

Е.Ю. Чиркова

«23» марта 2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению Набор реагентов
«PrenatFISH® для флуоресцентной гибридизации *in situ*»
“PrenatFISH®”
по ТУ 21.20.23-001-42874316-2021

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «PrenatFISH® для флуоресцентной гибридизации *in situ*» “PrenatFISH®” по ТУ 21.20.23-001-42874316-2021 предназначен для использования в качестве вспомогательного средства для качественного обнаружения анеуплоидий хромосом 13, 18, 21, X и Y. Набор применяется при анализе образцов амниотической жидкости плода, полученных в процессе амниоцентеза, если по результатам скрининга выявлен (подтвержден) высокий (1/100 и выше) риск хромосомной аномалии и/или порока развития плода, ассоциированных с хромосомными аномалиями.

Медицинское изделие для *in vitro* диагностики, одноразового применения, нестерилизуемое, нестерильное.

Функциональное назначение.

Вспомогательное средство в диагностике.

Популяционные и демографические аспекты

Популяционные ограничения отсутствуют.

Показания к применению:

проведение исследования культивированных и некультивированных амниоцитов при амниоцентезе.

проведение обследований пациентов на 15-20 неделе внутриутробного развития плода с целью диагностики хромосомной патологии плода при наличии показаний к проведению обследований, факторов риска (возраст родителей, ультразвуковые и биохимические маркеры), а также при поздней постановке на учет и отсутствии других пренатальных исследований.

Противопоказания:

Нет.

Возможные побочные эффекты:

При использовании набора реагентов по инструкции по применению побочные действия не выявлены.

Область применения:

клиническая лабораторная диагностика.

Потенциальные пользователи:

Лабораторные подразделения лечебно-профилактических учреждений.

Профессиональный уровень потенциальных пользователей

Врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

Связь между хромосомными мутациями и врожденными пороками развития активно исследовались на протяжении всего 20 века. В настоящий момент однозначно доказана роль анеуплоидий (количественных хромосомных мутаций) в этиологии таких наследственных синдромов, как Синдром Патау, Синдром Эдвардса, Синдром Дауна, Синдром Шерешевского-Тёрнера, Синдром Клайнфельтера и др. С помощью метода FISH проводят исследования анеуплоидий плода на ранних сроках беременности, что позволяет принять решение о прерывании беременности в случае выявления хромосомной патологии. Преимуществом данного метода является то, что для проведения исследования можно использовать интерфазные клетки, а сам тест занимает не более 2 дней. Это существенно отличает его от классического кариотипирования, которое можно проводить только

на метафазных клетках, а для проведения анализа необходима культивация клеток, которая занимает не менее 2 недель.

Изменение количества хромосом не приводит к изменению геномных последовательностей, но вызывает нарушение дозы генов, что в свою очередь приводит к дисрегуляции клеточных процессов.

Идентификация анеуплоидий возможна по ключевым хромосомным участкам, которые традиционно используются цитогенетиками для их визуализации. Идентификация таких хромосом, как 18, X и Y осуществляется по специфичной альфа-сателлитной ДНК – D18Z1, DXZ1 и DYZ3, расположенных на центромерах соответствующих хромосом. Каждая хромосома в норме содержит только одну центромеру, по этой причине подсчет количества центромер считается объективным подходом в идентификации анеуплоидий. В случае с 13 и 21 хромосомами данный подход применять невозможно, т.к. они имеют идентичные последовательности альфа-сателлитной ДНК. Для их идентификации используются уникальные последовательности ДНК. Хромосомные регионы 13q14 и 21q22.2 являются ключевыми областями для манифестации синдрома Патау и синдрома Дауна, соответственно. По этой причине многие ученые выбирают данные области для идентификации и подсчета количества копий 13 и 21 хромосом. Визуализация специфических хромосомных областей основана на принципе комплементарности (соответствия) меченой ДНК (входящей в тест-системы) и ДНК-мишени (исследуемая область хромосомы). Фрагменты ДНК, меченные флуорохромами, в процессе гибридизации диффундируют в область комплементарных последовательностей и закрепляются на них за счет образования водородных связей. По завершению гибридизации проводят отмывку препаратов от избыточного количества ДНК-зондов и дополнительно окрашивают красителем DAPI. Данный краситель используется в качестве общего красителя ДНК, позволяя разграничить области ядер разных клеток, что является важным при подсчете основных сигналов меченой ДНК. Таким образом, в качестве анализата выступают участки ДНК, специфичные хромосомам 13, 18, 21, X и Y.

Влияние интерферирующих веществ

Интерферирующие вещества гемоглобин (в концентрации 1000 мг/дл), билирубин (в концентрации 60 мг/дл) и триглицериды (в концентрации 50 мг/дл) не оказывают влияния на результаты анализа в исследованных концентрациях.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Набор реагентов «PrenatFISH® для флуоресцентной гибридизации *in situ*» «PrenatFISH®» по ТУ 21.20.23-001-42874316-2021,

в составе:

- | | |
|---|--------------------------|
| 1) ДНК-зонды (13/21) | – 1 пробирка (0,1 мл); |
| 2) ДНК-зонды (18/X/Y) | – 1 пробирка (0,1 мл); |
| 3) Комплектующие: | |
| 3.1) Краситель DAPI (DAPI) | – 1 пробирка (0,3 мл); |
| 3.2) Пепсин сухой (ПС) | – 4 пробирки (по 20 мг); |
| 3.3) Буфер пепсина (БП) | – 4 флакона (по 50 мл); |
| 3.4) Буфер цитратно-солевой с игепалом 1 (БИ-1) | – 1 флакон (200 мл); |
| 3.5) Буфер цитратно-солевой с игепалом 2 (БИ-2) | – 2 флакона (по 200 мл); |
| 3.6) Буфер цитратно-солевой (БЦ) | – 1 флакон (200 мл); |
| 3.7) Буфер фосфатно-солевой (БФ) | – 2 флакона (по 200 мл); |
| 3.8) Буфер фосфатно-солевой с формальдегидом и хлоридом магния (БФ-Ф) | – 1 флакон (200 мл); |
| 3.9) Буфер цитратно-солевой с игепалом 3 (БИ-3) | – 1 флакон (200 мл). |
| 4) Инструкция по применению | – 1 экз. |
| 5) Паспорт | – 1 экз. |

Компоненты набора упакованы в общую коробку. Коробка содержит инструкцию по применению, а также Паспорт, которые вложены в коробку.

Функциональные характеристики изделия:

- Набор реагентов позволяют провести исследование 10 образцов, с использованием комплектующих.
- Компоненты набора реагентов готовы к применению. Комплектующие набора реагентов №№3.1, 3.4-3.9 готовы к применению. Содержимое комплектующего набора № 3.2 (Пепсин сухой (ПС)) требуется перенести во флакон комплектующего № 3.3 (Буфер для пепсина (БП)) непосредственно перед использованием.

Методы стерилизации изделия

Изделие не требует стерилизации.

Программное обеспечение работы изделия

Отсутствует.

Техническое обслуживание и ремонт изделия

Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

В основе работы набора лежит качественный метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Настоящее изделие применяется для оценки количества клинически значимых аутосом и половых хромосом плода (пренатальный скрининг) с целью выявления таких аномалий, как трисомия 13 хромосомы (Синдром Патау), трисомия 18 хромосомы (Синдром Эдвардса), трисомия 21 хромосомы (Синдром Дауна), моносомия X хромосомы (Синдром Шерешевского-Тёрнера), кариотип 47, XXУ (Синдром Клайнфельтера), а также другие анеуплоидии половых хромосом (X и Y). Материал для исследования получают из амниотической жидкости плода (методом амниоцентеза, то есть аспирации околоплодных вод). Полученные образцы клеток фиксируют и наносят на предметные стекла для последующей пробоподготовки. ДНК-зонды, входящие в состав набора – раствор двунитевых молекул ДНК, меченных флуорохромами, наносят на поверхность клеток и выполняют температурную обработку (денатурация при плюс 72°C и гибридизация при плюс 37°C). На стадии денатурации происходит расхождение комплементарных нитей ДНК исследуемых клеток и ДНК-зондов набора. На стадии гибридизации происходит ренатурация меченой ДНК со специфической ДНК клеток, соответствующей анализируемым областям генома. По завершению гибридизации препараты отмывают от излишков ДНК-зондов и заключают в защитную среду с красителем DAPI. Анализ препаратов проводят под флуоресцентным микроскопом. Идентификация анеуплоидий происходит на основе визуальной информации о количестве и локализации флуоресцентных сигналов в ядрах интерфазных клеток. Каждый флуоресцентный сигнал указывает на расположение одной копии соответствующей хромосомы. В норме каждая исследуемая клетка содержит по два сигнала 13, 18 и 21 хромосомы, а также два сигнала X хромосомы в случае женского кариотипа или по одному сигналу X и Y хромосомы в случае мужского кариотипа. Скрининг анеуплоидий плода по 13, 18, 21, X и Y хромосомам является социально значимой задачей, т.к. нарушения количества данных хромосом приводит к рождению детей с множественными пороками развития.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность и специфичность набора определялась на архивных клинических образцах предоставленных испытательной лабораторией и подтверждены на стандартных образцах предприятия.

Таблица 1. Аналитические и диагностические характеристики Набор реагентов «PrenatFISH® для флуоресцентной гибридизации *in situ*» "PrenatFISH®" по ТУ 21.20.23-001-42874316-2021.

Характеристики	Чувствительность		Специфичность	
	Способ расчета	Значение	Способ расчета	Значение
Аналитические характеристики	Аналитическая чувствительность определяется на препаратах, содержащих клетки с анеуплоидией по 13, 18, 21, X или Y хромосомам человека, как отношение количества клеток с выявленной анеуплоидией к общему количеству истинно анеуплоидных клеток. Величина выражается в процентах.	100%	Аналитическая специфичность определяется на препаратах, содержащих клетки без анеуплоидии по 13, 18, 21, X и Y хромосомам человека, как отношение количества клеток без выявленных анеуплоидий к общему количеству истинно нормальных клеток. Величина выражается в процентах.	100%
Диагностические характеристики	Диагностическая чувствительность определяется как отношение количество пациентов с полученными положительными тестами к общему количеству пациентов с истинно положительными тестами. Величина выражается в процентах.	100%	Диагностическая специфичность определяется как отношение количество пациентов полученными с отрицательными тестами к общему количеству пациентов с истинно отрицательными тестами. Величина выражается в процентах.	100%

Повторяемость и воспроизводимость результатов анализа составляет 100%.

Влияние интерферирующих веществ на результаты анализа.

Интерферирующие вещества:

- гемоглобин (в концентрации 1000 мг/дл);
 - билирубин (в концентрации 60 мг/дл);
 - триглицериды (в концентрации 50 мг/дл);
- не оказывают влияния на результаты анализа.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для FISH-исследований с использованием набора применяют образцы клеток амниотической жидкости (культивированных и некультивированных).

Для всех протоколов отбор материала осуществляется в профильных ЛПУ (Лечебно-профилактические учреждения) квалифицированными медиками. Возможно использование готовых, а также уже исследованных препаратов, имеющихся в распоряжении медицинских организаций.

Сбор биологического материала должен производиться в соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 «Обеспечение качества клинических лабораторных исследований».

Образцы клеток амниотической жидкости получают путем амниоцентеза на 15-20 неделе беременности.

Образцы до исследования рекомендуется хранить при температуре $+2+8^{\circ}\text{C}$. Для получения достоверных результатов рекомендуется производить фиксацию или культивирование клеток в минимально возможные сроки после забора образцов клеток, но не позднее 48 часов от момента сбора образцов. Клетки, фиксированные фиксатором Карнуа (3:1), можно хранить в течение одного года при температуре -20°C .

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ МЗ РФ №4н от 6 июня 2012 г.), ГОСТ 31508.

Реагенты, входящие в состав комплектующих набора (БИ-1, БИ-2, БИ-3, БФ, БФ-Ф, БЦ), содержат натрия азид в безопасной концентрации.

Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение правил "Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений" (Утв. Минздравом СССР 17 января 1991 г.), ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003).

Не допускается использование набора и его компонентов после истечения срока годности или при наличии видимых дефектов.

При работе с набором следует использовать лабораторную одежду, перчатки и защитные очки для защиты кожных покровов и глаз от прямых контактов с компонентами набора.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Необходимое оборудование, реагенты и материалы, не входящие в набор

Дополнительные реагенты

- Этанол (96%): хранить при температуре от 15°C до 25°C;
- Дистиллированная вода (dH₂O) или деионизированная вода (ООО «Смолы», Россия, ТУ 20.13.52-002-25346627-2018): хранить при температуре от 15°C до 25°C.

Расходные материалы

- Предметные стекла размером 26x76x1 мм или 25x75x1 мм ("Герхард Менцель Б.В. & Ко.КГ", Германия);
- Покровные стекла размером 22x22 мм ("Герхард Менцель Б.В. & Ко.КГ", Германия);
- Специальный клей для герметизации покровных стекол (например, резиновый клей Rubber Cement Fixogum. Фирма Marabu GmbH & Co. KG, Германия, кат. № 29010017000);
- Ёмкость стеклянная Коплина (фирма Ningbo Greetmed Medical Instruments Co Ltd, Китай);
- Полипропиленовые пробирки (15 мл или 50 мл);
- Пинцеты;
- Ручка (карандаш) с алмазным наконечником.

Оборудование

- Фазово-контрастный микроскоп (световой микроскоп);
- Центрифуга лабораторная с ротором на 12 пробирок объемом 1,0 – 2,0 мл (например, Центрифуга медицинская СМ-6МТ. Фирма ELMi Ltd., Латвия.);
- Вортекс лабораторный для пробирок объемом 1,0 – 2,0 мл (например, Центрифуга "Фуга/вортекс Микро-Спин FV-2400". Фирма SIA "Biosan", Латвия, РУ ФС № 2005/518 от 05.04.2005);
- Гибридайзер;
- Механический дозатор переменного объема от 2,0 до 20,0 мкл (например, Ленпипет. Фирма ЗАО «Термо Фишер Сайентифик», Россия);
- Механический дозатор переменного объема от 100 до 1000 мкл (например, Ленпипет. Фирма ЗАО «Термо Фишер Сайентифик», Россия);
- Наконечники полимерные одноразовые до 200 мкл. (например, «Термо Фишер Сайентифик» для одноканального дозатора на (5 – 200) мкл. АО "Термо Фишер Сайентифик", РУ № ФСР 2007/01431 от 15.11.2016 г.);
- Наконечники полимерные одноразовые до 1000 мкл. (например, «Термо Фишер Сайентифик» для одноканального дозатора на 100-1000) мкл. АО "Термо Фишер Сайентифик", РУ № ФСР 2007/01431 от 15.11.2016 г.)
- Секундомер;
- Водяная баня (37 ± 2 °C, 72 ± 2 °C, и 80 ± 2 °C). Например, Баня-термостат водяная WB-4MS (Фирма SIA "Biosan", Латвия);
- Воздушный термостат (37 ± 2 °C);
- Столик с подогревом;
- Мерный цилиндр;
- Откалиброванный (например, термометр лабораторный ТЛ-7 исполнение 1. ОАО "ТЕРМО-ПРИБОР", Россия);
- Флуоресцентный микроскоп с подходящими наборами фильтров (например, Микроскоп медицинский прямой ВХ для лабораторных исследований, вариант исполнения ВХ43F. Фирма Olympus Corporation, Япония).

Минимальные требования к флуоресцентному микроскопу: он должен быть класса не ниже лабораторного, быть оснащен цветной или черно-белой камерой (совместимой с микроскопом), а также оснащен фильтрами, имеющими показатели, указанные в Таблице 1.

Таблица 2. Длины волн флуорохромов ДНК-зондов и их соответствие светофильтрам.

Флуорофор	Пик возбуждения (нм)	Пик излучения (нм)	Название свето-фильтра	Эквивалентные флуорохромы
CytoOrange™	551	575	SpectrumOrange; TRITC	PlatinumBright550; SpectrumOrange
CytoGreen™	495	518	SpectrumGreen; FITC	PlatinumBright495; SpectrumGreen; Флуоресцеина изотиоцианат
CytoAqua™	422	471	SpectrumAqua; AQUA	PlatinumBright415; SpectrumAqua;

2. Приготовление рабочих растворов

1. 90 % Этанол

Реагенты	Требуемая масса/объем	Конечная концентрация
Этанол (96%)	93,5 мл	
dH ₂ O	7,6 мл	
ВСЕГО	100 мл	90 %

2. 70 % Этанол

Реагенты	Требуемая масса/объем	Конечная концентрация
Этанол (96%)	72,7 мл	
dH ₂ O	30,0 мл	
ВСЕГО	100 мл	70 %

3. Проведение анализа амниоцитов

3.1. Пробоподготовка амниоцитов

Для выполнения протоколов пробоподготовки клеток амниотической жидкости рекомендуется использовать Комплектующие набора реагентов «PrenatFISH® для флуоресцентной гибридизации in situ» «PrenatFISH®» по ТУ 21.20.23-001-42874316-2021. Расход комплектующих составляет по 50 мл каждого реагента (одна порция) на 5 препаратов при их одновременной обработке. При невозможности проведения одновременной обработки 5 препаратов допускается последовательная обработка препаратов с использованием одной порции каждого реагента комплектующих в течение 2 недель, при условии их хранения в закрытой емкости при температуре +2°C – +8°C. Не допускается использование одной порции каждого реагента комплектующих более 2 недель после начала их использования или для обработки более чем 5 препаратов. Комплектующих достаточно для обработки 20 препаратов (10-ти препаратов ДНК-зондов (13/21) и 10-ти препаратов ДНК-зондов (18/X/Y)).

Некультивированные образцы:

Для пробоподготовки некультивированных образцов потребуются следующие Комплектующие Набора реагентов «PrenatFISH® для флуоресцентной гибридизации in situ» «PrenatFISH®» по ТУ 21.20.23-001-42874316-2021: цитратно-солевой буфер (БЦ), Пепсин сухой (ПС), Буфер для пепсина (БП); фосфатно-солевой буфер (БФ), фосфатно-солевой буфер с формальдегидом и хлоридом магния (БФ-Ф).

1. Предварительно прогрейте до требуемой температуры флаконы со следующими Комплектующими: Буфер для пепсина (БП); Буфер цитратно-солевой с игепалом 1 (БИ-1); Буфер цитратно-солевой с игепалом 2 (БИ-2); Буфер цитратно-солевой (БЦ); Буфер фосфатно-солевой (БФ); Буфер фосфатно-солевой с формальдегидом и хлоридом магния (БФ-Ф); Буфер цитратно-солевой с игепалом 3 (БИ-3).

2. Выдержите предметные стекла с образцами амниоцитов (препараты) в емкости Коплина с цитратно-солевым буфером (БЦ) при 37 °C в течение 1 часа.

3. Приготовьте готовый раствор пепсина. Для этого количественно перенесите содержимое одной пробирки Пепсина сухого (ПС) в один флакон Буфера для пепсина (БП) и тщательно перемешайте.

4. Погрузите препараты в емкость Коплина с предварительно нагретым готовым раствором пепсина при 37 °С на 1 – 10 минут (в зависимости от состояния образцов) и контролируйте состояние клеток под световым микроскопом.

5. Промойте препараты в емкости Коплина фосфатно-солевым буфером (БФ) при комнатной температуре в течение 5 минут.

6. Постфиксируйте препараты в емкости Коплина с фосфатно-солевым буфером с формальдегидом и хлоридом магния (БФ-Ф) при комнатной температуре в течение 5 минут.

7. Промойте препараты в емкости Коплина с фосфатно-солевым буфером (БФ) при комнатной температуре в течение 5 минут. Переходите к обезвоживанию препаратов.

Культивированные образцы:

Для пробоподготовки культивированных образцов потребуются следующие Комплектующие набора реагентов «PrenatFISH® для флуоресцентной гибридизации in situ» «PrenatFISH®» по ТУ 21.20.23-001-42874316-2021: цитратно-солевой буфер (БЦ), Буфер цитратно-солевой с игепалом 1 (БИ-1); Буфер цитратно-солевой с игепалом 2 (БИ-2); Буфер цитратно-солевой с игепалом 3 (БИ-3).

1. Предварительно прогрейте до требуемой температуры флаконы со следующими Комплектующими: Буфер цитратно-солевой с игепалом 3 (БИ-3).

2. Выдержите предметные стекла с образцами амниоцитов (препараты) в емкости Коплина с цитратно-солевым буфером с игепалом 3 (БИ-3).

Обезвоживание препаратов

1. Погрузите препараты в емкость Коплина с 70% раствором этанола при КТ на 3 минуты.

2. Погрузите препараты в емкость Коплина с 90% раствором этанола при КТ на 3 минуты.

3. Погрузите препараты в емкость Коплина с 96% раствором этанола при КТ на 3 минуты.

4. Высушите на воздухе препараты.

3.2. Подготовка ДНК-зондов

1. Предварительно прогреть пробирки с ДНК-зондами (13/21) и (18/X/Y) при КТ в течение 5 – 10 минут.

2. Затем пробирки с ДНК-зондами (13/21) и (18/X/Y) необходимо осадить на центрифуге, тщательно перемешать на центрифуге "Фуга/вортекс Микро-Спин FV-2400" и повторно отцентрифугировать.

3.3. Совместная денатурация и гибридизация

Нанесите 10 мкл ДНК-зондов на каждую область гибридизации и накройте покровными стеклами размером 22x22 мм.

Не оказывайте давление на покровное стекло! Пузырьки воздуха, если они имеются, следует удалить путем легкого и аккуратного постукивания по стеклу.

Герметично заклейте покровные стекла специальным клеем.

Проведите совместную денатурацию образцов клеток с ДНК-зондами при 72 °С в течение 5 минут.

Поместите препараты в предварительно нагретую увлажненную камеру гибридизации (гибридаizer) и инкубируйте их при 37 °С в течение ночи (16 часов).

3.4. Промывка после гибридизации

1. Предварительно прогрейте до требуемой температуры флаконы со следующими Комплектующими: Буфер цитратно-солевой с игепалом 1 (БИ-1); Буфер цитратно-солевой с игепалом 2 (БИ-2); Буфер цитратно-солевой (БЦ).

2. Отметьте каждую область гибридизации на обратной стороне предметных стекол карандашом с алмазным наконечником. Осторожно удалите клей.

3. Погрузите препараты в емкость Коплина с цитратно-солевым буфером (БЦ) на 1 минуту при КТ, чтобы ослабить покровные стекла. Аккуратно встряхните, чтобы покровные стекла отсоединились без посторонней помощи, не тяните их.

4. Погрузите препараты в емкость Коплина с предварительно нагретым до 72 °С цитратно-соле-

5. Погрузите препараты в емкость Коплина с цитратно-солевым буфером с игепалом 2 (БИ-2) при КТ на 2 минуты.

Обезвоживание препаратов

1. Погрузите препараты в емкость Коплина с 70% раствором этанола при КТ на 1 минуту.
2. Погрузите препараты в емкость Коплина с 90% раствором этанола при КТ на 1 минуту.
3. Погрузите препараты в емкость Коплина с 96% раствором этанола при КТ на 1 минуту.
4. Высушите на воздухе предметные стекла.

3.5. Визуализация

Нанесите 15 мкл красителя DAPI на область гибридизации и закройте покровным стеклом размером 22x22 мм. Изучите препараты под флуоресцентным микроскопом с подходящими наборами светофильтров.

4. Интерпретация результатов.

4.1. Оценка качества препаратов

Проверьте качество препаратов, используя следующие критерии:

- Интенсивность флуорохромов ДНК-зондов должна быть высокой, а сам сигнал должен быть четким и легко различимым. При хорошем качестве препаратов сигналы обычно имеют округлую или овальную формы. Размеры флуоресцентных пятен могут варьировать от клетки к клетке, но имеют относительно одинаковую площадь сигналов гомологичных участков хромосом внутри одного ядра. Интенсивность сигналов считается удовлетворительной, если фотокамера регистрирует сигналы при экспозиции не более 1000 мс. В этом случае полученное необработанное изображение соответствует интенсивности сигналов наблюдаемой в окулярах микроскопа. При экспозиции фотокамеры более 1000 мс происходит накопление сигналов фонового свечения, что приводит к получению изображения с неудовлетворительным соотношением сигнал/фон.
- Фон на препарате должен выглядеть контрастно темным или черным, свободным от флуоресцирующих частиц или загрязнений.
- ДНК-зонды должны формировать флуоресцентные сигналы без значительного фона в области ядра клетки.

Наличие нечетких сигналов, сигналов низкой интенсивности, нарушения формы сигналов, значительного фона или загрязнений может указывать на отклонение от оптимальных условий проведения FISH-анализа. Рекомендуется оптимизировать условия пробоподготовки и изготовить новый препарат. Варианты оптимизации протокола указаны в таблице № 2.

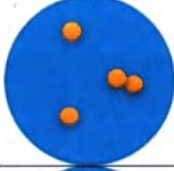
4.2. Выбор области анализа

Переведите микроскоп на объектив 20-кратного увеличения. Найдите область, в которой клетки лежат достаточно разрежено, не перекрываясь друг с другом. Избегайте зон с высокой плотностью клеток, где клетки лежат с наложением, и индивидуальные контуры ядер клеток невозможно проследить. Следует подсчитывать клетки с дискретными сигналами.

4.3. Подсчет сигналов

Переведите микроскоп на объектив 40-кратного или 60-кратного увеличения. Произведите подсчет сигналов в клетках, опираясь на примеры, отображенные в таблице № 3. Подсчитывайте только те клетки, в которых присутствует один или более сигналов любого цвета. При использовании двойного светофильтра для одновременного подсчета сигналов двух цветов (например, сигналов X и Y хромосом) руководствуются теми же принципами, которые указаны в таблице № 3 (каждый цвет анализируется независимо). При анализе сложных или спорных сигналов следует использовать объективы 60-кратного или 100-кратного увеличения.

Таблица 3. Варианты анализа сигналов

№	Пример FISH-сигналов	Результат подсчета
1		Всего в клетке два сигнала.
2		Всего в клетке два сигнала. Один сигнал диффузный.
3		Всего в клетке три сигнала.
4		Всего в клетке три сигнала. Один сигнал расщепленный.
5		Всего в клетке четыре сигнала. Два сближенных сигнала считаются как два, если между ними нет видимых связей (мостиков/перетяжек) и они имеют приблизительно одинаковый размер.
6		Рекомендуется пропускать такие клетки, т.к. это может быть как одна клетка, так и две.
7		Рекомендуется пропускать скопления клеток, т.к. невозможно будет произвести независимый подсчет сигналов в каждой из клеток.

Количество сигналов одного цвета обычно варьирует в диапазоне от 0 до 4 на одну клетку. Количество сигналов в норме указано в таблице № 3. Если сигналы от всех 5 хромосом присутствуют в анализируемых клетках в большем количестве, чем в норме (по 3 или по 4 сигнала на клетку), то данные клетки считаются полиплоидными.

Таблица 4. Количество FISH-сигналов в норме

ДНК-зонды	Хромосома	Цвет флуорохрома	Количество сигналов в норме	
			Женский пол	Мужской пол
(13/21)	13	Зеленый	2	2
	21	Оранжевый	2	2
(18/X/Y)	18	Голубой	2	2
	X	Зеленый	2	1
	Y	Оранжевый	0	1

В некоторых случаях могут наблюдаться мозаичные формы анеуплоидий. Такие случаи требуют осторожной интерпретации, особенно при частоте анеуплоидных клеток пять и менее процентов. Некоторые такие случаи объясняются случайным попаданием тканей матери в исследуемый образец при трансабдоминальном способе забора амниотической жидкости. Это легко прослеживается

на половых хромосомах в случае мужского пола плода. Кроме того, наличие небольшого процента анеуплоидных клеток в амниотической жидкости указывает только на вероятность обнаружения аналогичных мутаций в клетках самого плода, а не является прямым доказательством их наличия. Также стоит отметить, что при культивировании клеток часть мозаичных форм анеуплоидий могут быть результатом случайного мутационного процесса, который в культурах клеток идет значительно быстрее, чем внутри организма. Анеуплоидии, выявленные методом FISH, рекомендуется подтверждать методом классического кариотипирования.

Примечание: во время процедуры проведения анализа препарата могут выявиться некоторые проблемы. Наиболее частые проблемы и способы их устранения указаны в Приложении 1 к инструкции по применению.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 18 мес. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

Хранение ДНК-зондов и комплектующих набора реагентов должно осуществляться при разном температурном режиме. Комплектация набора реагентов осуществляется производителем непосредственно перед отправкой заказчику. При хранении коробки, содержащую ДНК-зонды и комплектующие, необходимо вскрыть и разукomплектовать.

Хранение ДНК-зондов набора реагентов «PrenatFISH® для флуоресцентной гибридизации *in situ*» «PrenatFISH®» по ТУ 21.20.23-001-42874316-2021 должно осуществляться в морозильных камерах, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от минус 15 °C до минус 25 °C в течение всего срока годности.

После вскрытия упаковок неиспользованные ДНК-зонды допускается хранить в плотно закрытых упаковках в морозильных камерах, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от минус 15 °C до минус 25 °C, в затемненных условиях до истечения срока годности.

Хранение комплектующих набора реагентов «PrenatFISH® для флуоресцентной гибридизации *in situ*» «PrenatFISH®» по ТУ 21.20.23-001-42874316-2021 должно осуществляться в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от плюс 2 °C до плюс 8 °C до истечения срока годности. Срок годности комплектующих набора – 18 мес. Замораживание комплектующих набора не допускается!

После вскрытия упаковок с комплектующими неиспользованные реагенты допускается хранить в плотно закрытых упаковках в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентируемый температурный режим, при температуре от плюс 2 °C до плюс 8 °C до истечения срока годности.

Транспортирование

Транспортирование наборов и комплектующих осуществляется в термоконтейнерах с хладоэлементами при температуре внутри термоконтейнера от плюс 2 °C до плюс 8 °C в течение 7 дней транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Замораживание комплектующих не допускается! Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

УТИЛИЗАЦИЯ

Указание на необходимость специальных мер предосторожности при уничтожении неиспользованных медицинских изделий:

Использованный набор реагентов и комплектующие к нему в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" отно-

сится к классу Б (эпидемиологически опасные отходы) – инфицированные и потенциально инфицированные отходы. Материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" и МУ 287-113 "Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения".

ТРЕБОВАНИЯ К ДЕЗИНФЕКЦИИ, СТЕРИЛИЗАЦИИ И ОЧИСТКЕ

Требования к очистке

Очистке не подлежит.

Требования к дезинфекции

Дезинфекции не подлежит.

Требования к стерилизации

Изделие не стерильное и не предназначено для стерилизации.

ТРЕБОВАНИЯ К ТЕХНИЧЕСКОМУ ОБСЛУЖИВАНИЮ И РЕМОНТУ

Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Набор реагентов «PrenatFISH® для флуоресцентной гибридизации in situ» «PrenatFISH®» по ТУ 21.20.23-001-42874316-2021 соответствует ТУ 21.20.23-001-42874316-2021, Национальным стандартам РФ и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности. По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу 123098, Москва, ул. Гамалеи д. 16, стр. 3, ООО «Медико-Диагностическая Лаборатория», тел. + 7 499 190 30 47, info@m-d-l.ru, www.m-d-l.ru

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных настоящими техническими условиями и инструкцией по применению.

Срок годности набора и комплектующих – 18 месяцев со дня приемки ОБТК предприятия-изготовителя. При этом, срок годности отдельных компонентов набора может быть дольше общего срока годности набора. Общий срок годности набора определяется компонентом, имеющим самый короткий срок годности.

Браком не считаются нарушения изделия, полученные при эксплуатации и неосторожном обращении.

Возможные причины и способы устранения проблем при проведении процедуры анализа

Характер проблемы	Возможная причина	Способ устранения
Слабые сигналы или отсутствие сигналов	Для анализа препараты выбран неверный набор светофильтров	Используйте корректные светофильтры (см. таблицу №1)
	Микроскоп нефункционален	Свяжитесь с техническим представителем завода-изготовителя Вашего микроскопа.
	В микроскопе установлена неподходящая лампа (например, ксеноновая)	Ксеноновая лампа лучше подходит для методики спектрального кариотипирования (SKY/HiSKY). Для FISH-препаратов рекомендуется использовать ртутную лампу высокого давления (100 Ватт).
	Ртутная лампа слишком старая (срок эксплуатации превысил гарантированный срок службы лампы)	Замените старую лампу аналогичной новой лампой.
	Ртутная лампа настроена неправильно	Откалибруйте лампу. При проекции на лист бумаги пучок света должен быть круглой формы и иметь равномерную интенсивность.
	Загрязненные и/или поврежденные собирающие линзы	Очистите или замените собирающие линзы флуоресцентного источника света.
	Загрязненное и/или поврежденное зеркало	Очистите или замените зеркало флуоресцентного источника света
	Неправильные объективы	Используйте объективы, рекомендованные для работы с флуоресцентным светом.
	Недостаточная денатурация ДНК-зондов	Проверьте температуру денатурации, установленную в гибридаيزере. Если температура правильная (72°C), то установить температуру на два градуса больше.
	Неоптимальные условия гибридизации	Проверьте установленную температуру гибридизации в гибридаизере. Должно быть 37°C.
	Неоптимальные условия отмывки после гибридизации	Температура буфера БИ-1 должна быть 72°C. Значительное завышение температуры буфера приводит к полному удалению ДНК-зондов с препарата.
	Воздушный пузырь под покровным стеклом ограничил доступ ДНК-зондов к области гибридизации	Избегайте образования пузырей при нанесении раствора ДНК-зондов на предметное стекло. Старайтесь начинать закрытие покровным стеклом с касания капли раствора ДНК-зондов.
	ДНК-зонды хранились в ненадлежащих условиях	Храните ДНК-зонды в затемненных условиях при температуре от – 25 °C до – 15 °C.
Низкая специфичность сигналов	Неподходящие условия гибридизации	Проверьте в гибридаизере установленную температуру гибридизации. Должно быть 37°C.
	Температура отмывочного буфера БИ-1 слишком низкая	Поддерживайте температуру отмывочного буфера БИ-1 на 72°C. Проверяйте температуру буфера поверенным термометром.

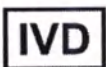
Характер проблемы	Возможная причина	Способ устранения
Высокое фоновое свечение препарата	Препараты подвергались старению с помощью запекания или содержат много цитоплазмы	Увеличьте продолжительность денатурации препаратов до 10 мин.
	Высокое содержание клеточного дебриса (фрагментарных клеток) на препарате	Центрифугируйте клеточную суспензию. Удалите надосадочную жидкость, заменив ее на свежий фиксатор. Ресуспендируйте клетки на вортексе. Повторите смену фиксатора 5 раз. Раскапайте суспензию на чистые предметные стекла.
	Высокое содержание клеточного дебриса (фрагментарных клеток) на препарате.	Слишком низкая или слишком высокая влажность в помещении. Оптимальная относительная влажность для приготовления препаратов от 45 до 55 % при температуре 25 °С.
	Использованы широкополосные светофильтры, пропускающие избыточное количество света.	Переключитесь на светофильтры с более узким диапазоном светопропускания фильтра эмиссии.
	Неоптимальные условия постгибридизационной отмывки препаратов.	Температура воды в водяной бане чаще всего отличается от температуры самого буфера БИ-1. Проверьте температуру промывочного буфера БИ-1, поместив термометр в емкость с буфером.
	Неоптимальные условия постгибридизационной отмывки препаратов.	Если буфер БИ-1 готовился самостоятельно, то проверьте его состав и pH (указан в таблице 4).
	Предметные стекла не были достаточно очищены перед нанесением клеточной суспензии	Используйте специальную смесь для очистки и обезжиривания новых предметных стекол, например, смесь Никифорова (96% этиловый спирт + диэтиловый эфир в соотношении 1:1). После обработки смесью стекла протираются насухо. При повторном использовании предметные стекла могут быть недостаточно хорошо отмыты от предыдущего материала, что может привести к получению ложноположительных результатов. Рекомендуется использовать только новые предметные стекла.
	Клетки культивировались в среде с индикатором феноловый красный, что вызвало свечение препарата в оранжевом/красном светофильтре	Культивируйте клетки в культуральной среде без фенолового красного или проводите большее количество смены фиксатора до нанесения клеток на предметные стекла.
	В процессе пробоподготовки препараты слишком быстро высохли	Повысьте в помещении относительную влажность для приготовления препаратов или воспользуйтесь климатической камерой. Также можно раскапывать клеточную суспензию на предметные стекла, помещенные над водяной баней, с температурой воды 37°C.

Характер проблемы	Возможная причина	Способ устранения
Искаженная морфология хромосом в случае культивированных клеток	Слишком свежие препараты для проведения денатурации	Увеличьте время высушивания препарата. Состарьте препараты: выдержите препараты при комнатной температуре в течение 24 часов.
	Слишком высокая температура денатурации	Проверьте установленную в гибридайзере температуру денатурации. Оптимальная температура денатурации – 72 °С.
	Денатурация препаратов длится слишком долго	Уменьшите время денатурации на 1 минуту. Допустимый диапазон изменения времени денатурации: от 2 до 10 минут.

Показатели pH буферов, входящих в состав комплектующих

рН буфера цитратно-солевого с игепалом 1	7,0±0,5
рН буфера цитратно-солевого с игепалом 2	7,0±0,5
рН буфера цитратно-солевого с игепалом 3	7,0±0,5
Буфер для пепсина (БП)	2,0±0,5
рН буфера цитратно-солевого	7,0±0,5
рН буфера фосфатно-солевого	7,0±0,5
рН буфера фосфатно-солевого с формальдегидом и хлоридом магния	7,0±0,5

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА УПАКОВКЕ И ЭТИКЕТКАХ

	Для диагностики in vitro
	Температурный диапазон
	Изготовитель
ООО «МДЛ»	Логотип
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 15 ЛИСТОВ
«23» марта 2023 год

Ген. Директор
ООО «МЕДИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ
ЛАБОРАТОРИЯ»
Чиркова Е.Ю. 