



Набор зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe (Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit)

ru

Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit

REF 6N38-20

G6-9790/R05

B6N38R

ПРИМЕЧАНИЕ: Изменения выделены

Используемые символы	
GTIN	Глобальный номер товара
	Изготовитель
REF	Каталожный номер
LOT	Номер серии
IVD	Медицинское изделие для диагностики <i>In Vitro</i>
In Vitro Test	Тест <i>In Vitro</i>
	Достаточно для проведения <n> теста(ов)
	Температурный режим
	Внимание, см. прилагаемую документацию
	Использовать до (срок годности)
	См. инструкцию по применению
	Биологические риски
PRODUCT OF USA	Продукт США
	См. раздел «ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ»
EC REP	Авторизованный представитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор зондов Vysis ALK Break Apart FISH представляет собой качественный тест для выявления реаранжировок с вовлечением гена ALK в процессе флуоресцентной гибридизации In Situ (FISH) в зафиксированных в формалине и залитых парафином (FFPE) тканях немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) для более легкого выявления пациентов, допускаемых к лечению XALKORI® (кризотиниб).
Тест предназначен для использования только по назначению врача.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

В наборе зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit для выявления реаранжировок хромосомы 2p23 используется технология флуоресцентной гибридизации In Situ. Реаранжировки локуса ALK на 2p23 наблюдаются при развитии НМРЛ.¹⁻³ В норме ген ALK кодирует трансмембранный гликопротеин с тирозинкиназной активностью интрацеллюлярного домена. Рамочные реаранжировки с известными партнерами слияния приводят к тому, что киназный домен ALK попадает под контроль промотера другого гена. В результате этого синтеза образуется рекомбинантный белок с конститутивной тирозинкиназной активностью, который может играть ключевую роль в контроле клеточной пролиферации.⁴⁻⁶

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

В некоторых публикациях сообщалось, что с использованием Vysis ALK Break Apart FISH Probe были выявлены различные типы реаранжировок с вовлечением гена ALK. При НМРЛ доминирующим ALK-положительным рисунком FISH, выявленным с использованием наборов фильтров с единичной интерференцией [зеленый (FITC), красный (техасский красный) и синий (4', 6-диамидин-2-фенилиндол), а также двойной (красный/зеленый) и тройной (синий, красный, зеленый) полосно-пропускающие фильтры], было слияние и разделение оранжевого и зеленого сигналов (62%), вторым наиболее часто встречающимся рисунком было слияние и одиночный оранжевый (31%) и последний рисунок - одиночный оранжевый и одиночный зеленый сигналы (7%).¹⁰ Рисунки цитогенетической реаранжировки, наблюдаемые при ALK-положительных опухолях, выявляют возможность активирования хромосомных делеций (одиночный оранжевый) и слияние/отсекание, или увеличение числа копийных генов в добавление к классическому сигналу деления, происходящее при реаранжировке ALK с другим геном-партнером.¹⁰ В другом исследовании была протестирована подгруппа из тридцати одного пациента с ALK-положительными рисунками FISH реаранжировок также с использованием методик PCR и RT-PCR, которые не смогли выявить всех известных ALK-партнеров.¹¹

В настоящее время в выявлении ALK НМРЛ не существует стандартных методик, альтернативных набору Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. В соответствии с Инструкциями NCCN (National Comprehensive Cancer Network, Национальная сеть многопрофильных онкологических учреждений) (версия 3.2011) "Немелкоклеточный рак легкого" большим преимуществом методики FISH является то, что доступные на рынке зонды могут быть использованы для выявления ALK-реаранжировок при аденокарциномах легких. Иммуногистохимические (IHC) анализы, использовавшиеся в клинических лабораториях всего мира для выявления ALK-реаранжировок, не способны выявлять большинство аденокарцином легких с ALK-реаранжировками.²¹

Немелкоклеточный рак легкого - самая распространенная причина смертности от рака по всему миру.^{12, 13} Принимая во внимание 5-летний уровень смертности на уровне 85-95%, существует настоятельная потребность в улучшении выявляемости пациентов, которые вероятнее всего ответят на специфическое лечение.¹³ Было показано, что ингибиторы тирозинкиназы снижают пролиферацию клеток рака легкого, что ведет к супрессии роста опухоли.^{9, 14-16}

Терапевтическая эффективность ингибирования ALK в опухолях, выбранных ALK-положительным результатом с использованием FISH было продемонстрировано в ранней фазе клинического исследования низкомолекулярного ингибитора тирозинкиназы ALK. Кроме того, исследование показало, что шестьдесят три из восьмидесяти двух пациентов продолжают получать лечение в момент окончания сбора данных с предполагаемой вероятностью выживаемости без прогрессирования заболевания 72%.¹¹

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ПРОЦЕДУРЫ

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

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

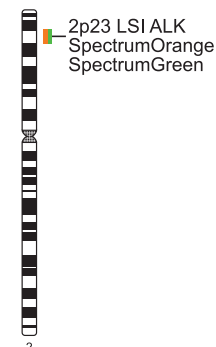
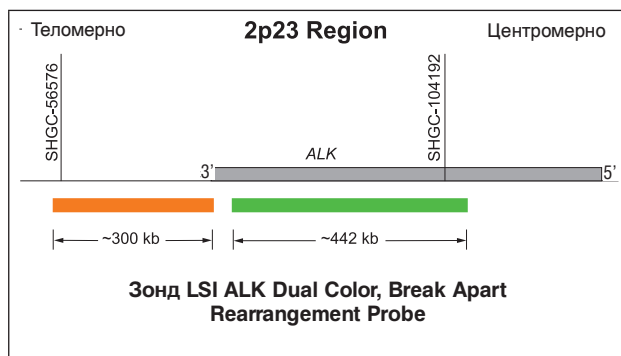
После гибридизации Vysis ALK Break Apart FISH Probes участок ALK 2p23 в своем нативном состоянии виден как два непосредственно примыкающих или наслаившихся (частично совпадающих) оранжевых/зеленых (желтый) сигнала. Однако, если происходит хромосомная реаранжировка в точечном разрыве 2p23 ALK, будут видны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

Описание зонда

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

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

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



РЕАГЕНТЫ

Набор зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit

1. Зонд Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart FISH Probe

(1 флакон, 200 мкл) 50 нг/10 мкл и 200 нг/10 мкл, ДНК-зонды, меченые флуорофором SpectrumOrange и SpectrumGreen, в буфере для гибридизации, содержащем сульфат декстрана, формамид и SSC с блокирующей ДНК.

2. Контрастный краситель DAPI I Counterstain

(1 флакон, 300 мкл) 1 мкг/мл, ДАПИ (4',6-диамидин-2-фенилиндола·2HCl) в фенилендиамин дигидрохлориде, глицерине и забуференном фосфатом физиологическом растворе.

ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ

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

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

Транспортируйте набор зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit на сухом льду.

Если вы получили реагенты в виде, не соответствующем рекомендациям этикетки, или в поврежденной упаковке, обратитесь в службу технической поддержки Abbott Molecular.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

IVD Медицинское изделие для диагностики In Vitro

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO

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



ВНИМАНИЕ: Данный продукт содержит биоматериалы человека и/или потенциально инфекционные компоненты. Ни один из известных методов тестирования не может гарантировать, что материалы, полученные от человека, или инактивированные микроорганизмы не переносят инфекцию. С данными реагентами и образцами человека следует обращаться как с инфекционными, следуя правилам лабораторной безопасности, приведенным в Руководстве Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹⁷, документе M29-A4 CLSI¹⁹, а также в соответствии со Стандартом по обращению с гемоконтактными патогенами, разработанным Управлением США по охране труда и промышленной гигиене (OSHA)¹⁸ и другими правилами биологической безопасности²⁰. Ввиду этого, все материалы, полученные от человека, следует считать потенциально инфекционными.

Эти меры включают, но не ограничиваются ими, следующее:

- При работе с образцами или реагентами надевайте перчатки.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите, не накладывайте косметику и не проводите манипуляций с контактными линзами в помещениях, в которых вы работаете с данными материалами.
- Очищайте и дезинфицируйте все места попадания капель образцов, раствором детергента, например, 1,0% гипохлоритом натрия или другим подходящим дезинфицирующим средством.¹⁷
- Деконтаминируйте и утилизируйте все потенциально инфекционные материалы в соответствии с требованиями регионального законодательства.²⁰
- Избегайте контакта этих образцов с кислотами и сильными щелочами или воздействия высоких температур. Известно, что эти условия разрушают ДНК и могут вести к неправильным результатам теста FISH.
- Для определения мишеней необходимо проводить окрашивание ГЭ (H & E) на каждом 10-м препарате одного и того же тканевого блока.
- Для обеспечения пригодности компонентов набора в течении указанного на этикетке срока годности необходимо их правильно хранить.
- Если в каком-либо из рабочих реагентов появляется осадок, или он становится мутным, такой реагент необходимо утилизировать и приготовить новые растворы.
- Флуорофоры легко подвергаются фотоотбеливанию при попадании на них света. Чтобы минимизировать такую деградацию, работайте со всеми растворами и препаратами, содержащими флуорофоры, при ограниченном свете.

- Для измерения температур растворов, водных бань и инкубаторов требуются откалиброванные термометры.
- Перед каждым использованием обязательно измеряйте температуру раствора предварительной обработки и водных буферов в сосуде коплина откалиброванным термометром.
- Утилизируйте все опасные материалы в соответствии с официальными инструкциями по утилизации опасных веществ.
- Не используйте наборы или реагенты после истечения срока годности.
- Невыполнение всех процедур по денатурации препарата, гибридизации и определению может вести к получению неприемлемых или ошибочных результатов.
- На условиях гибридизации может сказаться использование реагентов, не соответствующее инструкциям Abbott Molecular.

Зонд Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart FISH Probe



Опасность

Компоненты продукта, несущие угрозу: Формамид	
H360	Может нанести ущерб плодовитости или нерожденному ребенку.
P201	Перед использованием получить специальные инструкции.
P202	Не приступать к обработке до тех пор, пока не прочитана и не понята информация о мерах предосторожности.
P281	Удалить содержимое-контейнер в соответствии с местными правилами.
P308+P313	В случае воздействия или обеспокоенности: Обратиться к врачу.
P405	Хранить под замком.
P501	Удалить содержимое/контейнер в соответствии с местными правилами.

Паспорта безопасности: Важная информация о безопасном обращении, транспортировке и утилизации данного продукта содержится в паспорте безопасности.

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности (ПБ) для всех реагентов, поставляемых в комплектах, предоставляются по запросу службой технической поддержки Abbott Molecular.

Примечания по процедуре: До использования разморозьте реагенты при комнатной температуре, перемешайте на вортексе и затем отцентрифугируйте каждую пробирку в течение 2 - 3 секунд на стандартной настольной микроцентрифуге.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

Предоставляемые материалы

- Набор зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (кат. № 06N38-020)

Необходимые, но не предоставляемые материалы

- Набор реагентов для пробоподготовки Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer Kit (кат. № 1N31-05)
- Набор отрицательных контрольных слайдов ProbeChek ALK Negative Control Slides (кат. № 6N38-05)
- Набор положительных контрольных слайдов ProbeChek ALK Positive Control Slides (кат. № 6N38-10)

Лабораторные реагенты

- Нето-Де (или равноценный заменитель, напр., d-лимонен)
- Красители Nematotoxylin и Eosin (H&E)
- Иммерсионное масло для флуоресцентной микроскопии
- Этанол (100%). Хранить при комнатной температуре.
- Дистиллированная вода
- Каучуковый клей

Лабораторные материалы

- Положительно заряженные предметные стекла для микроскопа
- Покровные стекла размером 22 мм x 22 мм
- Микролитровые наконечники для пипеток на 1 - 10 мкл (стерильные)
- Микролитровый пипеттор на 1 - 10 мкл
- Таймер
- Микротом
- Микроцентрифуга
- Мерные цилиндры
- Водяные бани статичные или с циркуляцией (37 °C)

- Водяные бани с циркуляцией (74 и 80 °C)
ПРИМЕЧАНИЕ: Статические водяные бани не обеспечивают требуемый температурный контроль для бань с высокой температурой.
- Водяные бани для дистиллированной воды (от 37 до 42 °C)
- Армированный скрайбер
- Устойчивый к растворителям маркер (опционно)
- Щипцы
- Одноразовый шприц (5 мл)
- Сосуды коплина (12 x 50 мл). Рекомендуемый тип: вертикальный сосуд для окрашивания
- Флуоресцентный микроскоп с рекомендованным(и) фильтром(ами) (см. следующий раздел)
- Откалиброванный термометр
- Вортекс
- Коробки и/или картонные папки для хранения микроскопических препаратов
- ThermoBrite® (кат. № 7J91-10 [110/120 В] или 7J91-20 [200/240 В])
- Карточки-индикаторы влажности ThermoBrite (кат. № 7J68-01)

Оборудование и принадлежности для микроскопа

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

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

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

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

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

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

ПРОТОКОЛ ТЕСТА

Перед проведением подготовки образца изучите раздел «Предупреждения и меры предосторожности» данной инструкции по применению.

Сбор образца и его обработка

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

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

Подготовка препаратов образцов ткани FFPE НМРЛ

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

1. С помощью микротомы сделайте два или более серийных парафиновых среза толщиной 5 ± 1 мкм.
2. Опустите срезы в дистиллированную воду в бане с температурой $40^\circ \pm 2^\circ\text{C}$.
3. Приготовьте препараты срезов на положительно заряженных предметных стеклах для исследования.
4. Дайте препарату высохнуть на воздухе.
5. Проводите окрашивание ГЭ (H & E) одного препарата образца.

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

ПРИМЕЧАНИЕ: Шаг 6 проводится патоморфологом.

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

Подготовка рабочего реагента

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

Процедура депарафинизации препарата

ПРИМЕЧАНИЕ: Включите один препарат отрицательного контроля ProbeChek Negative Control и один препарат положительного контроля ProbeChek Positive Control, начиная с шага 14.

14. Термически обрабатывайте неокрашенные препараты образца и контроля в течение 2 - 24 часов при температуре 60°C в устройстве ThermoBrite.
15. Погрузите препараты в первый сосуд коплина с Немо-De на 5 минут при комнатной температуре.
16. Повторите шаг 15 дважды, каждый раз используя свежий Немо-De.

17. Дегидрируйте препараты в 100% этаноле в течение 1 минуты при комнатной температуре. Повторите во втором сосуде коплина с 100% этанолом.

18. Просушите препараты в течение 2 - 5 минут (опционно).

Предварительная обработка препарата

19. Погрузите до восьми препаратов на 12 ± 3 минут в предварительно нагретый до $80^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ раствор Vysis Pretreatment Solution.

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

20. Погрузите препараты в дистиллированную воду на 3 минуты.

Предварительная обработка протеазой

21. Достаньте препараты из дистиллированной воды.
22. Удалите лишнюю воду, промокнув края препарата бумажным полотенцем.
23. Погрузите препараты в предварительно нагретый до $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ раствор протеазы на 20 ± 2 минут.
24. Погрузите препараты в дистиллированную воду на 3 минуты.

Процедура гибридизации

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

25. Погрузите препараты в 70% этанол на одну минуту.
26. Погрузите препараты в 85% этанол на одну минуту.
27. Погрузите препараты в 100% этанол на одну минуту.
28. Просушите препараты в течение 2 - 5 минут.
29. Смочите карточку-индикатор влажности водой и поместите в отверстие для карточек ThermoBrite. Поверхность ThermoBrite должна быть чистой и без твердых частиц.
30. Установите температуру денатурации (Melt Temp) на 73°C , а время денатурации (Melt Time) - на три минуты. Установите температуру гибридизации (Hyb Temp) на 37°C , а время гибридизации (Hyb Time) - на 14 - 24 часа.
31. Нанесите 10 мкл смеси зондов (probe mixture) на препарат и немедленно наложите покровное стекло. До наложения покровного стекла убедитесь в том, что в смеси зондов нет воздушных пузырьков.
32. Запечатайте покровное стекло каучуковым клеем.
33. Поместите препараты в ThermoBrite и запустите программу гибридизации. Сразу гибридизируйте препараты в течение 14 - 24 часов.

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

ПРИМЕЧАНИЕ: Оставьте препараты в системе ThermoBrite до начала процедуры.

Процедура промывки препарата

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

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

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

37. Немедленно погрузите препарат в промывочный буфер II с температурой $74^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Аккуратно взболтайте в течение 1 - 3 секунд. Повторите на других препаратах.

38. Удалите препараты из буфера после 2 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: До промывки следующих четырех препаратов убедитесь, что температура промывочного буфера II снова $74^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Процедура контрастного окрашивания

39. При комнатной температуре просушите воздухом препарат(ы), защищенный(ые) от света.

40. Нанесите 10 мкл контрастного красителя ДАПИ на область-мишень препарата, наложите покрывное стекло и поместите на хранение в защищенное от света место на 5 минут минимум.

41. Сделайте количественный подсчет на образцах под флуоресцентным микроскопом в течение 4 часов или храните их при -20°C ($\pm 10^{\circ}\text{C}$).

Процедура архивирования (опционно)

Храните гибридизированные препараты при -20°C ($\pm 10^{\circ}\text{C}$) в защищенном от света месте. При этих условиях препараты могут храниться до одной недели после контрастного окрашивания ДАПИ I Counterstain, при этом интенсивность флуоресцентного сигнала не снижается значительно.

ПРИМЕЧАНИЕ: Перед просмотром дайте препаратам нагреться до комнатной температуры.

Исследование препарата

42. Просматривайте препараты с помощью отвечающего требованиям фильтра, установленного на проведение оптимального флуоресцентного микроскопирования (см. раздел данной инструкции по применению Микроскопическое оборудование и аксессуары - Фильтры).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ И СООБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТА

Контроль качества

Оценка адекватности гибридизации препарата

43. Оцените адекватность гибридизации препарата контроля по следующим критериям:

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

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

- **Интенсивность сигнала зонда:** Сигналы должны быть яркими, ясными и легко поддающимися оценке. Сигналы должны быть яркими, однородным, круглой или овальной формы. Избегайте поверхностных диффузных сигналов.
- Большинство рассматриваемых областей-мишеней должны отвечать этим критериям.
- Область-мишень должна содержать по крайней мере 50 клеток, поддающихся оценке.
- Если при оценке адекватности гибридизация препарата контроля отвечает критериям гибридизации, повторите процедуру оценки адекватности гибридизации (шаг 43) для всех препаратов образцов. Если при оценке адекватности гибридизация препарата контроля не отвечает этим критериям, см. дополнительную информацию по использованию препаратов контроля в разделе «Контроль качества, использование препаратов контроля».

Оценка препарата

44. Определите место рассмотрения области-мишени

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

45. Оцените область-мишень

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

46. Выберите и суммируйте клетки области-мишени

- Выберите область четкого распределения ядер (напр., область, в которой можно различить отдельные ядра), выбранные области для суммирования являются репрезентативными по наблюдаемому распределению сигналов.
- Используйте объектив 60X - 100X и рекомендованные фильтры и начинайте анализ клеток, выбранных для суммирования, и зафиксируйте сигналы в каждой клетке.
- Переходите к следующей репрезентативной области для суммирования.
- Повторяйте соответствующий шаг до тех пор, пока 50 клеток не будут суммированы.
- Прекратите, когда суммированы 50 клеток, выбранных из репрезентативных областей.

ПРИМЕЧАНИЕ: Диаметр диафрагмы осветителя микроскопа может быть сужен до диаметра интересующих вас клеток, чтобы облегчить суммирование.

47. Правила суммирования сигналов

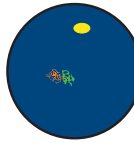
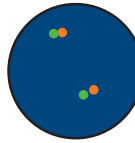
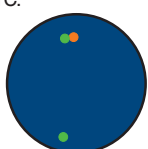
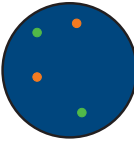
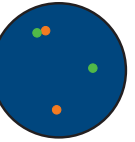
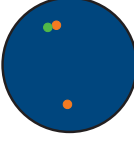
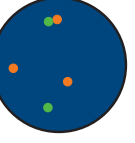
- Регулируйте фокус так, чтобы найти все присутствующие в ядре сигналы. Суммируйте сигналы в границах ядра каждой выбранной интерфазной клетки опухоли в соответствии с инструкциями **Рисунок 1**.
- Клетки считаются отрицательными (не-перегруппированными), если:
 - Оранжевый и зеленый сигналы непосредственно примыкают друг к другу или наслаиваются (желтый сигнал с фильтром Orange/Green V2). Если расстояние между оранжевым и зеленым сигналами менее двух диаметров сигналов, такие сигналы считаются одним наслаившимся сигналом (**Рисунок 2, панель 1**).
 - Присутствует один зеленый сигнал без соответствующего оранжевого сигнала (**Рисунок 2, панель 1**).
- Клетки считаются положительными (перегруппированными) в следующих случаях:
 - Расстояние между оранжевым и зеленым сигналами в по крайней мере одной паре составляет два или более диаметров сигналов (**Рисунок 2, панель 2**).
 - Присутствует один оранжевый сигнал без соответствующего зеленого сигнала в добавление к наслаившимся и/или разорванным сигналам (**Рисунок 2, панель 2**).

Рисунок 1
Инструкция по суммированию сигналов ALK

- Отдельный оранжевый сигнал
- Отдельный зеленый сигнал
- Непосредственно примыкающие или диффузные оранжевый и зеленый сигналы

Панель 1: Типичные рисунки сигналов	Инструкции:
	А. Отдельные оранжевый или зеленый сигналы считаются одиночными сигналами.
	В. Диффузные сигналы могут быть размытыми или иметь вид вытянутого, волокнистого материала ДНК и должны считаться как одиночные сигналы.
	С. Расстояние между непосредственно примыкающими оранжевым и зеленым сигналами менее двух диаметров сигналов или они частично совпадают - такие сигналы считаются как один наслоившийся сигнал. В одном ядре могут наблюдаться несколько наслоившихся и/или разорванных сигналов.
	Д. Если диффузные сигналы непосредственно примыкают друг к другу или соединены волокнами, они должны считаться как один наслоившийся сигнал. В одном ядре могут наблюдаться несколько наслоившихся и/или разорванных сигналов.
	Е. Два сигнала одного цвета, одного размера, и расстояние между которыми менее двух диаметров сигналов, должны считаться как один одиночный сигнал (это расщепленный сигнал).

Рисунок 2
Инструкция по суммированию сигналов ALK

Профиль сигналов 1: Отрицательный	
Панель 1. Непосредственно примыкающие или наслоившиеся оранжевый и зеленый сигналы	
<p>1А. </p> <p>1В. </p> <p>1С. </p>	<p>А. и В. В этих примерах показаны наслоившиеся оранжевый и зеленый сигналы. Сигналы частично совпадают, непосредственно примыкают, или расстояние между ними менее двух диаметров сигналов.</p> <p>С. Одиночный зеленый сигнал без соответствующего оранжевого сигнала в добавление к наслоившимся и/или разорванным сигналам указывает на удаление оранжевой части зонда ALK и считается отрицательным. Область-мишень лекарственного препарата расположена в границах области, на которую нацелен оранжевый зонд.</p> <p>Ядра с сигналами только одного цвета не должны суммироваться.</p>
Профиль сигналов 2: Положительный	
Панель 2: Разорванный или удаленный зеленый сигнал	
<p>2А. </p> <p>2В. </p> <p>2С. </p> <p>2D. </p>	<p>Эти ядра содержат реаранжированные или "разорванные" сигналы, между ними расстояние в 2 или более диаметров сигналов.</p> <p>А. В ядре может быть более одной пары разорванных сигналов.</p> <p>В. В ядре могут быть наслоившийся(еся) или разорванный(е) сигналы.</p> <p>С. В ядре может быть одиночный оранжевый сигнал (зеленый сигнал удален) в добавление к наслоившемуся и/или разорванному сигналам. Примечание: Ядра с сигналами только одного цвета не должны суммироваться.</p> <p>Д. В одном и том же ядре могут быть наслоившиеся сигналы, разорванные сигналы и удаленные сигналы.</p>

Документирование суммирования сигналов

48. Зарегистрируйте рисунки сигналов 50 ядер.

- Для каждого ядра фиксируйте число наслоившихся (примыкающих) сигналов.
- Для каждого ядра фиксируйте число одиночных оранжевых сигналов.
- Для каждого ядра фиксируйте число одиночных зеленых сигналов.

- Отдельная клетка считается только раз, независимо от числа имеющихся в ней реаранжировок и/или удалений.
- Не считайте ядра без сигналов или с сигналами только одного цвета (без наслоившихся и/или разорванных сигналов). Считайте только ядра с одним или более сигналами FISH каждого цвета.
- Не суммируйте ядро, если его сигналы слабые или поверхностно диффузные.

Документирование результатов для определения статуса ALK

49. Классифицируйте каждое ядро в соответствии с Таблицей 1.

Таблица 1
Классификация клеток, положительная или отрицательная

Профиль сигнала	Кол. примыкающих или наслоившихся сигналов	Кол. одиночных оранжевых сигналов	Кол. одиночных зеленых сигналов	Классификация клеток
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 число клеток, классифицированных как отрицательные.
51. Определите число клеток, классифицированных как положительные.
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 неопределенным, если 5-25 клеток (10-50%) являются положительными. Если образец неопределенный, препарат должен исследовать второй специалист.
- Первое и второе считывания подсчета клеток складываются вместе и рассчитывается процент от 100 клеток (средний процент положительных клеток).
 - Если средний процент положительных клеток < 15 % (<15/100), образец считается отрицательным.
 - Если средний процент положительных клеток составляет ≥ 15 % (≥ 15/100) или более, образец считается положительным.

Неинформативный результат:

Обозначьте результат как Неинформативный, если образец не соответствует критериям качества в соответствии с инструкциями раздела «Оценка адекватности гибридизации препарата».

- Если в скрайбированной области образца содержится менее 50 опухолевых клеток, поддающихся суммированию, образец считается неинформативным.

Использование препаратов контроля

- Препараты контроля должны исследоваться вместе с препаратами пациентов для контроля за рабочими характеристиками теста и для оценки точности суммирования сигналов. Препараты контроля должны обрабатываться вместе с препаратами образцов, начиная с **Процедуры депарфинизации препарата**, шаг 14 (термическая обработка при 60°C).
- Препараты контроля необходимо исследовать каждый день проведения тестов FISH и с введением каждого нового лота набора.
- Установленный диапазон приемлемых рабочих характеристик теста ProbeChek ALK Control Slides указан на каждом Сертификате анализа для данного лота, включая набор препаратов контроля.

- Если результаты тестирования контроля не отвечают какому-либо критерию приемлемости, возможно, тест не был проведен правильно, или компоненты набора зондов ALK Break Apart FISH Probe Kit работали неадекватно. Не сообщайте результаты FISH, если тестирование какого-либо препарата контроля показывает ошибку. Потребуется повторное тестирование с использованием свежих препаратов контроля и препарата(ов) клинического(их) образца(ов).

Советы и устранение неисправностей

При рассмотрении результатов теста FISH убедитесь, что микроскоп установлен правильно и функционирует оптимально.

В следующих таблицах приведены примеры некоторых неоптимальных результатов, которые можно получить при использовании зондов LSI (Locus Specific Identifiers). Включены возможные причины и предложения по совершенствованию рабочих характеристик теста.

Проблема	Возможная причина	Возможное решение
Нет сигнала или слабые сигналы	Используется неправильный набор фильтров для просмотра препаратов	Используйте рекомендованные фильтры.
	Микроскоп не работает правильно	Обратитесь к техническому представителю производителя микроскопа.
	Неправильные лампы (напр., Xenon или Tungsten)	Используйте ртутную лампу (рекомендуется 100 ватт).
	Ртутная лампа слишком старая	Замените на новую лампу.
	Ртутная лампа неверно установлена	Перенастройте лампу.
	Загрязненные или треснувшие коллекторные линзы	Очистите или замените линзы.
	Загрязненное или разбитое зеркало в ламповом блоке	Очистите или замените зеркало.
	Неправильное время гибридизации	Проверьте время гибридизации.
	Неправильная температура промывки после гибридизации	Проверьте температуру промывочного буфера Wash Buffer II.
	Воздушные пузырьки под покровным стеклом препятствовали попаданию зонда	Наложите покровное стекло, вначале дотронувшись до поверхности смеси зондов.
Неадекватное дигерирование протеазы	Неадекватное дигерирование протеазы	Проверьте температуру раствора протеазы.
	Срез слишком фиксирован (границы will be distinct)	Увеличение времени фиксации ткани может вести к прогрессированию уменьшения интенсивности сигнала, дигерирование может занять больше времени.
Неинформативный результат	Слишком мало ядер (<50), доступных для суммирования	Повторите тест на новом препарате.
Фон с помехами	Неадекватность промывки	Проверьте температуру промывочного буфера Wash Buffer II.

Проблема	Возможная причина	Возможное решение
Вариабельность интенсивности сигнала по срезу ткани	Проба неровно распределена в препарате из-за пузырьков под покровным стеклом	Повторите тест на следующем прилегающем срезе той же ткани, убедитесь, что под покровным стеклом нет пузырьков.
		Наложите покровное стекло, вначале дотронувшись до поверхности смеси зондов.
"Износ" ткани или деградация морфологии ткани	Срез ткани недостаточно фиксирован (плохое окрашивание DAPI)	Проверьте время дигерирования протеазы.
	Потеря ДНК (плохое окрашивание DAPI)	Проверьте условия фиксации.
	Использован неправильный препарат	Используйте положительно заряженные препараты.
	Неправильная термическая обработка	Проверьте температуру ThermoBrite.
	Излишняя предварительная обработка	Проверьте время и температуру раствора Vysis Pretreatment Solution.
	Излишняя денатурация (Melt Time)	Проверьте время Melt time.
	Срез ткани был порван при снятии покровного стекла после гибридизации	Отмачивание покровного стекла в промывочном буфере может занять дополнительное время.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- **ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO.**
- Для оптимальной работы теста необходимо правильно, в соответствии с инструкциями по использованию, обращаться с образцами, готовить и хранить их.
- Набор зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit оптимизирован только для определения и количественного анализа реаранжировок гена ALK в зафиксированных в формалине и залитых парафином тканях НМРЛ человека. Тест должен проводиться только на зафиксированных в формалине (буфер формалиновый 10% нейтральный) образцах FFPE ткани рака легкого человека. Не используйте другие типы образцов или фиксаторы.
- Рабочие характеристики набора зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit были определены только с помощью процедур, описанных в данной инструкции по применению. Изменения этих процедур могут вести к изменению рабочих характеристик теста.
- Клиническая интерпретация каких-либо результатов теста должна быть оценена в контексте истории болезни пациента и результатов других диагностических тестов.
- Результаты теста FISH могут быть неинформативны, если качество образца и/или препарата неадекватны.
- Лаборанты-технологи, проводящие суммирование сигналов FISH, должны быть в состоянии визуально различать оранжевые, зеленые и желтые сигналы.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Пороговое значение, норма

Обычное предельное значение определяется как максимальное число поддающихся подсчету интерфазных ядер со специфическим аномальным рисунком сигнала, при котором образец считается отрицательным для данного рисунка сигналов. Обычное предельное значение выражается в процентах или фактическом количестве моделей ядер FISH, являющихся положительными относительно перестройки в соответствии со стандартным количеством тестируемых ядер. Нормальное пороговое значение было установлено на уровне 15% при использовании образцов FFPE ткани НМРЛ.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Локализация зонда на метафазных хромосомах

Место гибридизации Vysis ALK Break Apart FISH Probe было оценено на метафазных пластинках (всего восемь) препаратов культивируемых лимфоцитов с использованием технологии инвертированного ДАПИ-дифференциального окрашивания хромосомом.

Было доказано, что зонды Vysis LSI 3'-ALK SpectrumOrange и Vysis LSI 5'-ALK SpectrumGreen, компоненты Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart FISH Probe гибридизируют с определенным локусом (2p23) на всех восьми метафазных пластинках и нигде более.

Аналитическая чувствительность и специфичность

Аналитическая чувствительность определяется как процент мишеней-хромосом с ожидаемым нормальным рисунком сигналов. Аналитическая специфичность определяется как процент сигналов при гибридизации с определенным локусом и только с ним. Аналитическая чувствительность и специфичность Vysis LSI 3'-ALK SpectrumOrange и Vysis LSI 5'-ALK SpectrumGreen FISH probes были оценены с помощью метафазных хромосом, взятых из 6 кариотипических нормальных образцов периферической крови пяти отдельных доноров (шесть лотов препаратов)

В расчете чувствительности сигналы Vysis LSI 3'-ALK SO и Vysis LSI 5'-ALK SGN FISH probes суммировались для каждой метафазной пластинки (норма = 2 сигнала). Всего по каждому зонду ожидалось 240 сигналов (2 сигнала на клетку x 20 метафазных пластинок на лот x 6 лотов препаратов). См. Таблицу 2.

В расчете специфичности суммировалось число метафазных пластинок с ожидаемым рисунком сигналов. Было рассмотрено всего 120 метафазных пластинок (20 метафазных пластинок x 6 лотов препаратов). См. Таблицу 3.

Для каждого зонда аналитическая чувствительность была рассчитана как 100,0% (240/240)(95% ДИ 98,5-100,0) и аналитическая специфичность - 100% (120/120)(95% ДИ 97,0-100,0).

Таблица 2
Аналитическая чувствительность

Зонд	Кол. сигналов метафазных хромосом		Чувствительность	
	Всего истинно положит.	Всего, ожидаемый	Точечная оценка (%)	95% ДИ
Vysis LSI 3'-ALK SO	240	240	100,0	(98,5, 100,0)
Vysis LSI 5'-ALK SGN	240	240	100,0	(98,5, 100,0)

Таблица 3
Аналитическая специфичность

Зонд	Кол. сигналов метафазных хромосом			Специфичность	
	Всего, ложно полож.	Всего, истинно полож.	Всего, ожидаемый	Точечная оценка (%)	95% ДИ
Vysis LSI 3'-ALK SO	0	120	120	100,0	(97,0, 100,0)
Vysis LSI 5'-ALK SGN	0	120	120	100,0	(97,0, 100,0)

Микробиологическая контаминация

Набор зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit отвечает требованиям к неконтролируемому микробиологическому продукту в соответствии с "Инструкцией по производству продуктов In Vitro диагностики", 1/10/1994, так как ни в одном из реагентов не происходит рост селективированных микроорганизмов, и реагенты на самом деле убивают использованный инокулум микроорганизмов, о чем говорит отсутствие роста на субкультуре. Кроме того, при исследовании реагентов с использованием обычной процедуры контроля качества все реагенты работали удовлетворительно даже после трех дней инкубации с селективированными организмами при 35-37°C.

Воспроизводимость препарата контроля

Воспроизводимость препарата контроля была исследована с использованием трех лотов как ProbeChek ALK Negative Control Slides, так и ProbeChek ALK Positive Control Slides. Каждый лот тестировали 5 разных дней в течение 23-дневного периода, ее оценивали 3 специалиста всего по 90 точкам данных (3 лота x 5 серий тестов x 3 специалиста = 45 оценок на каждый тип препарата контроля).

По каждому образцу рисунки сигналов 50 ядер были оценены методом подсчета наслонившихся сигналов, одиночных оранжевых сигналов и одиночных зеленых сигналов каждой мишени, выявленных каждым специалистом.

На уровне достоверности в 0,05 между 3 специалистами не было обнаружено статистических расхождений в классификации FISH в соответствии с тестом Fisher-Freeman-Halton. (См. Таблицу 4 и Таблицу 5). Таким образом, было продемонстрировано, что препараты контролей Probe Check ALK Negative Control Slides и ProbeChek ALK Positive Control Slides должны быть классифицированы как воспроизводимые. Все препараты в этом исследовании были в рамках спецификаций.

Таблица 4
Воспроизводимость препаратов отрицательного контроля
ProbeChek ALK Negative Control Slides

Специалист	Число результатов с процентом ALK реаранжировок		Всего
	В рамках спецификации ($\leq 8\%$)	Выходящий за рамки спецификаций ($> 8\%$)	
1	15	0	15
2	15	0	15
3	15	0	15

Fisher-Freeman-Halton p -значение = 1,00

Таблица 5
Воспроизводимость препаратов положительного контроля
ProbeChek ALK Positive Control Slides

Специалист	Число результатов с процентом ALK реаранжировок		Всего
	В рамках спецификации ($\geq 20\%$)	Выходящий за рамки спецификации ($< 20\%$)	
1	15	0	15
2	15	0	15
3	15	0	15

Fisher-Freeman-Halton p -значение = 1,00

Воспроизводимость ткани

Воспроизводимость ткани оценивали с использованием срезов FFPE рака легкого. Это исследование проводилось на шести серийных срезах (5 мкм), приготовленных из двадцати блоков образцов FFPE HMPЛ. В панель входили три положительных образца с $>50\%$ клеток с ALK реаранжировками, три образца в диапазоне $10\% - 50\%$ клеток с ALK реаранжировками и четырнадцать образцов с $<10\%$ клеток с ALK реаранжировками. Два препарата были приготовлены из каждого образца, каждый препарат оценивался двумя специалистами. Была оценена воспроизводимость между специалистами (Таблица 6) и между препаратами (Таблица 7).

Анализ данных между специалистами и между препаратами показал, что набор зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit репродуктивен, Fisher-Freeman-Halton p -значение - 1,00.

Таблица 6
Воспроизводимость между специалистами

	Количество образцов панели		Всего
	Отрицательный	Положительный	
Специалист 1	14	6	20
Специалист 2	14	6	20
Специалист 3	14	6	20

Fisher-Freeman-Halton p -значение: 1,00

Таблица 7
Воспроизводимость между препаратами

	Число образцов панели		Всего
	Отрицательный	Положительный	
Препарат 1	14	6	20
Препарат 2	15	5	20
Препарат 3	14	6	20

Fisher-Freeman-Halton p -значение: 1,00

Внешняя воспроизводимость

Воспроизводимость набора зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit оценивалась в трех внешних лабораториях методом тестирования кодированной, рандомизированной панели, 12 образцов (6 индивидуальных образцов, по 2 препарата на каждый), состоящей из четырех индивидуальных ALK-положительных образцов FFPE ткани HMPЛ с различными уровнями положительности (образцы панели 1, 2, 3 и 6) и двух индивидуальных ALK-отрицательных образцов FFPE ткани HMPЛ (образцы панели 4 и 5).

В оценке были использованы три лота реагентов Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Каждая серия теста состояла из одного повтора препарата отрицательного контроля ProbeChek Negative Control, препарата положительного контроля ProbeChek Positive Control и каждого образца панели. Каждая из трех клинических лабораторий исследовала воспроизводимость панели, используя два из трех клинических лотов. Каждый из двух лаборантов-технологов в трех лабораториях суммировал раз в день 6 экспериментальных образцов и препараты контроля, каждый лот реагентов 5 разных дней, в течение 20-дневного периода. В каждой лаборатории было оценено 120 препаратов образцов, всего 360. В результате было получено 240 подсчетов в каждой лаборатории, минимум 720 подсчетов. В каждой лаборатории были исследованы 40 препаратов контролей (20 положительных и 20 отрицательных), всего 120. В результате было получено 80 подсчетов в каждой лаборатории, минимум 240 подсчетов. Два специалиста суммировали рисунки сигналов 50 ядер по каждому препарату образца панели и контроля.

Общий коэффициент каппа составлял 0,92 (95% ДИ 0,85 – 0,98). Z-показатель в 27,08, что больше 1,96, показал, что коэффициент каппа значительно отличается от нуля на уровне значимости 0,05. Эти результаты представлены в Таблице 8. Общий процент согласованности (PA) между результатами всех специалистов был 97,64% (95% ДИ 96,25 – 98,52). Процент согласованности положительных результатов (PPA) - 96,46% (95% ДИ 94,40 – 97,78) и отрицательных (NPA) - 100,00% (95% ДИ 98,42 – 100,00). Результаты представлены в Таблице 9. Коэффициент каппа указывает на воспроизводимость для каждой лаборатории в диапазоне от 0,83 до 0,96, для каждого лота в диапазоне от 0,86 до 0,96. Результаты представлены в Таблицах 10 и 11 соответственно.

Таблица 8
Общая воспроизводимость
Количество препаратов по лабораториям/лотам/сериям/специалистам

	Количество препаратов		Всего
	Отриц.	Положит.	
Панель, образец 1	1	59	60
Панель, образец 2	0	60	60
Панель, образец 3	2	58	60
Панель, образец 4	60	0	60
Панель, образец 5	60	0	60
Панель, образец 6	4	56	60

Каппа-статистика: 0,92 (0,85, 0,98)

Таблица 9
Процент согласованности между всеми специалистами с ожидаемыми результатами

Результаты специалистов	Ожидаемые результаты		Всего
	Полож.	Отриц.	
Положительная	463	0	463
Отрицательная	17	240	257
Всего	480	240	720

PA: 97,64 (95 % ДИ: 96,25, 98,52)

PPA: 96,46 (95 % ДИ: 94,40, 97,78)

NPA: 100,00 (95 % ДИ: 98,42, 100,00)

Таблица 10
Воспроизводимость по лаборатории

Лаб.	Образец панели	Количество препаратов по лотам/сериям/специалистам		Каппа-анализ			
		Отриц.	Полож.	Каппа	95 % ДИ	Станд. ошибка Z-показ.	
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 лоту

Лот	Образец панели	Количество препаратов по лабораториям/сериям/специалистам		Каппа-анализ			
		Отриц.	Полож.	Каппа	95 % ДИ	Станд. ошибка Z-показ.	
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

Использование XALKORI, состоящего из одного вещества, в лечении местно-распространенного или метастатического ALK-положительного НМРЛ было исследовано в 2 несравнительных исследованиях нескольких лабораториях (исследования А и В). Пациенты, включенные в эти исследования, ранее получали общее лечение, за исключением 15 пациентов в исследовании В, которые не получали какого-либо предшествующего общего лечения местно-распространенного или метастатического заболевания. В данных исследования В не указано, что ALK-положительные результаты определялись с помощью ряда местных тестов. В исследовании А случаи ALK-положительного НМРЛ определялись с помощью набора зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Основным критерием оценки эффективности в обоих исследованиях была частота объективных ответов (ORR) в соответствии с критериями оценки ответов на лечение плотных опухолей (RECIST). Ответ оценивался исследователем и независимой группой экспертов в радиологии. Также оценивали длительность ответа (DR). Пациенты получали 250 мг XALKORI перорально два раза в день.

Демографические характеристики и характеристики болезни в исследовании А указаны в таблице 12.

Таблица 12

Демографические характеристики и характеристики болезни в исследовании А

Характеристики	N = 136
Пол, кол-во (%)	
Мужской	64 (47)
Женский	72 (53)
Возраст (лет)	
Средний (диапазон)	52 (29–82)
Раса, кол-во (%)	
Европеидная	87 (64)
Негроидная	5 (4)
Монголоидная	43 (32)
Другая	1 (1)
Общий статус по шкале ECOG (PS) в начале исследования, кол-во (%)	
0	37 (27)
1	74 (54)
2 – 3 ^a	25 (18)
Статус курения, кол-во (%)	
Никогда не курил	92 (68)
Курильщик в прошлом	39 (29)
Курит в настоящее время	5 (4)
Стадия заболевания, кол-во (%)	
Местно-распространенное	9 (7)
Метастатическое	127 (93)
Гистологическая классификация, кол-во (%)	
Аденокарцинома	130 (96)
Крупноклеточная карцинома	1 (1)
Плоскоклеточная карцинома	0
Желёзисто-плоскоклеточная карцинома	3 (2)
Другое	2 (2)
Предварительное общее лечение местно-распространенного или метастатического заболевания — кол-во режимов, кол-во (%)	
1	13 (10)
2	37 (27)
3	37 (27)
≥ 4	49 (36)

^a Включает 1 пациента с PS по шкале ECOG 1 при окончательной проверке, исходное состояние которого было оценено на 3

Сто тридцать шесть пациентов с местно-распространенным или метастатическим ALK-положительным НМРЛ в исследовании А были проанализированы во время окончательного сбора данных. Средняя продолжительность лечения составила 22 недели. На основании оценки исследователя, наблюдался 1 полный и 67 частичных ответов с ORR 50 % (95 % ДИ: 42 %, 59 %). Семьдесят девять процентов объективных опухолевых ответов были достигнуты в течение первых 8 недель лечения. Средняя продолжительность лечения составила 41,9 недели.

Данные об эффективности исследования А указаны в таблице 13.

Таблица 13

Результаты эффективности лечения местно-распространённого или метастатического ALK-положительного НМРЛ согласно данным по исследованию A^a с использованием набора зондов Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit

Параметр эффективности	N = 136
ORR (CR + PR) ^b [% (95 % ДИ)]	50 % (42 %, 59 %)
Количество пациентов с терапевтическим эффектом	68
Продолжительность ответа ^c [среднее значение (диапазон) недель]	41,9 (6,1+, 42,1+)

^a Ответ был оценен исследователем.

^b Один пациент не поддавался оценке относительно своего ответа.

^c Предварительная оценка с использованием метода Карпан-Меиер.

+ Цenzурированные значения

CR = полный ответ

PR = частичный ответ

БИБЛИОГРАФИЯ

- Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448:561-566.
- Takeuchi K, Choi YL, Soda M, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res*. 2008;14(20):6618-6624.
- Perner S, Wagner PL, Demicheli F, et al. EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event. *Neoplasia*. 2008; 10(3):298-302.
- Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*. 2007; 131:1190-1203.
- Choi YL, Takeuchi K, Soda M, et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2008; 68(13):4971-4976.
- Soda M, Takada S, Takeuchi K, et al. A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer. *PNAS*. 2008;105(50):19893-19897.
- Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion oncoprotein identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(9):3143-3149.
- Wong DW, Leung EL, So KK, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer*. 2009;115(8):1723-1733.
- Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(13):4275-4283.
- Camidge DR, Kono SA, Flacco A, et al. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res*. 2010;16(22):5581-5590.
- Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(18):1693-1703.
- Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*. 2001;2:533-543.
- Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin*. 2002;52:23-47.
- McDermott U, Iafrate JA, Gray NS, et al. Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Cancer Res*. 2008;68(9):3389-3395.
- Christensen JG, Zou HY, Arango ME, et al. Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(12):3314-3322.
- Ardini E, Magnaghi P, Orsini P, Galvani A, Menichincheri M. Anaplastic lymphoma kinase: role in specific tumours, and development of small molecule inhibitors for cancer therapy. *Cancer Lett*. 2010;299:81-94.
- US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th Ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type> www.cdc.gov, search BMBL5>look up sections III and IV.]

- US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29CFR Part 1910.1030, Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
- World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines™). Non-Small Cell Lung Cancer (Version 3.2011). © 2011 National Comprehensive Cancer Network, Inc. Available at: NCCN.org. Accessed [March 28, 2011].

Техническая поддержка:

По вопросам технической поддержки обращайтесь в Службу технической поддержки Abbott Molecular по тел. +49-6122-580 или +1-800-553-7042 (в США), или посетите веб-сайт Abbott Molecular по адресу <http://www.abbottmolecular.com>.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue и SpectrumGold являются торговыми марками группы компаний Abbott Group в различных юрисдикциях.

Все другие торговые марки являются собственностью своих владельцев.

Зонд Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit и другие продукты DNA FISH защищены патентами США 5,663,319 и 5,491,224, принадлежащими Abbott Molecular. Флуоресцентные зонды Vysis LSI защищены патентами США RE40,494, 6,596,479, 7,115,709, 5,756,696 и 6,607,877, 6,280,929, исключительные права на которые переданы Abbott Molecular Inc. членами правления Калифорнийского университета (University of California). Методы выявления нескольких сигналов гибридизации одновременно защищены патентом США 6,203,977, исключительные права на который переданы Abbott Molecular Йельским университетом (Yale University).

Адрес изготовителя



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

Адрес уполномоченного представителя (УП)



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



Авторизованный представитель изготовителя на территории России и других стран СНГ:

ООО «Эбботт Лэбораториз», 125171, Россия, г. Москва, Ленинградское шоссе, 16А, строение 1,
Тел: +7 (495) 258 42 70 (80); факс: +7 (495) 258 42 71 (81)

© 2011 Abbott Laboratories

www.abbottmolecular.com

Январь 2016 г.

