеклам высохнуть на воздухе в защищенном от света месте при температуре окружающей среды.

40. Нанесите 10 мкл контрастного красителя DAPI на целевую область предметного стекла, накройте покровным стеклом и оставьте в защищенном от света месте, как минимум, на 5 минут.

41. Подсчитайте пробы под флуоресцентным микроскопом в течение 4 часов, или храните при температуре -20°C ($\pm 10^\circ\text{C}$).

Процедура архивирования (опционально)

Храните предметные стекла гибридизации при -20°C ($\pm 10^\circ\text{C}$) в защищенном от света месте.

В данных условиях стекла могут храниться до одной недели после нанесения контрастного красителя DAPI I без значительных потерь в интенсивности флуоресценции сигнала.

Примечание: Позвольте стеклам принять температуру окружающей среды перед изучением.

Изучение предметного стекла

42. Изучайте стекла, используя подходящий набор фильтров на нормально работающем флуоресцентном микроскопе (смотрите раздел Оснащение микроскопа и вспомогательные принадлежности – Фильтры данной инструкции).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ И ОТЧЕТ О РЕЗУЛЬТАТАХ

Контроль качества

Оценка адекватности гибридизации предметного стекла

43. Оцените адекватность гибридизации контрольного предметного стекла, используя нижеприведенные критерии:

- **Морфология ядра:** Границы ядер опухоли, отмеченные DAPI, должны, как правило, быть различимы, а ядра иметь хорошую целостность.
- **Фон:** Фон не должен иметь частичек, которые мешают подсчету.

Примечание: Флуоресцентная дымка или свечение может быть заметна за границами ядра, и пока эта дымка/туман не закрывает ядро и не затрудняет подсчет, она допустима.

- **Интенсивность сигнала пробы:** Сигналы должны быть яркими, четкими, и легко поддающимися оценке. Сигналы должны быть яркими, компактными, круглыми или овальной формы. Следует избегать чрезмерно диффузно-рассеянных сигналов.
- Большая часть целевых зон просмотра должна отвечать данным критериям качества.
- Целевая зона просмотра должна содержать минимум 50 клеток для оценки.
- Если адекватность гибридизации контрольного предметного стекла отвечает критериям гибридизации, то проведите оценку адекватности гибридизации предметного стекла (этап 44) для всех предметных стекол. Если адекватность гибридизации контрольного предметного стекла не отвечает критериям, то смотрите раздел **Контроль качества, Использование контрольных предметных стекол** для дополнительной информации по использованию контрольных стекол.

Оценка предметных стекол

44. Определите целевую зону просмотра

- Используйте окрашенное H&E предметное стекло для подтверждения целевой зоны просмотра перед изучением FISH стекол.
- Используйте 10 – 25-кратный объектив и полосный фильтр DAPI для определения интересующей области гибридизации.
- Избегайте зон омертвления и зон, где границы ядра нечеткие. Пропускайте ядра с контрастной окраской, недостаточной для определения границ ядра.

45. Оценка целевой зоны

- Используя 60 – 100-кратный объектив, применяйте указанные фильтры для изучения качества ALK сигналов и качества морфологии ткани. Отрегулируйте глубину фокуса и ознакомьтесь с размерами и формой целевых сигналов и шумов (мусора). Убедитесь, что фон выглядит темным и относительно свободным от сильной флуоресценции, которая может затруднить подсчет.
- Изучите всю помеченную область(и). Обратите внимание на распределение сигнала между опухолевыми клетками во время сканирования, чтобы выбрать репрезентативную область для подсчета.

46. Выберите и подсчитайте клетки в целевой области

- Выберите область с хорошим распределением ядер (т.е. ту, где отдельные ядра могут быть различимы) и убедитесь, что выбранные для подсчета области являются репрезентативными по распределению изучаемых сигналов.
- Используя 60 – 100-кратный объектив и указанные фильтры, проанализируйте клетки, выбранные для подсчета, и зафиксируйте сигналы в каждой клетке.
- Перейдите к следующей репрезентативной области для подсчета.
- Повторяйте шаги 2 и 3 пока все 50 клеток не будут подсчитаны.
- Завершите подсчет, после того, как 50 клеток из выбранной репрезентативной области были изучены.

Примечание: Диафрагма осветителя микроскопа может быть сужена вокруг целевых клеток для облегчения подсчета.

47. Правила подсчета сигналов

- Настраивайте фокус, чтоб выявить все сигналы, присутствующие в ядре. Подсчитайте сигналы в пределах границ ядра каждой интерфазной раковой клетки в соответствии с инструкциями, приведенными в Диаграмме 1.
- Клетки считаются отрицательными (не-реаранжированными) когда:
 - Оранжевый и зеленый сигналы располагаются вплотную или объединяются (кажутся желтыми под Оранжевым/Зеленым фильтром V2). Оранжевые и зеленые сигналы, расположенные на расстоянии меньше, чем два диаметра сигнала, считаются одиночным объединенным сигналом (Диаграмма 2, Секция 1).
 - Присутствует одиночный зеленый сигнал без соответствующего оранжевого сигнала (Диаграмма 2, Секция 1).
- Клетки считаются положительными (реаранжированными) когда:
 - Присутствует как минимум один набор оранжевых и зеленых сигналов, расположенных на расстоянии равном или превышающем два диаметра сигнала (Диаграмма 2, Секция 2).

Присутствует одиночный оранжевый сигнал без соответствующего зеленого сигнала в дополнение к объединенным и/или разъединенным сигналам (Диаграмма 2, Секция 2).

Диаграмма 1

Руководство по подсчету сигналов ALK

- Одиночный оранжевый сигнал
- Одиночный зеленый сигнал
- Расположенные рядом или объединенные оранжевые и зеленые сигналы

Секция Типичные схемы сигналов	1: Методические указания:
	А. Отдельные оранжевые или зеленые сигналы считаются одиночными сигналами.

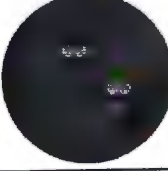
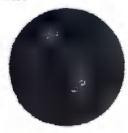
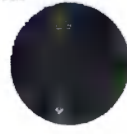
	В. Диффузные сигналы могут иметь расплывчатый или удлинённый вид нити ДНК и должны учитываться как одиночные сигналы.
	С. Расположенные рядом оранжевые и зеленые сигналы, находящиеся на расстоянии меньше, чем два диаметра сигнала, или которые накладываются друг на друга, считаются одним объединенным сигналом. Многочисленные объединенные и/или разъединенные сигналы могут наблюдаться в одном ядре.
	Д. Если диффузные сигналы расположены рядом или связаны нитями, они должны учитываться как один объединенный сигнал. Многочисленные объединенные и/или разъединенные сигналы могут наблюдаться в одном ядре.
	Е. Два сигнала одного цвета и одинакового размера, находящиеся на расстоянии меньше, чем два диаметра сигнала, нужно учитывать как один сигнал (это расщепленный сигнал).

Диаграмма 2

Руководство по подсчету сигналов ALK

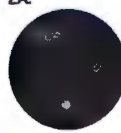
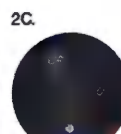
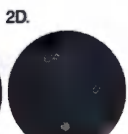
Профиль сигнала 1: Отрицательный

Секция 1. Расположенные рядом или объединенные оранжевые и зеленые сигналы

1A.  1B.  1C. 	А. и В. Данные примеры содержат объединенные оранжевые и зеленые сигналы. Данные сигналы или накладываются друг на друга, или расположены рядом, или находятся на расстоянии меньше, чем два диаметра сигнала. С. Одиночный зеленый сигнал без соответствующего оранжевого сигнала в дополнение к объединенным и/или разъединенным сигналам указывает на делецию оранжевой части ALK-пробы и считается отрицательным. Целевая область лекарственного препарата находится в области расположения оранжевой пробы. Ядра, содержащие сигналы только одного цвета, не подлежат подсчету.
---	---

Профиль сигнала 2: Положительный

Секция 2: Разделенные сигналы или удаленный зеленый

2A.  2B.  2C.  2D. 	Данные ядра содержат реаранжированные или "разъединенные" сигналы, расположенные на расстоянии равном или превышающем 2 диаметра. А. В ядре может быть более одного набора разъединенных сигналов. В. В ядре могут находиться объединенный(ые) сигнал(ы) и разъединенный(ые) сигнал(ы). С. В ядре может находиться одиночный оранжевый сигнал (удаленный зеленый сигнал) в дополнение к объединенным и/или разъединенным сигналам. Примечание: Ядро, содержащее сигналы только одного цвета, не должно учитываться. Д. Одно и то же ядро может иметь объединенные сигналы, разъединенные сигналы и делеции.
---	--

Протоколирование подсчета сигналов

48. Зафиксируйте схемы сигналов для 50 ядер.

- Для каждого ядра запишите количество объединенных (находящихся рядом) сигналов.
- Для каждого ядра запишите количество одиночных оранжевых сигналов.
- Для каждого ядра запишите количество одиночных зеленых сигналов.
- Каждая клетка подсчитывается только один раз вне зависимости от количества перестроек и/или делеций, которые в ней содержатся.
- Не учитывайте ядра, не содержащие сигналы или с сигналами только одного цвета (без объединенных и/или разъединенных сигналов). Подсчитывайте только те ядра, которые имеют один или более FISH сигналов каждого цвета.
- Не считайте ядро, если в нем содержатся слабые или чрезмерно расплывчатые сигналы.

Протоколирование результатов для статуса ALK

49. Классифицируйте каждое ядро в соответствии с Таблицей 1.

Таблица 1

Классификация клеток как Положительных и Отрицательных

Профиль сигнала	Количество расположенных рядом или объединенных сигналов	Количество одиночных оранжевых сигналов	Количество одиночных зеленых сигналов	Классификация клетки
1A, 1B	≥ 1	0	0	Отрицательная
1C	≥ 1	0	≥ 1	Отрицательная
2A, 2B, 2D	≥ 0	≥ 1	≥ 1	Положительная
2C	≥ 1	≥ 1	0	Положительная

50. Определите количество клеток, отнесенных к отрицательным.

51. Определите количество клеток, отнесенных к положительным.

52. Образец считается отрицательным, если < 5 клеток из 50 ($< 5/50$ или $< 10\%$) являются положительными.

53. Образец считается положительным, если > 25 клеток из 50 ($> 25/50$ или $> 50\%$) являются положительными.

54. Образец считается сомнительным, если 5 - 25 клеток (10 - 50%) являются положительными. Если образец является сомнительным, то второй подсчет должен оценить предметное стекло.

- Первый и второй заходы подсчета клеток суммируются, и высчитывается процентное соотношение на 100 клеток (средний процент положительных клеток).
- Если средний процент положительных клеток $< 15\%$ ($< 15/100$), то образец считается отрицательным.
- Если средний процент положительных клеток $\geq 15\%$ ($\geq 15/100$), то образец считается положительным.

Неинформативный результат:

Обозначьте образец как неинформативный, если образец не прошел проверку на качество, описанную в разделе Оценка адекватности гибридизации предметного стекла.

- Если в помеченной области находится менее 50 ядер опухоли, которые поддаются подсчету для образца, то образец считается неинформативным.

Использование контрольных предметных стекол

- Контрольные предметные стекла должны обрабатываться одновременно с предметными стеклами пациента для мониторинга процедуры анализа и для оценки точности подсчета сигналов. Контрольные предметные стекла должны обрабатываться вместе со стеклами, содержащими образцы, начиная с этапа 14 - Процедура депарафинизации предметных стекол (термообработка при 60°C).
- Контрольные стекла должны запускаться при каждом FISH анализе и с каждой новой партией наборов.

Установленный диапазон приемлемого проведения анализа для контрольных стекол ProbeCheck ALK указан в Сертификате качества, специфичном для каждого набора, который прилагается к комплекту контрольных стекол.

Если контрольное предметное стекло не отвечает каким-либо критериям приемлемости, то анализ, возможно, был проведен неправильно или компоненты комплекта для FISH анализа ALK Break Apart сработали неадекватно. Ни в коем случае нельзя учитывать результаты FISH анализа, если какое-либо контрольное стекло не дало результатов. Необходимо будет провести повторный анализ со свежими контрольными предметными стеклами и клиническим материалом.

Рекомендации и устранение ошибок

При просмотре результатов FISH анализа, убедитесь, что микроскоп правильно настроен и функционирует в оптимальном режиме.

В нижеприведенной таблице перечислены некоторые ошибки, которые могут возникнуть при использовании LSI проб. Также включены возможные причины и предложения по улучшению качества анализа.

Проблема	Возможная причина	Возможное решение
Отсутствие сигнала или слабые сигналы	Используется неподходящий набор фильтров для просмотра стекол	Используйте рекомендованные фильтры
	Микроскоп работает неправильно	Свяжитесь с техническим представителем завода-изготовителя
	Неподходящие лампы (например, ксеноновые или вольфрамовые)	Используйте ртутную лампу (100-ваттная рекомендуется)
	Слишком старая ртутная лампа	Замените лампу на новую
	Ртутная лампа ненастроена	Настройте лампу
	Грязные или треснувшие концентрирующие линзы	Очистите или замените линзы
	Грязные или разбитые зеркала в фонаре	Очистите или замените зеркала
	Неподходящее время гибридизации	Проверьте время гибридизации
	Неподходящая температура пост-гибридизационной промывки	Проверьте температуру Промывочного буфера II
	Пузырьки воздуха, попавшие под покровное стекло, помешали доступу к пробе	Опускайте покровное стекло, вначале касаясь поверхности смеси пробы
	Недостаточная ферментация протеазой	Проверьте температуру раствора протеазы
	Срез чрезмерно зафиксирован (границы клеток будут четко выраженными)	Большее время фиксации тканей может привести к постепенному ухудшению интенсивности сигнала и требует большего времени погружения
Неинформативный результат	Слишком мало ядер (<50) доступно для подсчета	Повторите анализ с новым предметным стеклом
Фон с помехами	Недостаточная точность промывки	Проверьте температуру Промывочного буфера II
Изменение интенсивности сигнала в рамках среза образца ткани	Проба неровно расположена на стекле из-за пузырьков воздуха под покровным стеклом	Повторите анализ на соседнем срезе того же блока тканей и убедитесь, что пузырьки воздуха не попали под покровное стекло
		Опускайте покровное стекло, вначале касаясь поверхности смеси пробы
Потеря ткани или ухудшении морфологии ткани	Срез ткани недостаточно зафиксирован (слабое окрашивание DAPI)	Проверьте время ферментации протеазой
	Разрушение ДНК (слабое окрашивание DAPI)	Проверьте условия фиксации
	Использование неподходящих стекол	Используйте положительно заряженные стекла

Неправильная термообработка стекол	Проверьте температуру ThermoBrite
Чрезмерная предварительная обработка	Проверьте время и температуру Раствора для предварительной обработки Vysis
Чрезмерная денатурация (Melt Time)	Проверьте Melt time.
Срез ткани порвался при снятии покровного стекла после гибридизации	Нужно больше времени, чтоб покровное стекло снялось в промывочном буфере

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

• ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ.

- Оптимальная результативность данного анализа требует соответствующей обработки образцов, их подготовки и хранения как описано в данной инструкции.
- Набор реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe был оптимизирован только для выявления и подсчета реаранжировок в гене ALK в зафиксированных в формалине и залитых парафином образцах ткани НМРЛ человека. Анализ должен проводиться только на FFPE образцах тканей рака легких, зафиксированных в 10% нейтральном буферном формалине. Другие типы тканей или фиксаторов запрещено использовать.
- Результативность набора реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe была установлена при использовании процедур, описанных в данной инструкции. Отклонение от данных процедур может повлиять на результативность анализа.
- Клиническая интерпретация любых результатов анализа должна проводиться в контексте истории болезни пациента и других результатов диагностических лабораторных анализов.
- Результаты FISH анализа не могут быть информативными, если качество образцов и/или подготовка предметного стекла были недостаточными.

Технологи, выполняющие подсчет FISH сигналов, должны быть способны визуально различать оранжевые, зеленые

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Стандартные предельные значения

Стандартное предельное числовое значение определяется как максимальное количество учитываемых интерфазных ядер со специфической аномальной схемой сигналов, при которых образец считается отрицательным. Стандартное предельное значение выражается в процентном соотношении фактического количества FISH схем с перестройкой к общему количеству исследованных ядер. Стандартное предельное значение составляет 15% для FFPE образцов ткани НМРЛ.

РЕАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТИ

Локализация проб в метафазных хромосомах

Локализация гибридизации набора реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe была выявлена при помощи метафазных пластинок (в количестве восьми) из культивированных лимфоцитарных препаратов в сочетании с техникой обратного дифференциального окрашивания хромосом DAPI. Пробы Vysis LSI 3'-ALK SpectrumOrange и Vysis LSI 5'-ALK SpectrumGreen, компоненты Двухцветной LSI Vysis ALK Break Apart FISH Probe показали способность создавать гибриды с целевым локусом (2p23) на всех 8 метафазных пластинках и нигде более.

Аналитическая чувствительность и специфичность

Аналитическая чувствительность определяется как процент хромосомных мишеней с ожидаемой нормальной схемой сигнала. Аналитическая специфичность определяется как процент сигналов, которые гибридизуются с правильным локусом, а не с другим местом.

Аналитическая чувствительность и специфичность FISH проб Vysis LSI 3'-ALK SpectrumOrange и Vysis LSI 5'-ALK SpectrumGreen были установлены при использовании метафазных хромосом, полученных из 6 культур периферической крови кариотипически нормальных образцов от 5 разных доноров (6 серий предметных слайдов).

Для расчета аналитической чувствительности, сигналы FISH проб Vysis LSI 3'-ALK SpectrumOrange и Vysis LSI 5'-ALK SpectrumGreen были подсчитаны для каждой метафазной пластинки (норма = 2 сигнала). В общей сложности, 240 сигналов ожидалось получить для каждой пробы (2 сигнала на клетку x 20 метафазных пластинок на серию x 6 серий предметных слайдов). Смотрите таблицу 2.

Для расчета аналитической специфичности, было подсчитано количество метафазных пластинок с ожидаемой схемой сигналов. В общей сложности, 120 метафазных пластинок было определено (20 метафазных пластинок x 6 серий предметных слайдов). Смотрите таблицу 3.

Для каждой пробы аналитическая чувствительность по расчетам равна 100.0% (240/240)(95% CI 98.5 – 100.0) и аналитическая специфичность равна 100% (120/120)(95% CI 97.0 – 100.0).

Таблица 2

Аналитическая чувствительность

Проба	Количество сигналов метафазной хромосомы		Чувствительность	
	Всего положительных	Всего ожидаемых	Точечная оценка (%)	Доверительный интервал 95%
Vysis LSI 3'-ALK SO	240	240	100,0	(98,5, 100,0)
Vysis LSI 5'-ALK SGr	240	240	100,0	(98,5, 100,0)

Таблица 3

Аналитическая специфичность

Проба	Количество метафазных пластинок			Специфичность	
	Всего ложно положительных	Всего действительно положительных	Всего ожидаемых	Точечная оценка (%)	Доверительный интервал 95%
Vysis LSI 3'-ALK SO	0	120	120	100,0	(97,0, 100,0)
Vysis LSI 5'-ALK SGr	0	120	120	100,0	(97,0, 100,0)

Бактериальное заражение

Набор реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe соответствует требованиям для микробиологически неконтролируемых продуктов в соответствии с “Руководством по производству изделий для диагностики в лабораторных условиях” (1/10/1994), поскольку ни один из реагентов не способствует росту избранных микроорганизмов, а фактически убивает внесенный инокулят микроорганизмов, о чем свидетельствует отсутствие роста культуры. Кроме того, во время анализа реагентов при обычной процедуре контроля качества, все реагенты показали удовлетворительные результаты даже после трех дней инкубации избранных организмов при температуре от 35 до 37°C.

Воспроизводимость контрольных предметных слайдов

Воспроизводимость контрольных слайдов была выявлена при помощи трех наборов отрицательных контрольных слайдов ProbeChek ALK и набора положительных контрольных слайдов ProbeChek ALK. Каждая серия слайдов использовалась в течение 5 непоследовательных дней на протяжении 23-дневного периода времени и оценивалась тремя подсчетами на общую сумму 90 точек данных (3 серии x 5 использований x 3 подсчета = 45 оценок на каждый тип контрольного слайда).

Для каждого образца были оценены схемы сигналов 50 ядер при помощи подсчета количества объединенных сигналов, одиночных оранжевых сигналов и одиночных зеленых сигналов для каждой цели каждым подсчетом.

Не было выявлено статистической разницы в FISH классификации 3 подсчетами при анализе Фишера-Фримена-Холтона с доверительным уровнем 0,05. (Смотрите таблицы 4 и 5). Таким образом, было доказано, что наборы отрицательных контрольных слайдов ProbeChek ALK и наборы положительных контрольных слайдов ProbeChek ALK могут быть классифицированы по

воспроизводимости результатов. Все слайды в данном исследовании соответствовали спецификациям.

Таблица 4

Воспроизводимость отрицательных контрольных слайдов ProbeChek ALK

Количество наблюдений с процентом ALK перестроек

Подсчет	В рамках стандарта ($\leq 8\%$)	Вне стандарта ($> 8\%$)	Всего
1	15	0	15
2	15	0	15
3	15	0	15

анализ Фишера-Фримена-Холтона p -значение = 1,0

Таблица 5

Воспроизводимость положительных контрольных слайдов ProbeChek ALK

Количество наблюдений с процентом ALK перестроек

Подсчет	В рамках стандарта ($\geq 20\%$)	Вне стандарта ($< 20\%$)	Всего
1	15	0	15
2	15	0	15
3	15	0	15

анализ Фишера-Фримена-Холтона p -значение = 1,0

Воспроизводимость образцов

Воспроизводимость образцов оценивалась при помощи FFPE срезов опухолей легких. Данное изучение проводилось на шести последовательных срезах (5 мкм), сделанных из двадцати FFPE блоков образцов тканей НМРЛ. Выборка включала три положительных образца с $> 50\%$ клеток с перестройкой ALK, три образца в диапазоне от 10% до 50% клеток с перестройкой ALK, и четырнадцать отрицательных образцов с $< 10\%$ клеток с перестройкой ALK. По два предметных слайда были подготовлены из каждого образца, и каждое стекло оценивалось двумя подсчетами. Оценивалась воспроизводимость между подсчетами (Таблица 6) и среди предметных слайда (Таблица 7). Набор реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe показал способность к воспроизводимости, на основе анализов между подсчетами и среди предметных стекол, что дало в результате p -значение = 1,0 статистического анализа Фишера-Фримена-Холтона.

Таблица 6

Воспроизводимость между подсчетами

Количество членов выборки			
	Отрицательных	Положительных	Всего
Подсчет 1	14	6	20
Подсчет 2	14	6	20
Подсчет 3	14	6	20

анализ Фишера-Фримена-Холтона p -значение: 1,0

Таблица 7

Воспроизводимость среди предметных слайдов

Количество членов выборки			
	Отрицательных	Положительных	Всего
Стекло 1	14	6	20
Стекло 2	15	5	20
Стекло 3	14	6	20

анализ Фишера-Фримена-Холтона p -значение: 1,0

Внешняя воспроизводимость

Воспроизводимость набора реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe оценивалась тремя независимыми лабораториями методом анализа выборки из 12 закодированных, распределенных случайным образом образцов (6 уникальных образцов, по 2 предметных стекла на каждый), которая состояла из четырех уникальных ALK-положительных, с различным уровнем положительности (члены выборки 1, 2, 3, и 6) и двух уникальных ALK-отрицательных (члены выборки 4 и 5) FFPE образцов ткани НМРЛ.

Три партии реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe было использовано для оценки. Подход состоял в воссоздании каждого предметного отрицательного контрольного слайда ProbeChek ALK и предметного положительного контрольного слайда ProbeChek ALK, а также каждого члена выборки. Каждое из трех мест проведения клинического исследования воспроизводимости выборки использовало две из трех партий материала. Каждый из двух технологов на каждом из трех мест проведения исследования подсчитывал 6 рабочих образцов вместе с контрольными предметными слайдами один раз в день, на протяжении 5 не последовательных дней, на каждую партию реагентов, на протяжении 20-дневного периода. В каждом месте проведения исследования было изучено по 120 образцов, общим количеством 360. В результате было произведено по 240 подсчетов в каждом месте проведения исследований, с общим минимальным количеством подсчетов 720. В каждом месте проведения исследований было изучено по 40 контрольных слайдов (20 положительных и 20 отрицательных слайдов), общим количеством 120. В результате было произведено по 80 подсчетов в каждом месте проведения исследований, с общим минимальным количеством подсчетов 240. Для каждого члена выборки и контрольных слайдов были подсчитаны схемы сигналов в 50 ядрах двумя подсчетами.

Общий коэффициент каппа составил 0,92 (95% CI 0,85 – 0,98). Z-показатель равен 27,08, что больше, чем 1,96, показывал коэффициент каппа значительно отличающийся от нуля при доверительном уровне 0,05. Данные результаты представлены в Таблице 8. Общий процент совпадений (РА) среди всех подсчетов составил 97,64% (95% CI 96,25 – 98,52). Положительный процент совпадений (PPA) был 96,46% (95% CI 94,40 – 97,78), а отрицательный процента совпадений (NPA) был 100,00% (95% CI 98,42 – 100,00). Результаты представлены в Таблице 9. Коэффициент каппа показал воспроизводимость для каждого места проведения исследований, с диапазоном от 0,83 до 0,96, для каждой партии, с диапазоном от 0,86 до 0,96. Результаты представлены в Таблицах 10 и 11, соответственно.

Таблица 8

Общая воспроизводимость

Количество слайдов в местах проведения/партиях/подсчетах			
	Отрицательных	Положительных	Всего
Член выборки 1	1	59	60
Член выборки 2	0	60	60
Член выборки 3	2	58	60
Член выборки 4	60	0	60
Член выборки 5	60	0	60
Член выборки 6	4	56	60
Статистика каппа: 0,92 (0,85, 0,98)			

Таблица 9

Процент совпадений среди всех подсчетов с ожидаемыми результатами

Ожидаемые результаты			
Результаты подсчетов	Отрицательных	Положительных	Всего
Положительных	463	0	463
Отрицательных	17	240	257
Всего	480	240	720
РА: 97,64 (95% CI 96,25 – 98,52)			
PPA: 96,46% (95% CI 94,40 – 97,78)			

Таблица 10

Воспроизводимость по месту проведения исследований

		Количество стекол на местах / подходах/подсчетах		Каппа анализ			
Партия	Член выборки	Отрицательных	Положительных	Каппа	95% CI	Стандартное отклонение	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 11

Воспроизводимость по партии

		Количество стекол на местах / подходах/подсчетах		Каппа анализ			
Партия	Член выборки	Отрицательных	Положительных	Каппа	95% CI	Стандартное отклонение	Z- показатель
1	1	0	20	0,86	(0,75, 0,98)	0,059	14,75
	2	0	20				
	3	2	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

Применение монопрепарата XALKORI в лечении местно-распространенного или метастатического ALK-позитивного НМРЛ было исследовано в 2 комплексных, неконтролируемых исследованиях (исследования А и В). Пациенты, включенные в данные исследования, ранее получали системное лечение, за исключением 15 пациентов в исследовании В, которые не имели ранее системного лечения местно-распространенного или метастатического заболевания. Данные для исследования В не доступны, поскольку ALK-положительность была определена с помощью ряда местных анализов. В исследовании А, ALK-позитивный НМРЛ был определен с помощью набора реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe. Основным показателем эффективности в обоих исследованиях была частота объективных ответов (ORR) в соответствии с критериями оценки ответа солидных опухолей на терапию (RECIST). Ответ был оценен исследователем и независимой группой экспертов радиологии. Продолжительность ответа (DR) также была оценена. Пациенты получали по 250 мг XALKORI перорально дважды в день. Демографические данные и характеристики заболевания в исследовании А приведены в таблице 12.

Таблица 12

Демографические данные и характеристики заболевания в исследовании А

Характеристики		N = 136
Пол, количество (%)	Мужской	64 (47)
	Женский	72 (53)
Возраст (года)	Средний (диапазон)	52 (29 – 82)
Раса, количество (%)	Европеоидная	87 (64)
	Негроидная	5 (4)
	Азиаты	43 (32)
	Другие	1 (1)
Общее состояние на начальном уровне по шкале ECOG-ВОЗ, количество (%)	0	37 (27)
	1	74 (54)
	2-3 ^a	25 (18)
Статус курильщика, количество (%)	Никогда не курил	92 (68)
	Бывший курильщик	39 (29)
	Нынешний курильщик	5 (4)
Стадия заболевания, количество (%)	Местнораспространенный	9 (7)
	Метастатический	127 (93)
Гистологическая классификация, количество (%)	Аденокарцинома	130 (96)
	Крупноклеточный рак	1 (1)
	Плоскоклеточная карцинома	0
	Железисто-плоскоклеточная карцинома	3 (2)
	Другие	2 (2)
Предварительное системное лечение местнораспространенного или метастатического заболевания количество режимов, количество (%)	1	13 (10)
	2	37 (27)
	3	37 (27)
	≥4	49 (36)

^a Включает 1 пациента с состоянием 1 по шкале ECOG-ВОЗ при тестировании, но с 3 на начальном этапе

Сто тридцать шесть пациентов с местно-распространенным или метастатическим ALK-позитивным НМРЛ из исследования А были изучены на момент среза данных. Средняя продолжительность лечения составляла 22 недели. На основании оценки исследователя, было выявлено 1 полный и 67 частичных ответов при ORR 50% (95% ДИ: 42%, 59%). Семьдесят девять процентов объективных ответов опухоли были достигнуты в течение первых 8 недель лечения. Средняя продолжительность ответа составила 41,9 недель. Данные по эффективности исследований представлены в таблице 13.

Таблица 13

Результаты эффективности исследования A^a местнораспространенного или метастатического ALK-позитивным НМРЛ с использованием набора реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe

Параметр эффективности	N = 136
ORR (CR + PR ^b)[%(95% CI)]	50%(42%, 59%)
Количество пациентов с терапевтическим эффектом	68
Длительность ответа ^c [средняя (диапазон) недель]	41.9 (6.1+, 42.1+)

a Ответ был определен исследователем.

b Один пациент не поддавался оценке на ответ.

c Предварительная оценка с применением метода Каплана-Мейера.

+ Усеченные данные

CR = Полный ответ

PR = Частичный ответ

7. ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

По вопросам качества продукции обращаться: ООО «СервисИнструмент» по телефону (499) 616 4050, или e-mail: sip.07@bk.ru.

Для получения технической помощи, звоните в службу технической поддержки Abbott Molecular по телефону +1-800-553-7042 в США, или для международных звонков +49-6122-580, или посетите сайт компании Abbott Molecular: <http://www.abbottmolecular.com>.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, и SpectrumGold являются торговыми марками компаний Abbott Group в различных юрисдикциях. Все другие торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

Набор реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe, и другие многочисленные продукты для FISH проб ДНК защищены патентами в США 5,663,319 и 5,491,224, принадлежащими Abbott Molecular. Флуоресцентные маркировочные пробы Vysis LSI защищены патентами в США RE40,494, 6,596,479, 7,115,709, 5,756,696 и 6,607,877, 6,280,929 и эксклюзивно лицензированы для Abbott Molecular Inc. членами правления Калифорнийского университета.

Методы обнаружения нескольких сигналов гибридизации одновременно защищаются патентом 6,203,977, эксклюзивно лицензированы для Abbott Molecular Inc. Йельским университетом.

Адрес производителя



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



© Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической лабораторной
Диагностики ГБОУ ДПО РМАПО
Минздрава России,
д.м.н., профессор

В.В. Долгов

Пронумеровано, прошито,
скреплено печатью 2
(двадцать пять) ли

Генеральный директор
ООО "СервисИнструмент"
В.М. Гуськов Гуськов В.М.

