

**ТОО «ВизаМед Плюс»**

**Цитогенетическое  
исследование FISH –  
решение в диагностике  
солидных опухолей и  
онкогематологических  
заболеваний**

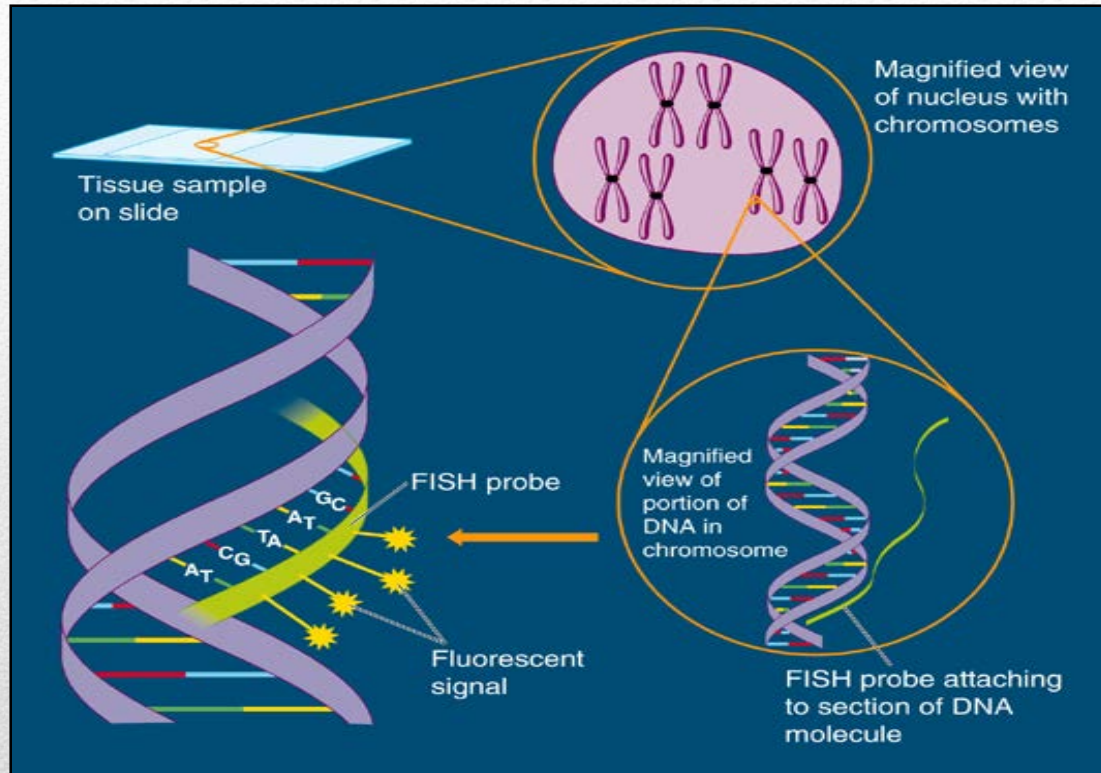


СЕРДЦЕ  
ИННОВАЦИОННЫХ  
ТЕХНОЛОГИЙ



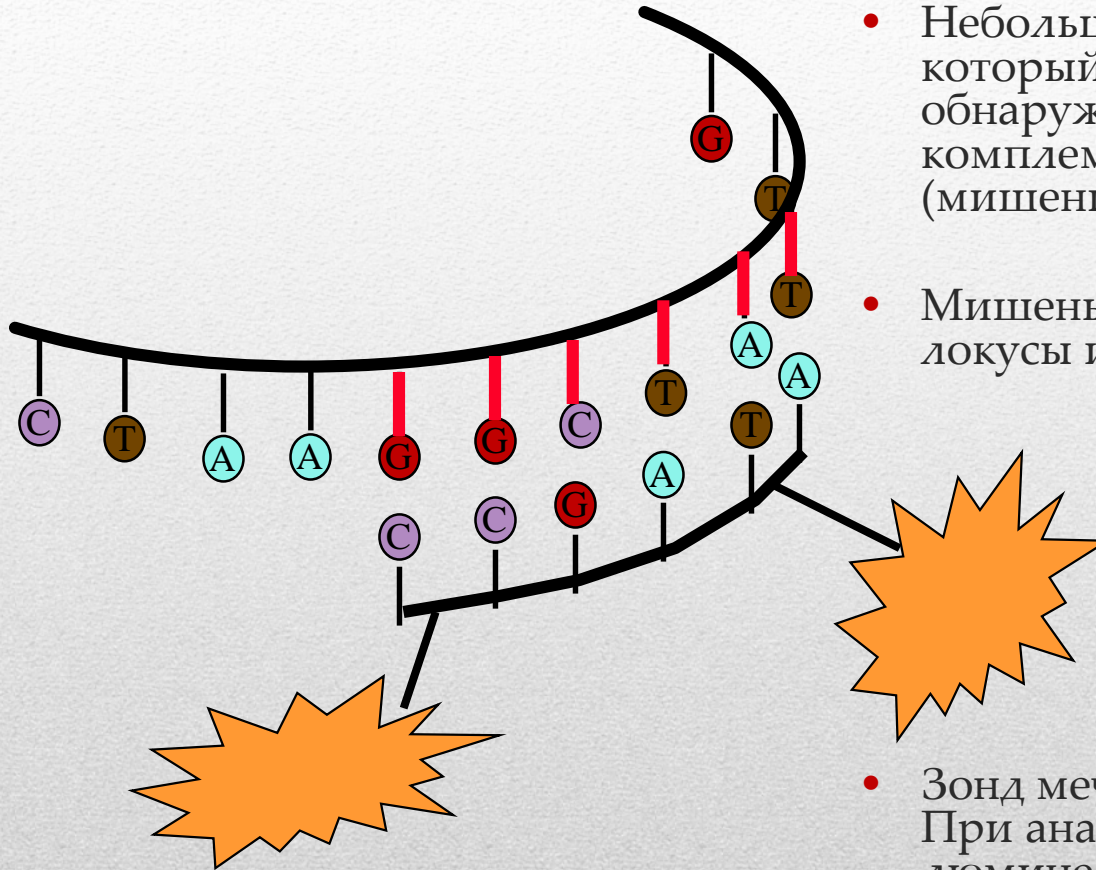
[www.vizamed-plus.kz](http://www.vizamed-plus.kz)

# Fluorescence In Situ Hybridization



Методика гибридизации олигонуклеотидного зонда, содержащего флуоресцентную метку, с ДНК-мишенью в хромосомном препарате (на предметном стекле).

# Что такое зонд?



- Небольшой фрагмент ДНК, который служит для обнаружения комплементарного ему участка (мишени) в исследуемой ДНК
- Мишенью могут быть гены, локусы или целые хромосомы
- Зонд мечен флуорохромом. При анализе препарата под люминесцентным микроскопом флуоресцентный сигнал флуорохрома позволяет локализовать мишень.

# Типы FISH зондов

**CEP**

**Chromosome  
Enumeration  
Probes**

**Хромосом-  
специфичные  
зонды**

**LSI**

**Locus  
Specific  
Identifiers**

**Локус-  
специфичные  
зонды**

**TEL**

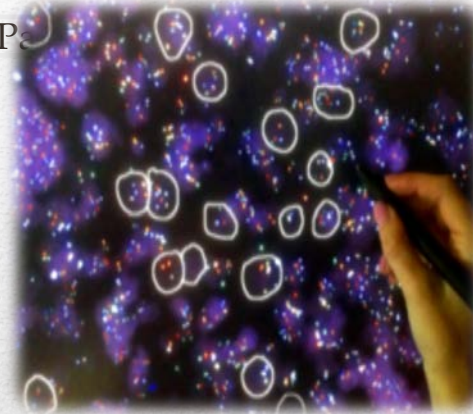
**Telomere  
Probes**

**Теломер-  
специфичные  
зонды**

# Области применения диагностики методом FISH

## Диагностика солидных опухолей

- Рак мочевого пузыря
- Рак простаты
- Рак легкого
- Саркомы
- Глиомы
- Другие виды опухолей



## Диагностика онкогематологических заболеваний

- Острый миелоидный лейкоз
- Хронический миелоидный лейкоз
- Острый лимфобластный лейкоз
- Хронический лимфоидный лейкоз
- Множественная миелома
- Миелодиспластический синдром
- Неходжкинская лимфома



# FISH диагностика солидных опухолей

## Рак мочевого пузыря

- Анализ мочи, нет необходимости инвазивных процедур для диагностики
- Отсутствие необходимости цитологического подтверждения результатов
- Выявление анеуплоидии, раннего события в развитии рака
- Наличие отрицательных и положительных контролей

## Рак молочной железы

- Определение амплификационного статуса гена *HER-2/neu*
- Определение амплификационного статуса гена *TOP2A*, ассоциация с атрациклиновой чувствительностью
- Наличие отрицательных и положительных контролей

- Более 20 продуктов
  - Более 280 лабораторий в ЕМЕА
-

# Набор для диагностики рака мочевого пузыря UroVysion

**FISH можно использовать для раннего выявления рака мочевого пузыря или его рецидивов**

- Методика FISH применима к образцам мочи
- FISH – стандартная методика для выявления анеуплоидии
- Анеуплоидия по определенным хромосомам – раннее событие в развитии рака

## **Преимущества теста UroVysion для врача**

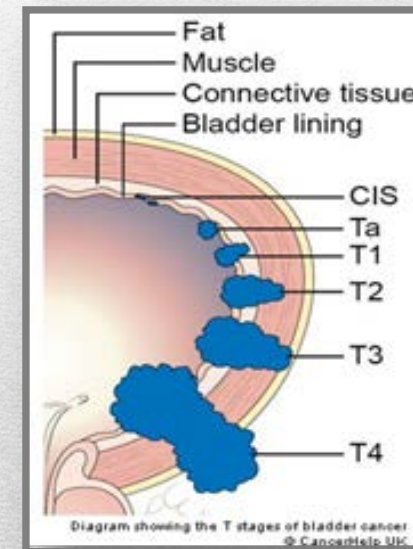
- помогает врачу определить изменения до того, как опухоль становится заметной
- Отсутствие необходимости цитологического подтверждения результатов
- Наличие отрицательных и положительных контролей

## **Преимущества теста UroVysion для пациента**

- Анализ мочи, нет необходимости инвазивных процедур для диагностики

## **Тест UroVysion включен в стандарт**

- ICUD-EAU Международный совет по раку мочевого пузыря 2012
- Скрининг, Диагностика и молекулярные маркеры. 2013. European Urology. 63: 4-15
- Определение маркеров в моче – в особенности методом FISH (флуоресцентной in situ гибридизации) – является наиболее полезным при сочетании отрицательной цистоскопии и атипичной (имеющей отклонения от нормы) цитологии.



# Набор UroVysion

## Сравнение с другими тестами



UROVYSION  
BLADDER CANCER KIT

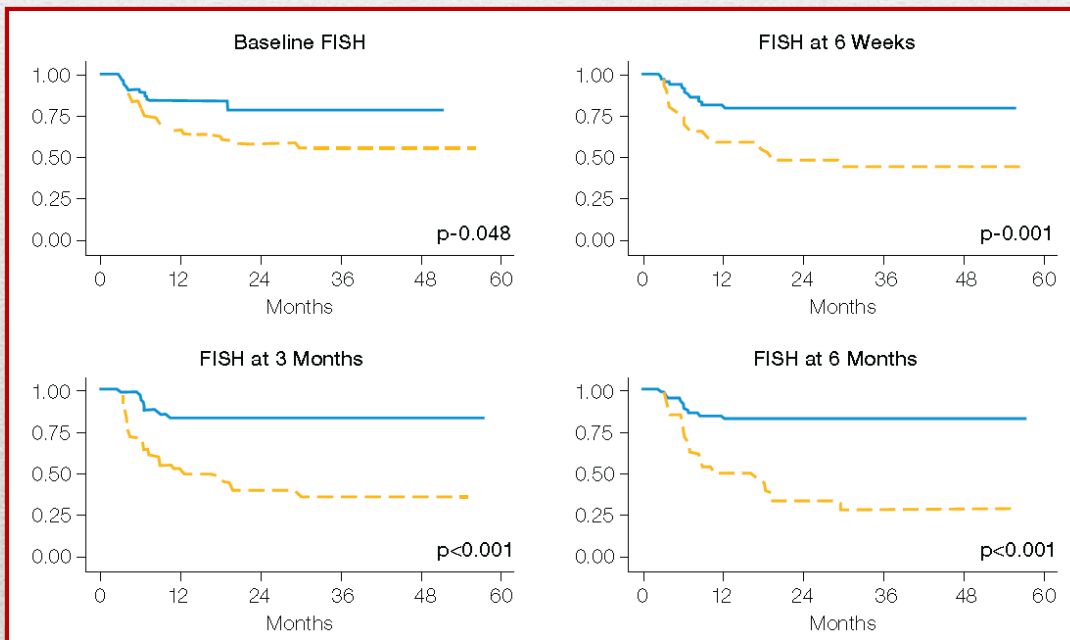
- Нет необходимости в цитологическом подтверждении результатов UroVysion.

В отличие от тестов на биомаркеры РМП, UroVysion обеспечивает прямое выявление генетических изменений в клетке, безошибочно определяя ее злокачественность.



# Положительный тест UroVysion предсказывает рецидив во время БЦЖ терапии

Использование FISH для предсказания ответа на терапию БЦЖ (Бацилла Кальметта-Герена) у пациентов с раком мочевого пузыря. Результаты проспективного исследования. *The Journal of Urology*, Vol. 187, Issue 3, Ashish M. Kamat, Rian J. Dickstein, et al, Page 862-867, © 2012, with permission from Elsevier.



- Положительный результат UroVysion предсказывает рецидив опухоли во всех точках
- Риск рецидива опухоли увеличивается с каждым следующим положительным результатом теста UroVysion
- Ранний переход от отрицательного к положительному результату теста UroVysion ассоциируется с более высоким риском рецидива болезни

# Тест для определения HER2 статуса при раке молочной железы



**Наиболее ТОЧНОЕ и  
НАДЕЖНОЕ средство**



# Краткий протокол PathVysion

## Подготовка образца

- Депарафинизация препарата на стекле
- Предобработка препарата (лизис белков)
- Фиксация формалином
- Денатурация хромосомной ДНК

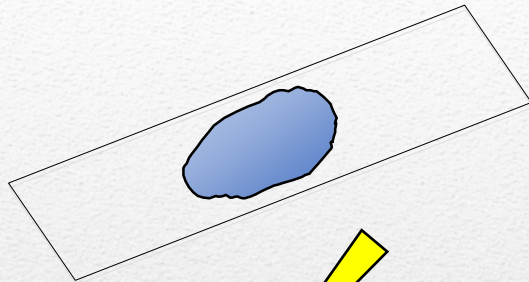
## Гибридизация

- Гибридизация зонда с образцом
- Отмывание несвязанного зонда

## Анализ под микроскопом

---

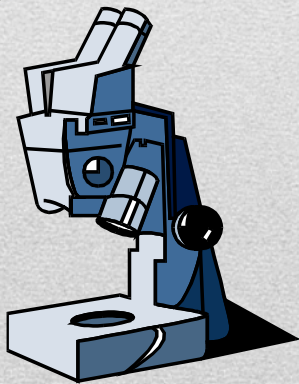
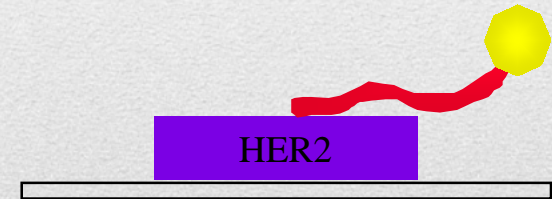
# Fluorescence-in-situ-Hybridisation (FISH)



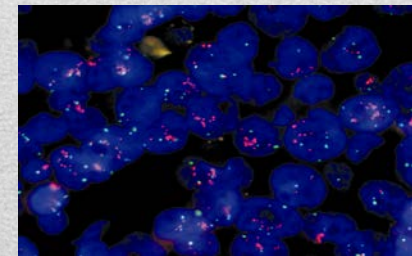
Срез карциномы, фиксированный формалином, заключенный в парафин



Гибридизация с флуоресцентным зондом к гену HER2



Оценка флуоресценции зонда (подсчет числа копий гена)



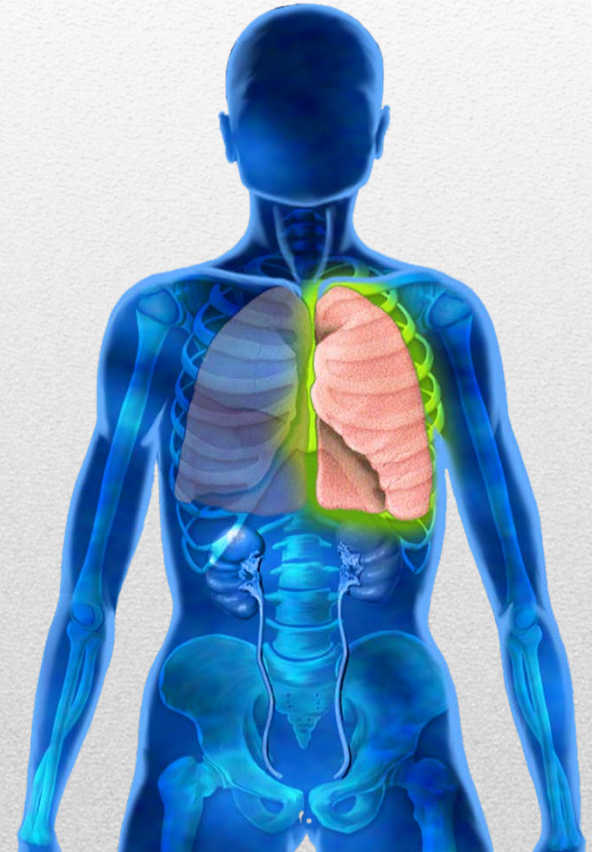
# Дифференциальная диагностика немелкоклеточного рака легкого

Рак легкого #1 по смертности среди всех видов рака во всем мире

Не мелкоклеточный рак легкого (NSCLC) составляет около 85% среди всех раков легкого

ALK ген подвергается перестройкам в 5% случаях не мелкоклеточного рака легкого

Существует терапия (ингибитор ALK), которая эффективна при лечении рака легкого только в случае наличия перестройки гена ALK



# Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit

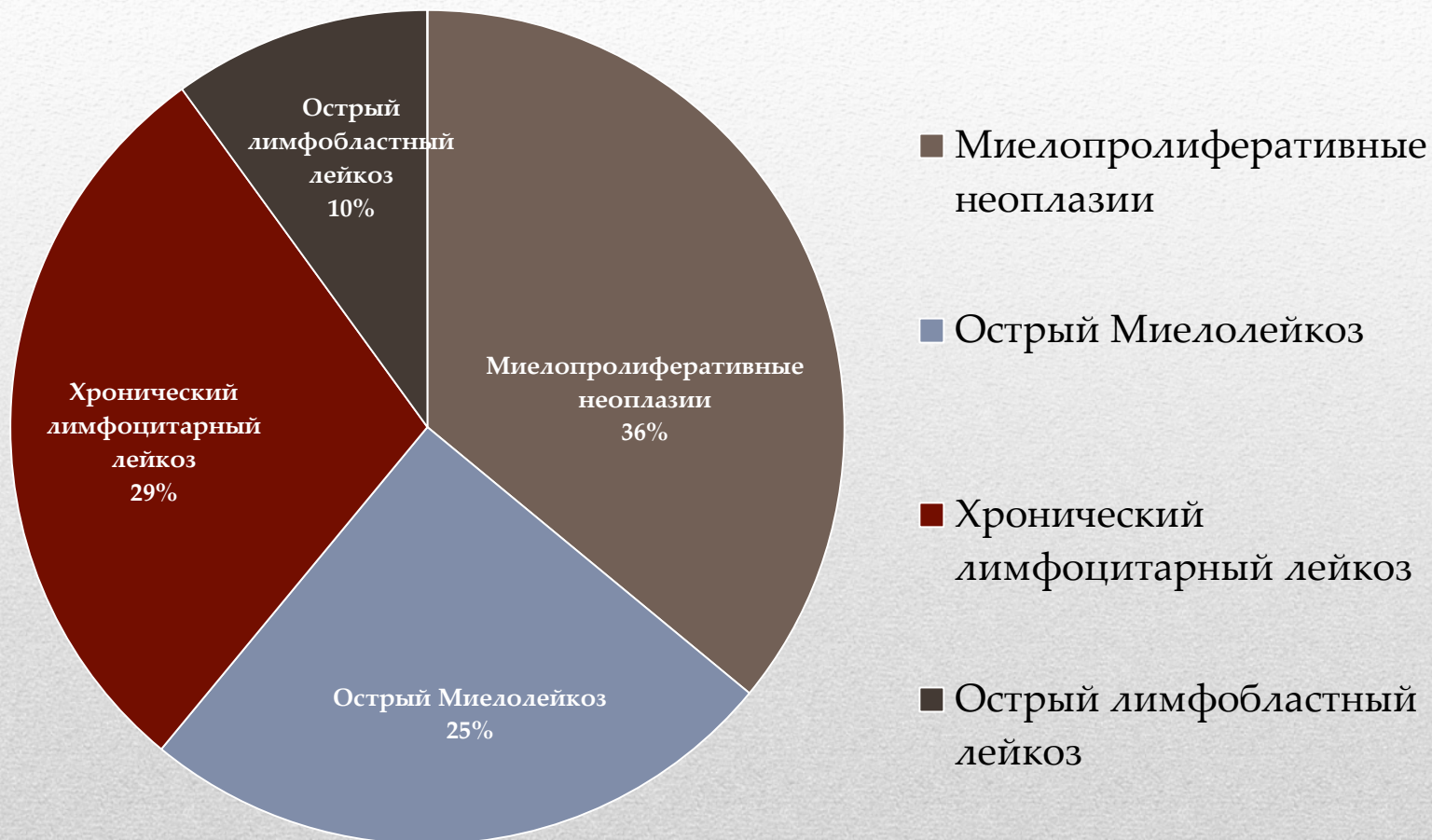
Единственный тест для идентификации перестроек в гене ALK, одобренный FDA



Набор Vysis ALK указан в новых CAP/IASLC/AMP рекомендациях по выбору терапии для лечения НМКРЛ

Набор Vysis ALK использовался в клинических исследованиях (Фаза II и III) для выявления пациентов для терапии XALKORI® (кризотиниб)

# Онкогематологические заболевания



# FISH диагностика в онкогематологии

Острый миелоидный лейкоз

Хронический миелоидный лейкоз

Острый лимфобластный лейкоз

Хронический лимфоидный лейкоз

Множественная миелома

Миелодиспластический синдром

неходжкинская лимфома

- Около 85 продуктов
- Около 480 лабораторий в регионе EMEA
- 70% доля рынка



# Онкогематологические заболевания

## Миелопролиферативные

## Лимфопролиферативные

### Острый Миелопролиферативные

### Острый

### Хронический

миелолейкоз

неоплазии

лимфобластный лейкоз

лимфоцитарный лейкоз

## Диагностические и прогностические маркеры

<b>PML - RAR<math>\alpha</math></b>	<b>FLT3 (мутации или дупликации)</b>
<b>RAS</b>	<b>CEPВ<math>\alpha</math></b>
<b>EVI1</b>	Гены-партнеры MLL
<b>BAALC</b>	<b>AML1-ETO</b>
<b>Мутации NPM1</b>	<b>CBF<math>\beta</math>-MYH11</b>
<b>WT1</b>	

<b>BCR-ABL</b>	<b>Мутации JAK2</b>
<b>Мутации BCR-ABL</b>	<b>Мутации MPL</b>

<b>BCR-ABL</b>	<b>TEL-AML1</b>
<b>Гены-партнеры MLL</b>	<b>E2A-PBX1</b>
	<b>SIL-TAL</b>

<b>Мутационный статус IgVH</b>	<b>CLLU1</b>
<b>Zap-70 &amp; CD38</b>	<b>LPL</b>

# Онкогематологические заболевания

## Маркеры мониторинга

PML - RAR $\alpha$	CBF $\beta$ -MYH11
Гены-партнеры MLL	AML1-ETO
	WT1

BCR-ABL	JAK2
---------	------

BCR-ABL	TEL-AML1
Гены-партнеры MLL	E2A-PBX1
	SIL-TAL

## Медикаментозная и прочая терапия

АТРА / трёхокись мышьяка
Ингибитор киназы FLT3 / Auroga
Прочие ингибиторы киназ
Ингибиторы фарнезилтрансферазы
Ингибиторы протеасом
Прочая терапия

Иматиниб (Gleevek®)
Дазатиниб (Sprycel®)
Нилотиниб (Tasigna®)
Гидроксимочевина (Hydrea®)
Интерферон
Прочая терапия

Иматиниб (Gleevek®)
Прочие ингибиторы киназ
Прочая терапия

Анти-BCL2
Прочая терапия

# Клиническая ценность FISH

## Резюме

Тесты, основанные на ДНК, являются более устойчивыми и надежными, вследствие гораздо более высокой стабильности нуклеиновых кислот по сравнению с белками, которые являются мишенями для иммуногистохимических методов.

Метод исследования	Доля ложноотрицательных результатов
FISH	≈ 4 - 5%
ИГХ	≈ 15 - 20%

# Протокол FISH

## Предварительная обработка

- Пепсин, протеазы, специальные растворы



## Денатурация зонда и мишени

- Нагревание, формамид



## Гибридизация

- 37°C во влажной камере



## Промывание

- SSC и NP-40



## Контр-окрашивание

- DAPI или пропидиум йодид



## Анализ результатов

- Микроскоп, светофильтры

# Протокол процедуры предварительной обработки слайдов ручным методом

№	Вид работы	Время проведения
1	<b>Депарафинизация слайдов</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Погружение слайдов в Немо-De на 10 минут при комнатной температуре (дважды).</li> <li>• Обезвоживание слайдов в 100% Этаноле в течение 5 минут при комнатной температуре (дважды).</li> <li>• Высушивание слайдов на воздухе или в нагревателе предметных стекол при 45-50 °С.</li> </ul>	<b>32 - 35 минут</b> 2 x 10 минут 2 x 5 минут 2-5 минут
2	<b>Предварительная обработка слайдов</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Погружение слайдов в 0,2N HCl на 20 минут.</li> <li>• Погружение слайдов в сверхчистую воду на 3 минуты.</li> <li>• Погружение слайдов в промывочный буфер на 3 минуты.</li> <li>• Погружение слайдов в раствор для предварительной обработки на 30 минут при 80°С.</li> <li>• Погружение слайдов в сверхчистую воду на 1 минуту.</li> <li>• Погружение слайдов в промывочный буфер на 5 минут (дважды).</li> </ul>	<b>1 час 7 минут</b> 20 минут 3 минуты 3 минуты 30 минут 1 минута 2 x 5 минут
3	<b>Протеазная обработка</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Удаление избытка буфера путем промокания краев слайдов фильтровальной бумагой.</li> <li>• Погружение слайдов в раствор протеаз на 10 – 60 минут при 37°С.</li> <li>• Погружение слайдов в промывочный буфер на 5 минут (дважды).</li> <li>• Высушивание слайдов в нагревателе предметных стекол при 45-50 °С в течение 2-5 минут.</li> </ul>	<b>22 минуты – 1 час 15 минут</b> 10-60 минут 2 x 5 минут 2-5 минут
4	<b>Фиксация образца</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Погружение слайдов в нейтральный забуференный формалин на 10 минут при комнатной температуре.</li> <li>• Погружение слайдов в промывочный буфер на 5 минут (дважды).</li> <li>• Высушивание слайдов в нагревателе предметных стекол при 45-50 °С в течение 2-5 минут.</li> <li>• Продолжение протокола исследования PathVysion.</li> </ul>	<b>22 – 25 минут</b> 10 минут 2 x 5 минут 2-5 минут
<b>ИТОГО:</b>		<b>2,5 – 3,5 часа</b>

# Сложности процедуры предварительной обработки слайдов **ручным методом**

- Рутинная времезатратная процедура, требующая повышенного внимания со стороны персонала FISH лаборатории.
- Неадекватная предварительная обработка может привести к усиленной аутофлюоресценции из-за сохранения интактных белков и значительному ослаблению интенсивности сигнала от FISH зонда.
- Избыточная предварительная обработка может исказить структуру ткани.
- Очень важно уметь распознавать образцы, непригодные для анализа, и, соответственно, подвергать их вторичной обработке.

**Правильная обработка фиксированных формалином и залитых в парафин тканей чрезвычайно важна для достижения корректных результатов FISH.**

---

# FISH instruments

## ThermoBrite

- ✓ Вместимость до 12 стекол
- ✓ 40 программируемых пользователем методик
- ✓ 3 модели работы:
  - Денатурация/Гибридизация
  - Только гибридизация
  - Поддержание фиксированной температуры
- ✓ Быстрый подъем температуры от 37°C до 95°C за 2 минуты
- ✓ Возможность работы при относительной влажности от 20 – 80 %



## Станция VIP 2000

1

• Рутинная депарафинизация

2

• предварительная подготовка препаратов, включая догибризационную промывку

3

• классическое окрашивание стекол

4

• Постгибризационная промывка и контр-окрашивание

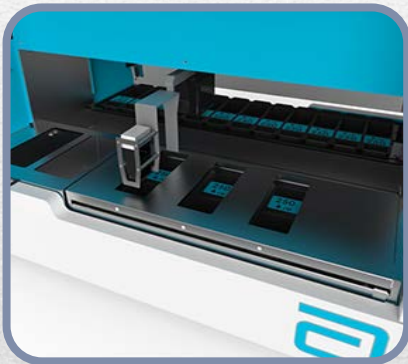


# VIP2000

Шаг 1

## Загрузка

реагентов и корзины  
со слайдами



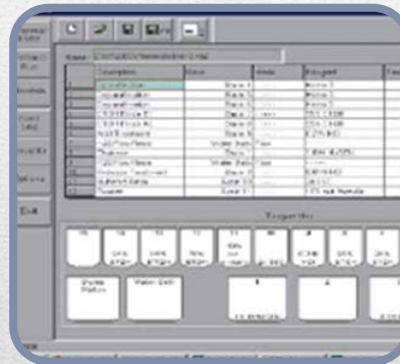
### Автоматизированная пробоподготовка

Рука-робот переносит  
слайды из раствора в  
раствор

Шаг 2

## Выбор

протокола



### Подходящее программное обеспечение

Выбор предварительно  
запрограммированных  
протоколов или создание  
своих

Шаг 3

## Перенос

для денатурации и  
гибризации



### Совместимость с ThermoBrite

Перенос слайдов в  
ThermoBrite для  
денатурации и  
гибризации



# IntelliFISH – универсальный набор реагентов для предварительной обработки слайдов



- обеспечивает успешное проведение диагностики методом FISH фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканей.
- уменьшает количество необходимых манипуляций, что позволяет сократить риск ошибки персонала и время, требуемое для обработки слайдов FFPE тканей.

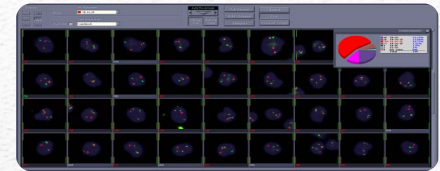
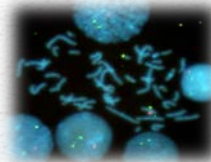
**Набор IntelliFISH предоставляет наибольшую защиту от переваривания образцов ткани, чем способствует лучшей гибкости в оптимизации и автоматизации рабочих процессов в лаборатории.**

# Преимущества набора IntelliFISH

- Меньше риск ошибки персонала FISH лаборатории.
- Высокий уровень первого этапа предварительной обработки слайдов.
- Обработка видов опухолей в пакетном режиме ведет к снижению затрат.
- Простота в управлении запасами реагента.
- Используется, как при ручном методе предварительной обработки слайдов, так и с помощью автоматизированных станций VP2000/VIP2000.
- Усовершенствованные протоколы.

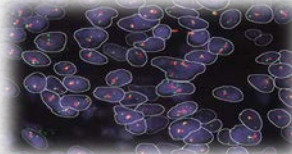
# Приложения BioView

- Гематология (CLL, AML etc.)

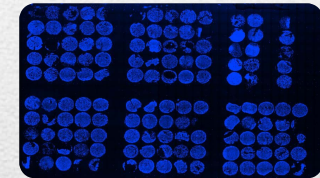


- Все портфолио гематологических проб Abbott

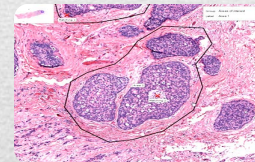
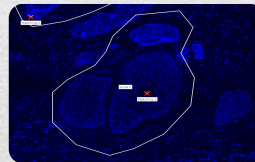
- ALK



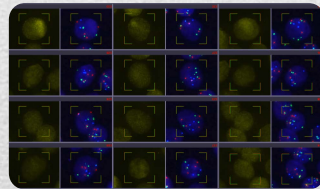
- Все портфолио проб для онкологии Abbott



- Тканевое соответствие

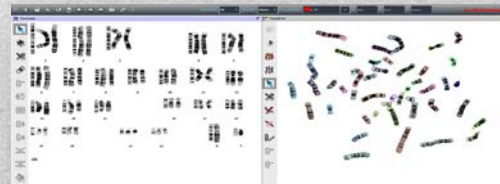


- TMA

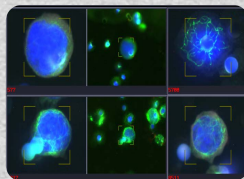


- UroVysion

- Кариотипирование



- CTC



Приложение 8  
к приказу  
Министра здравоохранения  
Республики Казахстан  
от 5 сентября 2018 года  
№ ҚР ДСМ-10

Тарифы на медицинские услуги,  
оказываемые в рамках  
гарантированного объема  
бесплатной медицинской помощи и  
в системе обязательного социального  
медицинского страхования \*

№	Полный код услуги	Наименование услуги	Стоимость **	Поправочные коэффициенты			Формы предоставления медицинской помощи				Гарантированный объем бесплатной медицинской помощи (ГОБМП)***	Дорогостоящие услуги
				услуги на дому	дистанционные консультации	услуги телемедицины	первичная медико-санитарная помощь (ПМСП)	консультативно-диагностическая помощь (КДП)	стационарная помощь	8		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1049	B09.000.000	Молекулярная биология и молекулярная генетика										
1050	B09.000.016	Цитогенетический метод										
1052	B09.765.016	Молекулярно-цитогенетическое исследование с использованием ДНК-зондов (ФИШ-метод) биологического материала (1 зонд)	61 930,19					√	√	2	√	
1053	B09.766.016	Молекулярно-цитогенетическое исследование с использованием ДНК-зондов (ФИШ-метод) клеток костного мозга (1 зонд)	63 070,10					√	√	2	√	
1054	B09.767.016	Молекулярно-цитогенетическое исследование с использованием ДНК-зондов (ФИШ-метод) лимфоцитов периферической крови (1 зонд)	55 794,30					√	√	2	√	
1055	B09.768.016	Молекулярно-цитогенетическое исследование с использованием ДНК-зондов (ФИШ-метод) некультивируемых клеток амниотической жидкости (1 зонд)	37 487,08					√	√	2	√	
1056	B09.769.016	Молекулярно-цитогенетическое исследование с использованием ДНК-зондов (ФИШ-метод) цитологических препаратов, гистологических срезов (1 зонд)	55 484,40					√	√	2	√	



## НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПЕДИАТРИИ И ДЕТСКОЙ ХИРУРГИИ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН



- 285-коечный фонд (из них 5 приходится на дневной стационар и 5 на отделение трансплантации костного мозга).
- современное лечебное и диагностическое оборудование, высоко оснащенная клиничко-диагностическая лаборатория.

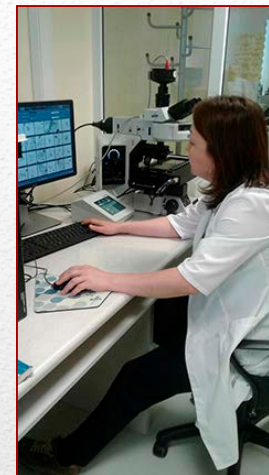
Лаборатория цитогенетики проводит уникальные исследования для выявления хромосомных аббераций при наследственной патологии, а также в области гематологии и онкологии.

В лаборатории цитогенетики за последние 6 лет внедрена следующая методика: **флюоресцентная гибридизация in situ**, позволяющая выявить точечные ДНК - мутации. Данный метод позволяет оптимизировать диагностику опухолей мягких тканей и лимфом.

# FISH-ЛАБОРАТОРИЯ



# FISH-ЛАБОРАТОРИЯ





# Комплексное технологическое решение для медико-генетической лаборатории



Градиентный термоциклер  
**SureCycler 8800**  
(Agilent Technologies)



Амплификатор в режиме  
реального времени  
**AriaMx QPCR**  
(Agilent Technologies)



Сканер **SureScan**  
**Microarray Scanner**  
(Agilent Technologies)



Генетический анализатор  
**ABI 3500**  
(ThermoFisher Scientific)



Капиллярный электрофорез  
(Agilent Technologies)



Секвенатор нового поколения  
**MGISEQ-200 (BGI)**

# aCGH - сравнительная геномная гибридизация на микрочипах



**aCGH** включает в себя 2 этапа:

- полногеномная амплификация образцов ДНК (кабинет **ПЦР**);
- сканирование полученных результатов (кабинет **aCGH**), интерпретация и выдача результатов.

# Полногеномная амплификация образцов ДНК (кабинет ПЦР)



# Сканирование полученных результатов (кабинет аСГН)





## СЕРВИСНОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

- Компания ТОО «ВизаМед Плюс» осуществляет сервисное, гарантийное и постгарантийное обслуживание всего поставляемого медицинского оборудования.
- Сертифицированные сервисные инженеры нашей компании предоставляют перечень требований к установке и монтажу, проводят предмонтажную экспертизу, монтаж, наладку, запуск и испытания оборудования, а также обучение его эксплуатации.
- Наши специалисты в курсе всех последних технологий, усовершенствований, новинок продукции. Тесное сотрудничество с мировыми производителями дает нам возможность обеспечить комплексный подход по техническому обслуживанию на высшем уровне.
- Кроме этого, специалисты компании могут оказать консультационную поддержку при запуске нового проекта, будь то медицинский центр, новое отделение или специализированная лаборатория.

**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!**