# INFORM Chromosome 17 Probe

Каталожный номер 780-4331

## ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Данный реактив предназначен для диагностики *in vitro*.

Зонд INFORM Chromosome 17 производства Ventana Medical Systems (Ventana) предназначен для гибридизации с центромерным районом 17 хромосомы, что позволяет определить плоидность 17 хромосомы с использованием световой микроскопии, посредством гибридизации *in situ* с хромогенным серебром (SISH), в образцах тканей рака молочной железы человека, фиксированных формалином и залитых в парафин после окрашивания при помощи автоматического аппарата для окрашивания препаратов производства Ventana.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И КОММЕНТАРИИ

Определение геномного статуса 17 хромосомы (т.е. плоидности) играет важную роль при обследовании пациентов, которым предполагается проводить лечение препаратом Herceptin (трастузумаб). Зонд INFORM Chromosome 17 представляет собой 42 пары синтетических олигонуклеотидов, предназначенных для «окраски» центромерного района 17 хромосомы. Зонд гибридизируется с повторяющейся последовательностью ДНК, которая расположена в повторяющихся участках 17 хромосомы, и отсутствует в в других хромосомах человека. Олигонуклетидный зонд также имеет 5' несвязанный AT-rich конец, содержащий молекулы ДНФ, детекция которых возможна при помощи анти-ДНФ антител.

## ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ МЕТОДА

Зонд INFORM Chromosome 17 разведен в соотношении, оптимальном для применения с диагностическим набором Ventana *ultra*View SISH и дополнительными реактивами автоматического аппарата для окрашивания препаратов Ventana. В процессе окрашивания путем гибридизации in situ с серебром (SISH) меченые ДНФ зонды связываются с определенной последовательностью-мишенью ДНК в клетках или тканях. Меченый ДНФ зонд визуализируется с помощью первичных антител анти-ДНФ кролика и реактивов диагностического набора *ultra*View SISH. Диагностический набор содержит антитела козы к антителам кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), которая используется в качестве хромогенного фермента. Если кратко описывать биохимию реакции SISH, она запускается последовательным добавлением Серебра А (ацетат серебра), Серебра В (гидрохинон) и Серебра С ($H_2O_2$). В данном случае ионы серебра (Ag+) восстанавливаются гидрохиноном до атомов металлического серебра (Ag0). Реакция катализируется субстратом пероксидазы хрена, пероксидом водорода (Серебро С). Осаждение серебра происходит в ядрах, и центромерная зона 17 хромосомы визуализируется как черная точка. Образец затем подвергается контрастирующему окрашиванию для интерпретации с помощью световой микроскопии. На рисунке 1 представлена реакция SISH.

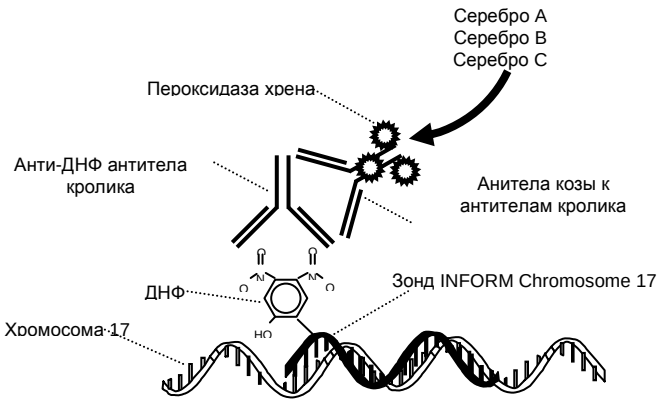



*Рисунок 1*

Каждый этап окрашивания включает инкубацию в течение определенного времени и при определенной температуре. В конце каждого этапа инкубации срезы промываются в автоматическом аппарате для окрашивания препаратов Ventana с целью прекращения реакции и удаления несвязанных остатков, которые могут мешать протеканию следующих этапов реакции. Для минимизации испарения водных реактивов из препарата в аппарате для окрашивания наносится покровный раствор. Для получения более подробной информации о проведении исследования обратитесь к соответствующему Руководству пользователя к автоматическому аппарату для окрашивания препаратов Ventana.

## МАТЕРИАЛЫ

### Предоставляемые реактивы

Дозатор зонда INFORM Chromosome 17 содержит достаточное количество реактива для проведения 50 исследований.

1 – 10 мл дозатор зонда INFORM Chromosome 17 содержит приблизительно 2 мкг/мл зонда Chromosome 17, меченого динитрофенолом (ДНФ), в формамидовом гибридизационном буфере.

### Разбавление, смешивание, разведение, титрование

Разбавления, смешивания, разведения, титрования не требуется. Дальнейшее разведение может привести к потере чувствительности окрашивания. Любые подобные действия должны быть валидированы пользователем.

### Необходимые материалы и реактивы, не предоставляемые с продуктом

Для окрашивания требуются следующие реактивы, не входящие в состав набора:

1. Диагностический набор Ventana *ultra*View SISH {кат. № 780-001]
2. Ventana анти-ДНФ антитела кролика {кат. № 780-4335]
3. Ventana *ultra*View Silver Wash II [кат. № 780-003 или эквивалент]
4. Положительный контрольный образец
5. Ventana контрольные препараты *HER2* 3-в-1 Xenograft [кат. №. 783-4332 или эквивалент]*
6. Ventana ISH протеаза 2 [кат. № 780-4148] *
7. Ventana ISH протеаза 3 [кат. № 780-4149] *
8. Ventana контрастный краситель гематоксилин II [кат. № 790-2208]*
9. Ventana подсинивающий реактив [кат. № 760-2037]*
10. Ventana буфер (10X) [кат. № 950-300]
11. Ventana SSC (10X) [кат. № 950-110]
12. Ventana EZ Prep Reagent (10X) [кат. № 950-102]
13. Ventana клеточный кондиционер 2 (предварительно разведенный) [м 950-123]
14. Ventana жидкое покровное стекло (высокая температура) [кат. № 650-010]
15. BenchMark Series автоматический аппарат для окрашивания препаратов
16. Этикетки со штрих-кодом
17. Предметные стекла для микроскопических исследований Superfrost Plus (VWR, кат. № 48311-703 или эквивалент)
18. Ксилен (пригодный для гистологических исследований)
19. Этанол или спиртосодержащий реактив (пригодный для гистологических исследований)
    - 100% раствор: неразведенный этанол или спиртосодержащий реактив
    - 90% раствор: смешать 90 частей этанола или спиртосодержащего реактива с 10 частями деионизированной воды
    - 80% раствор: смешать 80 частей этанола или спиртосодержащего реактива с 20 частями деионизированной воды
20. Ацетон (пригодный для гистологических исследований)
21. Деионизированная или дистиллированная вода
22. Среда для заключения препаратов (Permount, Fisher кат. № SP15-500 или эквивалент)
23. Покровное стекло (достаточное для покрытия ткани типа VWR Cat. № 48393-60 или эквивалент)
24. Автоматическое устройство для покрытия покровными стеклами (типа автоматического устройства для покрытия покровными стеклами Tissue-Tek SCA)
25. Емкости или кюветы для окрашивания образцов
26. Таймер (с интервалом 2-10 минут)
27. Световой микроскоп

* при необходимости для особого применения

### Хранение и обращение

Хранить при 2°C – 8°C. Не замораживать. Любые условия хранения отличные от указанных в листке-вкладыше должны быть валидированы.



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

С целью обеспечения надлежащего расхода реактива и его стабильности после каждого использования крышку следует закрывать и дозатор немедленно поместить в холодильник в вертикальном положении.

У каждого дозатора указан срок годности. При условии надлежащего хранения реактив сохраняет свои свойства до даты, указанной на упаковке. Не рекомендуется использовать реактив с истекшим сроком хранения для выполнения описанного метода.

В связи с отсутствием определенных признаков нарушения стабильности данного продукта рекомендуется использование контролей одновременно с исследованием неизвестных образцов. При появлении признаков нестабильности реактива следует немедленно связаться с местным представительством Ventana.

### Забор образцов и приготовление к исследованию

Для использования данного реактива могут применяться взятые обычном образом, фиксированные формалином и помещенные в парафин ткани. Каждый срез должен иметь соответствующую толщину (приблизительно 4 микрона) и быть помещен на предметное стекло Superfrost Plus. Рекомендуется в качестве фиксатора тканей использовать 10% нейтральный буферный раствор формалина.[1] При несоответствующей фиксации возможна вариабельность результатов.

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

### Применять для диагностики *in vitro*:

1. Применять только для диагностики *in vitro*.
2. При работе с реактивами рекомендуется соблюдать обоснованные меры предосторожности. При работе с предполагаемыми канцерогенными или токсическими препаратами следует использовать одноразовые перчатки (например: при работе с ксиленом или формамидом).
3. Избегать попадания реактивов в глаза или на слизистые оболочки. При попадании реактивов на чувствительные участки промыть их достаточным количеством воды.
4. Все образцы тканей больных, а также все материалы, находящиеся с ними в контакте, следует рассматривать как биологически опасные, обращаться с ними и утилизировать их с надлежащей осторожностью. Запрещается помещать пипетку в рот.
5. Следует избегать микробного заражения реактивов во избежание получения неправильных результатов.
6. Реактивы поставляются в оптимальном разведении и дальнейшее их разведение может привести к потере соответствующих свойств. Любые подобные изменения должны быть валидированы пользователем.
7. Формамид может вызывать раздражение кожи, глаз и слизистых оболочек, и всасывается через кожу. Имеются экспериментальные данные о его тератогенном действии и влиянии на репродуктивную систему. Имеются данные о его мутагенном действии. При работе следует использовать соответствующую защитную одежду.
8. По вопросам рекомендованного метода утилизации следует обращаться за консультацией в местные или государственные органы.

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

### Поэтапное описание исследования

Данный реактив предназначен для использования в автоматическом аппарате для окрашивания препаратов Ventana в комбинации с диагностическим набором Ventana и дополнительными реактивами. Параметры автоматизированных операций могут выводиться на экран, печататься или корректироваться способом, указанным в Руководстве. Прочие параметры эксплуатации автоматического аппарата для окрашивания препаратов устанавливаются на заводе.

Рекомендуемый протокол окрашивания для автоматического аппарата (для окрашивания препаратов) представлен ниже в таблице 1.

| Процесс | Зонд ДНК INFORM *HER2* | |
|---|---|---|
| Депарафинизация | √ | |
| Расширенный CC2 | √ | |
| ISH-протеаза 3 | 8 мин | |
| Chromosome 17 | √ | |
| Время гибридизации | 6 часов | |
| Серебро С | 4 мин | |
| Контрастирующее окрашивание | Гематоксилин II | 8 мин |
| Окрашивание после контрастирования | Bluing Reagent | 4 мин |

*Таблица 1. Рекомендуемый протокол окрашивания с использованием зонда INFORM Chromosome 17 на автоматическом аппарате для окрашивания препаратов Ventana BenchMark*

**Автоматический аппарат для окрашивания препаратов серии BenchMark**

1. Нанести на препарат этикетку со штрих-кодом, соответствующую протоколу для используемого зонда.
2. Поместить зонд INFORM Chromosome 17, реактивы из диагностического набора *ultra*View SISH и необходимые дополнительные реактивы в контейнер для реактивов, после чего поместить контейнер в аппарат. Проверить объем жидкости и отходы.
3. Поместить препараты в аппарат.
4. Запустить процесс окрашивания.
5. После завершения окрашивания вынуть препараты из аппарата.
6. Начать процедуру дегидратации.

**Процедура дегидратации**

1. Для удаления покровного раствора промыть препарат последовательно 2 растворами мягкого средства для мытья посуды (не применять моющие средства для автоматической стирки).
2. Хорошо промыть препараты дистиллированной водой в течение примерно 1 минуты. Остатки воды стряхнуть.
3. Поместить препараты в кювету с 80% этанолом примерно на 1 минуту.
4. Поместить препараты в кювету с 90% этанолом примерно на 1 минуту.
5. Поместить препараты в кювету с 100% этанолом примерно на 1 минуту.
6. Поместить препараты во вторую кювету с 100% этанолом примерно на 1 минуту.
7. Погрузить препараты 10 раз в 100% ацетон (одноразового использования, после каждого окрашивания ацетон следует менять на новый). Не оставлять препараты в ацетоне.
8. Поместить препараты в первую кювету с ксиленом примерно на 30 секунд.
9. Поместить препараты во вторую кювету с ксиленом примерно на 30 секунд.
10. Закрыть препарат покровным стеклом.

Примечание: Для полного обезвоживания препаратов кюветы с этанолом следует менять часто, также можно добавить третью кювету с 100% этанолом.

### Процедуры контроля качества

**Контрольные образцы**

При каждой процедуре окрашивания следует использовать положительный контрольный образец. Контроль необходим для подтверждения факта использования зонда и надлежащего функционирования прибора. Контрольный образец должен содержать положительно окрашенные клетки или компоненты ткани. Контрольные образцы должны представлять собой биопсийные образцы, подготовленные или фиксированные способом, идентичным способу обработки или фиксации образцов больного. При помощи контрольных образцов должны контролироваться все этапы процедуры от момента приготовления образца до окончания его окрашивания. Образец, который фиксировался или готовился методом, отличным от метода подготовки исследуемого образца, будет являться контролем для всех реактивов и этапов метода, за исключением фиксации и подготовки образца. Нормальные сигналы хромосомы 17 (1-2 копии на клетку) выполняют роль внутреннего положительного контроля и должны быть видны в образце. Однако не все клетки могут давать копию одного гена в связи с их биологической гетерогенностью. Специальное окрашивание ядра может локализоваться в разных клетках, включая: стромальные фибробласты,



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

эндотелиальные клетки, лимфоциты и неопухолевые эпителиоциты молочной железы. Если в положительных контрольных образцах положительное окрашивание отсутствует, то результаты окрашивания исследуемых образцов следует считать недостоверными.

**Положительный контроль реактива**

В процессе верификации метода и выявления и устранения проблем должен применяться положительный контроль реактива, поскольку возможности оценки ДНК могут варьировать в зависимости от метода фиксации и предварительной подготовки образца. Зонд INFORM Chromosome 17 может использоваться в качестве положительного контроля для данного исследования, поскольку каждая нормальная клетка содержит две копии 17 хромосомы.

**Необъяснимые несоответствия**

Обо всех необъяснимых несоответствиях, выявленных в процессе контроля, следует немедленно сообщать в местное представительство Ventana. Если результаты контроля качества не соответствуют спецификации, то результаты анализа образцов пациента следует считать недействительными (см. раздел Выявление и устранение проблем данного листка-вкладыша). После установления и исправления проблемы анализ образцов пациента следует повторить.

**Верификация метода**

Перед первоначальным использованием реактива для диагностики он должен быть проверен на серии образцов с известными рабочими характеристиками для ISH (см. подраздел Процедуры контроля качества, указанный выше в данном разделе). Эти процедуры контроля качества следует проводить для каждой новой партии реактивов или в случае любого изменения параметров исследования.

## Интерпретация результатов

До интерпретации результатов должна проводиться оценка контролей квалифицированным специалистом, имеющим опыт микроскопической интерпретации образцов карциномы молочной железы, ISH процедур и выявления одинарных копий 17 хромосомы (что может потребовать микроскопического исследования с использованием объектива с увеличением 40X – 60X).

**Контроли**

В первую очередь производится оценка окрашивания положительного контроля реактива и контрольных образцов чтобы удостовериться, что все реактивы работают надлежащим образом. Наличие осажденного серебра в ядре клетки указывает на положительную реакционную способность.

Нормальные клетки, расположенные в том же поле зрения, используются в качестве внутреннего контроля процесса окрашивания. Ядро нормальной клетки должно содержать в среднем 1-2 отдельных пятна, что указывает на то, что зонд INFORM Chromosome 17 гибридизировался с хромосомой. Невозможность обнаружить одиночную хромосомную копию в нормальной клетке указывает на то, что окрашивание не состоялось и результат считается недействительным.

Если в положительном или отрицательном контроле надлежащее окрашивание отсутствует, то результаты окрашивания образцов следует считать недействительными.

**Образец пациента**

Образцы пациента должны исследоваться в последнюю очередь. Интенсивность положительного окрашивания оценивается в сравнении с фоновым окрашиванием отрицательного контроля реактива. Результаты морфологического исследования и соответствующие клинические данные в отношении пациента должны интерпретироваться квалифицированным патогистологом.

## ОГРАНИЧЕНИЯ

1. ISH представляет собой многоступенчатый метод, проведение которого требует специально обученного персонала, владеющего методами выбора надлежащих реактивов, приготовления образцов, проведения исследования, приготовления препаратов для ISH и интерпретации результатов.
2. Окрашивание ткани зависит от ее обработки и подготовки до окрашивания. Неверная фиксация, заморозка, размораживание, промывание, сушка, подогрев, секционирование или загрязнение другими тканями или жидкостями могут приводить к артефактам, захвату антител или ложноотрицательным результатам. Противоречивые результаты могут быть следствием изменения способа фиксации и заливки или же свойственной ткани неравномерности.
3. Чрезмерное или неполное контрастное окрашивание может подвергнуть риску правильность интерпретации результатов.
4. Клиническая интерпретация любого положительного окрашивания или его отсутствия должна проводиться в контексте клинического анамнеза, морфологических данных и прочих гистопатологических критериев. Квалифицированный патогистолог должен хорошо ориентироваться в реактивах и методах, используемых для приготовления окрашенных препаратов. Окрашивание должно производиться в лаборатории, имеющей сертификат и лицензию на проведение подобных методов под руководством патогистолога, который несет ответственность за проверку окрашенных препаратов и обеспечение адекватного контроля.
5. Ventana предоставляет реактивы в оптимальном для использования в соответствии с инструкцией разведении. Последующее разведение может привести к неадекватному окрашиванию; любое подобное изменение должно быть валидировано. Любое отклонение от рекомендуемого метода может привести к недостоверности полученных результатов. Необходимо применять надлежащие контроли и регистрировать их использование. Пользователи, отклоняющиеся от рекомендованной процедуры исследования, несут ответственность за интерпретацию результатов обследования пациента.
6. В связи с вариацией обработки образцов может возникнуть необходимость в удлинении или укорочении времени обработки ISH-протеазой или в использовании другой ISH-протеазы для отдельных образцов. Любые подобные изменения должны валидироваться. Пользователи, отклоняющиеся от рекомендованной процедуры исследования, несут ответственность за интерпретацию результатов.
7. При использовании ранее не исследовавшихся тканей реактивы могут демонстрировать непредвиденные реакции. Вероятность появления непредвиденных реакций не может быть полностью исключена даже в группе исследовавшихся тканей по причине биологической вариабельности тканей. При возникновении непредвиденных реакций они должны быть зафиксированы, и сведения следует отослать в местное представительство Ventana.

## ЭКСПЛУАТАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Аналитическая чувствительность зонда INFORM Chromosome 17 оценивалась с помощью контрольных препаратов *HER2* 3-в-1 Xenograft, которые ранее были охарактеризованы в отношении количества копий гена *HER2* и 17 хромосомы с использованием Abbott/Vysis PathVysion; и были признаны сопоставимыми. Кроме того, 50 образцов тканей человека (составленных из смеси *HER2*-положительных, отрицательных и неясных случаев[2], которые были характеризованы ранее при помощи FISH) окрашивались с помощью зонда INFORM *HER2* DNA и зонда INFORM Chromosome 17, и подсчет проводился тремя разными квалифицированными специалистами. В 2 случаях препараты не прошли проверку адекватности в связи ненадлежащим качеством тканей. В 4 случаях препараты не прошли проверку адекватности в связи со слабым окрашиванием. 44 образца из 50 были признаны соответствующими, и подсчет проводился согласно указанным в инструкции-вкладыше к ДНК-зонду INFORM *HER2* методам. Результаты представлены в таблице ниже, отражая сопоставимость результатов, полученных при использовании ДНК-зонда INFORM *HER2* и зонда INFORM Chromosome 17 результатам по FISH, в клинических образцах.

| Образцы с определением HER2/Chromosome 17 статуса при помощи FISH | Эксперт 1 (% соответствия с FISH) | Эксперт 2 (% соответствия с FISH) | Эксперт 3 (% соответствия с FISH) |
|---|---|---|---|
| Отрицательный (HER2/Chr 17 отношение <1,8) (**n= 21**) | 100 | 100 | 100 |
| Неясный (HER2/Chr 17отношение <2,2) (n= 1) **Отношение FISH 2,2**) | Количество баллов отношения HER2/Chr 17 равно 2,3 | Количество баллов отношения HER2/Chr 17 равно 2,4 | Количество баллов отношения HER2/Chr 17 2,9 |
| Положительный (HER2/Chr 17 отношение >2,2 (**n=22**) | 100 | 100 | 100 |

*Таблица 2 Аналитическая чувствительность*



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

# INFORM HER2 DNA Probe

Номер по каталогу 780-4332  05273439001

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Данный реагент предназначен для диагностики in vitro (IVD).

Зонд Ventana Medical Systems' (Ventana) INFORM HER2 DNA Probe предназначен для определения амплификации гена *HER2* с помощью реакции гибридизации хромогенного серебра in situ (SISH) в срезах зафиксированной формалином, залитой в парафин препарата рака молочной железы после окрашивания на автоматическом приспособлении для окрашивания гистологических препаратов компании Ventana с использованием оптической микроскопии. Зонд INFORM HER2 DNA Probe используется в качестве вспомогательного средства для оценки пациентов, которым предполагается провести курс терапии Герцептином (трастузумабом).

Зонд INFORM HER2 DNA Probe показал способность к определению амплификации гена *HER2* с помощью хромогенного серебра в срезах зафиксированной формалином, залитой в парафин препарата ткани желудка человека после окрашивания на автоматическом приспособлении для окрашивания Ventana BenchMark, BenchMark LT, BnchMark XT с использованием оптической микроскопии.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ

Зонд INFORM HER2 DNA Probe охватывает приблизительно 200 000 пар оснований в гене *HER2* (также известном как *ERBB2* или *NEU*). Зонд, меченный DNP, предназначен для определения амплификации гена *HER2*, которая происходит у определенного процента пациентов, которым поставлен диагноз инвазивный рак молочной железы.[1] *HER2/neu* (*HER2*) входит в группу из четырех трансмембранных рецепторов тирозинкиназы, являющимися медиаторами роста, дифференциации и выживания клеток.[2,3] Ген *HER2* располагается в хромосоме 17 (17q11.2-q2) (1) и кодирует протеин HER2.[3,4] Сверхэкспрессия протеина HER2, амплификация гена *HER2*, или то и другое возникает приблизительно у 15 из 25 процентов пациентов, страдающих раком молочной железы и обуславливает агрессивное поведение опухоли.[5,1]

Многие клинические исследования амплификации и (или) сверхэкспрессии HER2 показали, что подобные явления связаны с плохими прогнозами для женщин, страдающих инвазивным раком молочной железы, а также коррелирует с некоторыми отрицательными прогностическими переменными, включая отрицательный статус рецептора эстрогена (ER), высокую фракцию клеток в S-фазе, положительные данные по метастазам в лимфатические узлы, мутацию p53 и высокую злокачественность (характеристики ядра).[6,7] Некоторые исследования показали, что у пациентов с инвазивным раком молочной железы (с метастазами в лимфатические узлы и без) при амплификации гена *HER2* общая выживаемость снижалась, и повышалась частота рецидивов.[1,8,9,10,11] Клинические исследования по измерению сверхэкспрессии протеина HER2 иммуногистохимическим путем показали результаты, сходные с теми, которые были получены путем амплификации гена *HER2*.[9,11,12,13] Таким образом, данные о состоянии гена и (или) протеина *HER2* у пациентов с инвазивным раком молочной железы позволяют врачам получить больше информации для принятия решения и повысить общее качество курса лечения своих пациентов.

Трастузумаб (герцептин) – это гуманизированное моноклональное антитело к внешнему домену HER2. Препарат оказывает положительный эффект у пациентов, страдающих HER2-положительным раком молочной железы.[14,15,16,17,18,19] Демонстрация амплификации гена *HER2* и (или) сверхэкспрессии протеина является важным фактором при назначении трастузумаба. Клинические исследования показали, что трастузумаб более эффективен для пациентов, страдающих раком молочной железы с высоким процентом сверхэкспрессии протеина HER2 и (или) амплификацией гена.[20] Определение амплификации гена *HER2* и (или) сверхэкспрессии необходимо выполнять для пациентов с инвазивным раком молочной железы, которым предполагается провести курс лечения трастузумабом или которые имеют для этого клинические показания.

## ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Зонд INFORM HER2 DNA Probe поставляется в оптимальном состоянии для использования с диагностическим набором Ventana *ultra*View SISH Detection Kit и вспомогательными реагентами на автоматических приспособлениях для окрашивания гистологических препаратов Ventana. В ходе реакции гибридизации серебра in situ (SISH), зонды, меченные DNP, связываются со специфической целевой последовательности ДНК в клетках или тканях. Зонд, меченный DNP, визуализируется при помощи набора Rabbit anti-DNP primary antibody и *ultra*View SISH Detection Kit. Диагностический набор содержит антитело козла к иммуноглобулину кролика, связанному с пероксидазой хрена (HRP) в качестве хромогенного фермента. Химизм SISH-реакции в кратком изложении состоит в последовательном добавлении реагентов Silver A (ацетата серебра), Silver B (гидрохинона) и Silver C ($H_2O_2$). При этом ионы серебра (Ag+) восстанавливаются гидрохиноном до атомов металлического серебра (Ag0). Субстратом пероксидазы хрена в этой реакции служит перекись водорода (реагент Silver C). Дисперсное металлическое серебро осаждается в ядрах, при этом каждая копия гена *HER2* проявляется в виде черной точки. Далее происходит окрашивание фона образца для интерпретации результатов при помощи световой микроскопии. На рис. 1 представлена SISH-реакция.

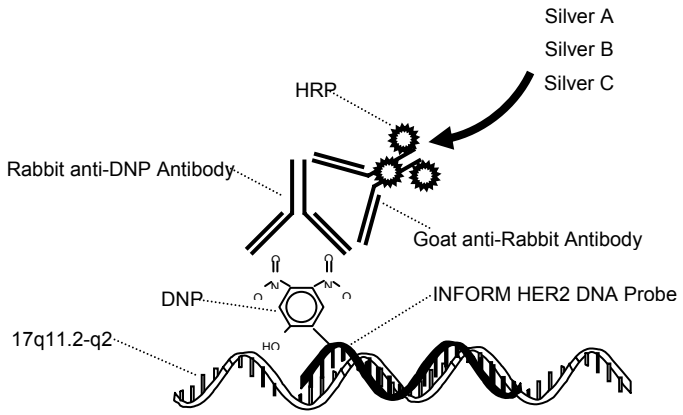



*Рис. 1 SISH-реакция*

Каждая стадия протокола окрашивания предусматривает инкубацию образца при определенной температуре в течение точно определенного времени. По окончании каждой из стадий инкубации срезы промываются автоматическим приспособлением для окрашивания гистологических препаратов компании Ventana, для прекращения реакции и удаления несвязанного материала, который может препятствовать протеканию необходимой реакции на последующих стадиях. Чтобы уменьшить процесс испарения водных растворов реагентов со стекла, в приспособлении для окрашивания на него на каждом этапе наносится жидкое покровное стекло. Более подробную информацию о работе прибора см. в соответствующем руководстве по эксплуатации автоматического приспособления для окрашивания гистологических препаратов компании Ventana.

## МАТЕРИАЛЫ

### Реагенты, входящие в комплект поставки

INFORM HER2 DNA Probe содержит количество реагентов, достаточное для выполнения 50 определений.

1 – Флакон-дозатор с зондом INFORM HER2 DNA емкостью 10 мл, содержит приблизительно 10 мкг/мл зонда HER2, меченного динитрофенолом (DNP), в сочетании с вытяжкой плаценты человека, блокирующей ДНК, в буферном растворе на основе формамида для проведения гибридизации. Определение состояния гена *HER2* (например, соотношение HER2 / хромосома 17) требует использования зонда Ventana INFORM Chromosome 17 Probe на отдельных срезах для каждого образца тканей.

### Разведение перед использованием, смешивание, разбавление, титрование

Не требуется никакого разведения, смешивания, разбавления или титрования. Попытка разбавления может привести к потере чувствительности при окрашивании. Пользователь должен валидировать какие-либо изменения такого рода.

### Материалы и реагенты, необходимые для работы, но не входящие в комплект поставки

Для окрашивания потребуются следующие реагенты и материалы, не поставляемые с реагентом:

1. Ventana INFORM Chromosome 17 Probe [№ по каталогу 780-4331]
2. Ventana *ultra*View SISH Detection Kit [№ по каталогу 780-001]
3. Ventana Rabbit anti-DNP Antibody [№ по каталогу 780-4335]
4. Ventana *ultra*View Silver Wash II [№ по каталогу 780-003 или его эквивалент]
5. Положительный контроль образца
6. Ventana HER2 3-in-1 Xenograft Control Slides [№ по каталогу 783-4332 или эквивалент]*
7. Ventana ISH Protease 2 [№ по каталогу 780-4148]*
8. Ventana ISH Protease 3 [№ по каталогу 780-4149]*

9. Ventana Hematoxylin II Counterstain [№ по каталогу 790-2208]*
10. Ventana Bluing Reagent [№ по каталогу 760-2037]*
11. Ventana Reaction Buffer (10X) [№ по каталогу 950-300]
12. Ventana SSC (10X) [№ по каталогу 950-110]
13. Ventana EZ Prep Reagent (10X) [№ по каталогу 950-102]
14. Ventana Cell Conditioning 2 (Pre-dilute) [№ по каталогу 950-123]
15. Реагент Ventana Liquid Coverslip (High Temperature) [№ по каталогу 650-010]
16. Автоматическое приспособление для окрашивания BenchMark, BenchMark LT, BnchMark XT
17. Этикетки со штрих-кодом
18. Предметные стекла Superfrost Plus (VWR № по катаолгу 48311-703 или эквивалент).
19. Ксилол (для гистологии)
20. Этанол или спиртовой реактив (для гистологических исследований)

    100 % раствор: неразбавленный этанол или спиртовый реактив

    90 % раствор: смесь 90 частей этанола или спиртового реактива с 10 частями деионизированной воды

    80 % раствор: смесь 80 частей этанола или спиртового реактива с 20 частями деионизированной воды
21. Ацетон (для гистологии)
22. Деионизированная или дистиллированная вода
23. Заключающая среда Permanent Mounting medium (№ по каталогу Permount Fisher SP15-500 или эквивалент)
24. Покровное стекло (достаточное для покрытия срезов тканей, такое как с номером по каталогу VWR. 48393-60 или эквивалентное)
25. Автоматическое устройство для заключения препаратов под покровное стекло (например, Tissue-Tek SCA)
26. Сосуды или кюветы для окрашивания микропрепаратов
27. Таймер (поддерживающий интервалы 2-10 минут)
28. Оптический микроскоп

* По мере необходимости для решения конкретных практических задач.

### Хранение и обращение

Хранить при температуре от 2 до 8 °C. Не замораживать. Пользователь должен валидировать любые условия хранения, отличные от указанных на вкладыше в упаковку.

Для обеспечения надлежащего дозирования реагента и сохранения его стабильности после каждого определения, дозатор необходимо всегда закрывать колпачком и немедленно помещать в холодильник в вертикальном положении.

На каждом дозаторе указан срок годности. При надлежащем хранении реагент сохраняет стабильность до даты, указанной на этикетке. Запрещено использовать реагент после окончания срока годности для предписанного способа хранения.

Поскольку четкие признаки, свидетельствующие о нестабильности данного продукта, отсутствуют, одновременно с исследованием неизвестного образца следует провести определение на положительном и отрицательном контролях. При появлении признаков нестабильности реагента следует незамедлительно связаться с местным представительством компании Ventana.

### Сбор образцов и подготовка к проведению анализа

Обработанные согласно стандартных методик, зафиксированные формалином и залитые в парафин ткани пригодны для исследования данным реагентом. Каждый срез должен иметь надлежащую толщину (приблизительно 4 микрона) и быть помещен на предметное стекло Superfrost Plus. Рекомендуется использовать в качестве фиксатора для ткани 10 %-ный нейтральный забуференный формалин.[21] При неправильной фиксации результаты могут плохо воспроизводиться.

## ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

### Для диагностики *in vitro*:

1. Только для диагностики *in vitro*.
2. Соблюдайте соответствующие меры предосторожности при обращении с реагентами. Используйте одноразовые перчатки при работе с предполагаемыми канцерогенами или токсичными материалами (например, ксилолом или формамидом).
3. Избегайте контакта реагентов с глазами или слизистыми оболочками. Если произошел контакт реагентов с чувствительными областями тела, промойте их большим количеством воды.
4. С образцами, взятыми у пациентов, и всеми материалами, которые имели контакт с ними, следует обращаться как с биологически опасными материалами, и их следует утилизировать с надлежащими мерами предосторожности. Запрещено набирать жидкость в пипетку ртом.
5. Избегайте микробиологического загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению неправильных результатов.
6. Реагенты поставляются в состоянии оптимального разбавления, и дополнительное их разбавление может привести к потере надлежащей окрашивания. Пользователь должен валидировать какие-либо изменения такого рода.
7. Формамид оказывает раздражающее действие на кожу, глаза и слизистые оболочки и проникает сквозь кожу. Есть экспериментальные свидетельства его тератогенного действия и воздействия на репродуктивную систему. Сообщалось о возможности возникновения мутаций. Работайте в соответствующей защитной одежде.
8. Обратитесь к местным или государственным органам власти для получения информации о рекомендуемом методе утилизации.

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

### Постадийная процедура

Данный реагент предназначен для использования на автоматическом приспособлении для окрашивания Ventana в сочетании с диагностическими наборами и вспомогательными реагентами Ventana detection kit. Параметры выполнения автоматических процедур можно просмотреть, распечатать и изменить в соответствии с руководством по эксплуатации. Другие рабочие параметры автоматических приспособлений для окраски гистологических препаратов предварительно настроены на предприятии компании-изготовителя. Рекомендуемые протоколы перечислены ниже

| Процедура | Зонд INFORM HER2 DNA Probe | |
|---|---|---|
| **Депарафинир.** | √ | |
| **Пролонг. CC2** | √ | |
| **ISH-Protease 3** | 8 мин | |
| **HER2 DNA Probe** | √ | |
| **Время гибрид-ии** | 6 ч | |
| **Silver C** | 4 мин | |
| **Контр-окрашивание** | Hematoxylin II | 8 мин |
| **Обработка после контр-окрашивания** | Bluing Reagent | 4 мин |

*Таблица 1. Рекомендуемые протоколы для зонда INFORM HER2 DNA при использовании устройств серии Ventana BenchMark*

**Автоматические приспособления для окраски гистологических препаратов серии BenchMark**

1. Наклейте этикетку со штрих-кодом, которая соответствует выполняемому протоколу для данного зонда.
2. Загрузите зонд INFORM HER2 DNA Probe, реагенты диагностического набора *ultra*View SISH Detection Kit и необходимые вспомогательные реагенты в лоток для реагентов и поместите лоток в автоматическое приспособление для окрашивания гистологических препаратов. Проверьте заполненность флаконов с жидкостями и состояние контейнеров для отходов.
3. Поместите стекла в автоматическое приспособление для окраски гистологических препаратов.
4. Начните проведение процесса окрашивания.
5. По завершении процесса извлеките стекла из автоматического приспособления для окраски гистологических препаратов.
6. Далее приступайте к процедуре удаления воды.

**Процедура удаления воды**

1. Чтобы удалить жидкое покровное стекло, промойте стекла 2 кюветах с раствором мягкого моющего средства для мытья посуды (не используйте средство для автоматических посудомоечных машин).
2. В течение 1 минуты тщательно промойте стекла дистиллированной водой. Стряхните излишки воды.
3. Приблизительно на 1 минуту погрузите стекла в кювету с 80 % этанолом.
4. Приблизительно на 1 минуту погрузите стекла в кювету с 90 % этанолом.
5. Приблизительно на 1 минуту погрузите стекла в кювету с 100 % этанолом.
6. Приблизительно на 1 минуту вновь погрузите стекла в кювету с 100 % этанолом.

7. 10 раз окуните стекла в 100 %-ный ацетон (используется однократно; после каждого сеанса окрашивания следует заменить ацетон на свежий). Не оставляйте стекла в ацетоне.
8. Приблизительно на 30 секунд погрузите стекла в первую кювету с ксилолом.
9. Приблизительно на 30 секунд погрузите стекла во вторую кювету с ксилолом.
10. Накройте предметное стекло покровным стеклом.

Примечание: Чтобы обеспечить полное удаление воды, необходимо часто менять кюветы с этанолом и при необходимости можно использовать третью кювету со 100 % этанолом.

## Процедуры контроля качества

### Контроль образцов

Положительный контроль образца должен проводиться при каждой процедуре окрашивания. Контроли используются для подтверждения нанесения зонда и надлежащей работы оборудования. Данный образец должен содержать положительно окрашивающиеся клетки или компоненты тканей. В качестве контрольных образцов следует использовать образцы, полученные при помощи биопсии, препарированные и/или прошедшие фиксацию тем же способом, что и образцы, взятые у пациента. Такие контроли позволяют проследить за всеми стадиями процедуры, от подготовки образца до его окрашивания. Использование образцов, прошедших иной процесс фиксации или обработанных иначе, чем исследуемые образцы, обеспечит контроль для всех реагентов и стадий метода, за исключением стадий фиксации и обработки образца. Нормальные сигналы HER2 (1-2 копии на клетку) служат для внутреннего положительного контроля; они обязательно должны быть видны в образце. В то же время не во всех клетках обнаруживается даже одна копия гена, что обусловлено биологической неоднородностью. Специфическое окрашивание ядерного вещества может наблюдаться в разнообразных типах клеток, в том числе: стромальных фибробластах, клетках эндотелия, лимфоцитах, а также неопухолевых эпителиальных клетках молочной железы. Если положительные контроли не обнаруживают положительное окрашивание, результаты изучения исследуемых образцов должны быть признаны недействительными.

Полезными могут оказаться контрольные тесты на основе гетеротрансплантатов; их используют для предварительной валидации метода обработки срезов при их окрашивании с применением наборов INFORM HER2 DNA Probe и Chromosome 17 Probe и как контроль в ходе сеанса. Компания Ventana поставляет наборы контрольных срезов HER2 3-in-1 Xenograft Control Slides, в каждом из которых содержатся три различных гетеротрансплантатных среза, зафиксированных формалином и заключенных в единый парафиновый блок. Гетеротрансплантатные срезы были отобраны на основе набора характеристик, принятых для сверхэкспрессии в опубликованных литературных источниках, а также исходя из числа копий гена. Поскольку каждая нормальная клетка содержит две копии гена *HER2,* подлинно отрицательного контрольного образца не существует.

### Реагент положительного контроля

Положительный контроль действенности реагентов следует проводить в ходе верификации и отладки метода определения, так как доступность ДНК и РНК может различаться в зависимости от метода фиксации образца и его предварительной обработки. Возможность использовать для этой цели зонда INFORM HER2 DNA Probe обусловлена тем, что каждая нормальная клетка содержит от одной до двух копий HER2.

### Необъяснимые расхождения

О необъяснимых расхождениях в контролях следует немедленно известить местное представительство компании Ventana. Если результаты контроля качества не соответствуют спецификациям, результаты, полученные на образцах пациента, следует считать недействительными. См. раздел «Проблемы и их устранение» в данном вкладыше. Идентифицируйте и устраните причину несоответствия, а затем повторите исследование образцов, взятых у пациента.

### Проверка качества метода определения

Перед первым использованием реагента в диагностическом методе характеристики реагента должны быть проверены на серии образцов с установленными ISH характеристиками (см. Процедуры контроля качества, описанные ранее в этом разделе листка-вкладыша к продукту). Перечисленные процедуры контроля качества следует повторять для каждой новой партии реагентов, а также при внесении любого изменения в параметры исследования.

## Интерпретация результатов

Прежде чем интерпретировать результаты, контрольные данные следует отдать на просмотр квалифицированному эксперту, имеющему опыт в интерпретации микросимптоматики рака в образцах ткани молочной железы, в технике гибридизации in situ, а также в распознавании единичных и амплифицированных копий HER2 (для чего может понадобиться микроскопическое исследование под объективом с большим увеличением, вплоть до 40x – 60x).

### Определения

1. Статус гена *HER2*. Статус гена *HER2* есть функция отношения среднего числа копий гена *HER2* к среднему числу копий Хромосомы 17 (Chr17), приходящихся на одну клетку, в составе ткани инвазивной формы рака молочной железы. Статус гена *HER2* классифицируют согласно следующим правилам[22].
   a. Отрицательный в отношении амплификации гена *HER2*. Характеризуется отношением HER2/Chr17 менее 1,8.
   b. Неопределенный в отношении амплификации гена *HER2*. Характеризуется отношением HER2/Chr17 в пределах от 1,8 до 2,2.
   c. Положительный в отношении амплификации гена *HER2*. Характеризуется отношением HER2/Chr17 более 2,2.
2. Приемлемость (адекватность) среза ткани. Чтобы считаться пригодным для процедуры подсчёта, каждый отдельно взятый срез ткани HER2 или Chr17 должен удовлетворять двум описанным ниже критериям. Если этого соответствия нет, подсчёт проводить нельзя и результат признается неудовлетворительным.
   a. Внутренний положительный контроль. Нормальные сигналы HER2 или CHR17 (1-2 копии на клетку) служат для внутреннего положительного контроля; они обязательно должны быть видны в образце. Окрашивание ядерного вещества может наблюдаться в разнообразных типах нераковых клеток, в том числе: стромальных фибробластах, клетках эндотелия, лимфоцитах, а также доброкачественных эпителиальных клетках молочной железы.
   b. Раковые клетки. В поле зрения объектива с увеличением 20x – 40x инвазивная раковая опухоль молочной железы должна обеспечивать хорошо различимые сигналы SISH.
3. Рабочие области для подсчета сигналов. Приемлемая рабочая область в пределах инвазивной опухоли служит полем зрения для подсчета сигналов SISH. Подсчет сигналов не следует проводить в тех областях, где сигнал SISH ослаблен, ядра сплюснуты или растянуты, или наблюдается некроз.

### Дополнительные наблюдения для HER2 и Chr17

Другие наблюдения, касающиеся SISH окрашивания HER2 или Chr17, могут также оказаться клинически значимыми. Их следует записывать в комментариях к отчету патоморфолога.

1. Неоднородность: В некоторых случаях ткань может содержать участки инвазивного рака молочной железы, которые являются генетически неоднородными в отношении числа копий HER2 (иными словами, может существовать смесь неамплифицированных и амплифицированных ядер, или же смесь амплифицированных ядер, но с различным числом копий HER2). Это различие можно наблюдать как между раковыми клетками в пределах одной рабочей области, так и между различными рабочими областями.
2. Полисомия: состояние, в котором организм имеет как минимум на одну хромосому больше обычного, то есть число хромосом определенного вида не диплоидно (может иметь место три или более копий хромосомы вместо ожидаемых двух копий)
3. Моноаллельное элиминирование: Удаление гена *HER2* из хромосомы 17 или потеря хромосомы 17.

### Визуализация сигнала

Сигналы SISH визуализируются следующим образом:

1. Единичная копия. Дискретная точка считается единичной копией HER2 или Chr17. Дискретные единичные точки, которые проявляются в ядрах при внутреннем положительном контроле, дают представление о размере отдельной копии гена в клетках инвазивных форм рака.
2. Совокупности копий. Дискретные единичные точки, которые проявляются в ядрах при внутреннем положительном контроле, дают представление о размере отдельной копии гена в клетках инвазивных форм рака. Размеры единичных точек служат меркой для определения относительного числа амплифицированных копий в ядрах раковой клетки.
3. Кластеры. Кластер большого размера из множества сигналов считается набором 12 копий, а кластер малого размера – набором из 6 копий.

| | |
|---|---|
|  | Не считать при наложении ядер |
|  | Не считать, ели отсутствует сигнал |
|  | Не считать, если нет специфич. окрашивания |
|  | Считать за 1 |
|  | Считать за 2 |
|  | Считать за 8 |
|  | Считать за 16. Один большой кластер и 4 одиночных сигнала. |

*Таблица 2. Визуализация вигнала*

**Критерии отбора клеток**

Учитывайте только те ядра, диаметр которых охватывается средней популяцией для ядер инвазивной формы рака в рабочей области. Не учитывайте сигналы от ядер. которые:

1. Намного превосходят в диаметре средний размер ядра в раковых клетках
2. Намного уступают в диаметре среднему размеру ядра в раковых клетках

В рабочих областях, которым свойственна генетическая неоднородность по отношению к числу копий HER2, учитывайте только ядра, представляющие популяцию ядер инвазивного рака с максимальным средним числом сигналов.

**Определение статуса гена HER2**

Имеются два приемлемых метода определения статуса гена *HER2*: метод № 1 и метод № 2. Листинги с примерами оценок даны в Приложении А.

**Статус гена HER2: Метод № 1**

Используя серии окрашенных срезов, удовлетворяющих критериям адекватности, задайте одну и ту же рабочую область для HER2 и Chr17 и проведите полуколичественное определение среднего числа сигналов в рабочей области. Рассчитайте отношение HER2/Chr17 делением среднего числа сигналов HER2 на среднее число сигналов Chr17. Случаи, когда наблюдается отношение HER2/Chr17 < 1,4, отрицательны к амплификации гена *HER2*, в то время как случаи, когда HER2/Chr17 > 4,0, положительны к амплификации гена *HER2*. Случаи, когда отношение HER2/Chr17 лежит в пределах от 1,4 до 4,0, следует оценивать по методу №2.

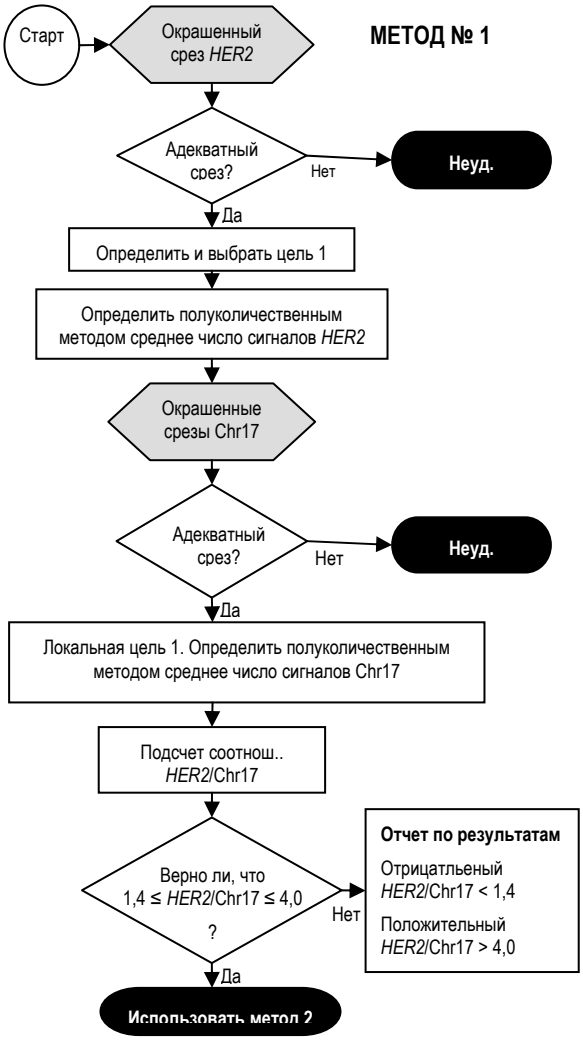



*Рис 2. Метод № 1*

**Статус гена HER2: Метод № 2**

Используя серии окрашенных срезов, удовлетворяющих критериям адекватности, задайте одну и ту же рабочую область для HER2 и Chr17 и проведите подсчет числа сигналов в 20 ядрах. Рассчитайте отношение HER2/Chr17 делением общего числа сигналов HER2 на общее число сигналов Chr17. Случаи, когда наблюдается отношение HER2/Chr17 < 1,8, отрицательны к амплификации гена *HER2*, в то время как случаи, когда HER2/Chr17 > 2,2, положительны к амплификации гена *HER2*.

Для случаев, когда отношение HER2/Chr17 лежит в пределах от 1,8 до 2,2, воспользуйтесь методом №2A.

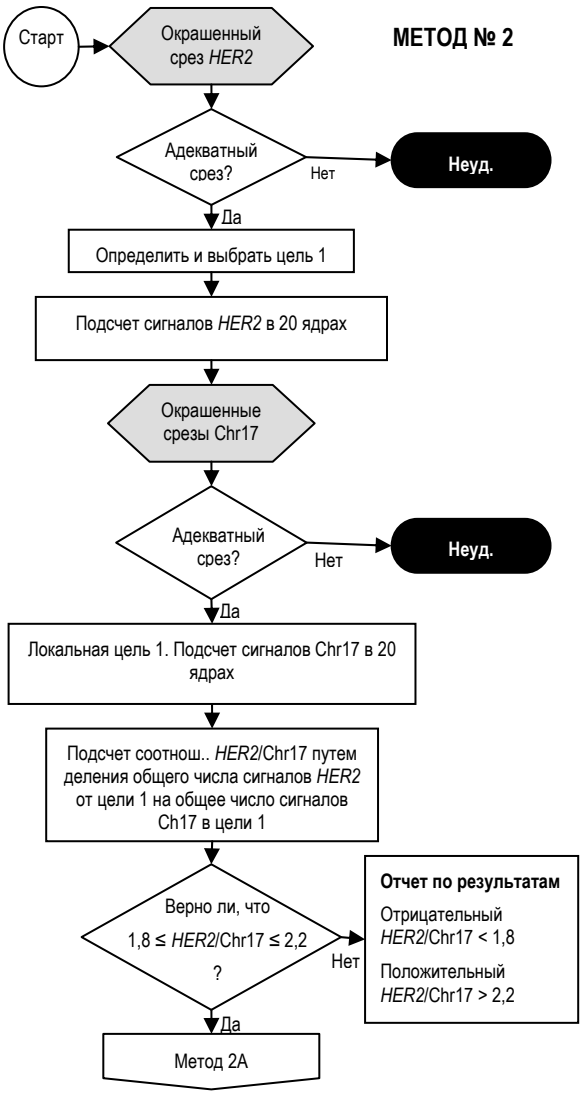



*Рис 3. Метод № 2*

**Статус гена HER2: Метод № 2A**

Для случаев, когда отношение HER2/Chr17 лежит в пределах от 1,8 до 2,2, выберите дополнительную рабочую область как для оценки HER2, так и для оценки Chr17, и проведите подсчет числа сигналов в 20 ядрах. Рассчитайте отношение HER2/Chr17 путем деления полного числа сигналов HER2 в двух рабочих областях на полное число сигналов Chr17 в двух рабочих областях, охватываемых методами №№2 и 2A. Случаи, когда наблюдается отношение HER2/Chr17 < 1,8, отрицательны к амплификации гена *HER2*, в то время как случаи, когда HER2/Chr17 > 2,2, положительны к амплификации гена *HER2*. Случаи, когда отношение HER2/Chr17 лежит в пределах от 1,8 до 2,2, индифферентны к амплификации гена *HER2*.

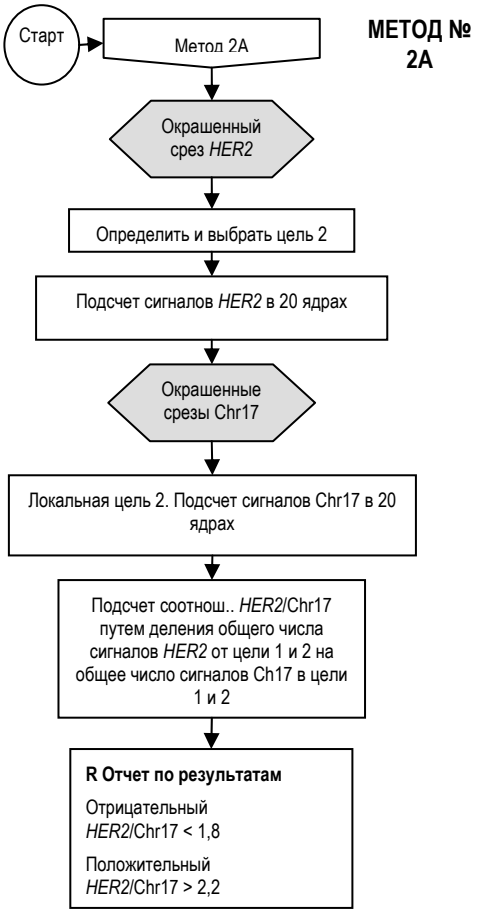



*Рис 4. Метод № 2A*

**Контроли**

В первую очередь должен исследоваться окрашенный положительный контроль действенности реагентов и пригодности образца; это позволяет убедиться в надлежащем функционировании всех реагентов. Появление осадка серебра в пределах клеточного ядра служит признаком положительной реакционной способности. Нормальные клетки, попадающие в то же поле зрения, служат для внутреннего контроля процесса окрашивания. Ядра нормальных клеток содержат в среднем 1-2 дискретных точки, указывающие на то, зонд HER2 DNA Probe гибридизуется к гену. Если в нормальных клетках не удается обнаружить ни единой копии гена, сеанс окрашивания признается не удавшимся, а его результаты считаются недействительными.

Если контроли не обнаруживают соответствующего окрашивания, все результаты, полученные для исследуемых образцов, считаются недействительными.

**Образец пациента**

Образцы тканей пациента следует исследовать последними. Данные морфологического исследования образцов тканей пациента и соответствующие

клинические результаты должны анализироваться квалифицированным патоморфологом.

## ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Гибридизация *in situ* (ISH) представляет собой многостадийный метод, для реализации которого требуется специальное обучение методам выбора необходимых реагентов, образцов, их подготовки, обработки, приготовления среза для гибридизации, а также интерпретации результатов.
2. Окраска тканей зависит от обращения с тканями и их обработки перед окрашиванием. Неправильное проведение процесса фиксации, замораживания, оттаивания, промывки, сушки, нагрева, получения срезов или загрязнение другими тканями или жидкостями может привести к артефактам, захвату антител или ложно-отрицательным результатам. Несогласующиеся результаты могут быть получены вследствие несоблюдения режимов процессов фиксации и заливки или присущей ткани неоднородности.
3. Избыточное или неполное контр-окрашивание может затруднить правильную интерпретацию результатов.
4. Клиническая интерпретация любого положительного окрашивания или его отсутствия должна проводиться в контексте истории болезни, морфологии и прочих гистопатологических критериев. На квалифицированном патоморфологе лежит ответственность за достаточное знание свойств реагентов и методов, используемых при получении окрашенных препаратов. Окрашивание должно проводиться в сертифицированной, имеющей соответствующую лицензию лаборатории под надзором патоморфолога, который несет ответственность за проверку окрашенных срезов и обеспечение правильности контрольных тестов.
5. Компания Ventana обеспечивает заказчика реагентами в их оптимальном для использования разведении, если соблюдаются прилагаемые инструкции. Попытка дополнительного разбавления может привести к потере окрашиваемости; пользователь обязан валидировать любые изменения такого рода. Любые отклонения от рекомендуемых методик проведения исследования могут обесценить ожидаемые результаты. Должны использоваться надлежащие контроли, что также должно регистрироваться документально. Пользователи, допускающие отклонения от рекомендуемых методик проведения исследования, должны нести ответственность за интерпретацию результатов, полученных на образцах ткани пациента.
6. Поскольку условия подготовки образца не всегда постоянны, для получения оптимальных результатов окрашивания может оказаться необходимым увеличить время гибридизации. Кроме того, для отдельных образцов может понадобиться увеличить или уменьшить время обработки ISH протеазой, либо использовать другую ISH протеазу. Эти изменения должны быть валидированы пользователем. Если пользователь отклоняется от рекомендованной процедуры исследования, он несет ответственность за интерпретацию результатов исследования образцов пациента, обработанных в измененных условиях.
7. Реагенты могут вступать в непредвиденные реакции при работе с ранее неисследованными тканями. Возможность непредвиденных реакций нельзя полностью исключить даже для проверенных групп тканей, что обусловлено биологической изменчивостью последних. С документированным описанием непредвиденной реакции необходимо обратиться в местное представительство компании Ventana.

## ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Аналитическую чувствительность зонда the INFORM HER2 DNA Probe оценивали с помощью контрольных срезов *HER2* 3-in-1 Xenograft Control Slides, которые предварительно проверяли на число копий гена *HER2* методом FISH с использованием устройства Abbott/Vysis PathVysion, причем было показано согласие результатов двух методик. Кроме того, 50 образцов ткани, взятых у пациентов (куда входили отрицательные, положительные и индифферентные к амплификации образцы, предварительно исследованные методом FISH), были окрашены при помощи зондов INFORM HER2 DNA Probe и INFORM Chromosome 17 Probe, при этом подсчет велся тремя опытными экспертами. В 2 случаях не соблюдался критерий адекватности срезов, поскольку качество образцов ткани было неудовлетворительно. В 4 случаях образцы не прошли критерия адекватности по причине тусклой окраски. В 44 из 50 случаев образцы были признаны годными и оценены согласно описанным методам. Результаты для клинических образцов ткани, представленные ниже в таблице, показывают согласие методик, основанных на применении зондов INFORM HER2 DNA Probe и Chromosome 17, с данными FISH.

| Обр. ткани со статусом гена *HER2*, определённым методом FISH | 1-й эксперт (% согласия с FISH) | 2-й эксперт (% согласия с FISH) | 3-й эксперт (% согласия с FISH) |
|---|---|---|---|
| Отрицат. (отношение HER2/Chr 17 <1,8) (**n= 21**) | 100 | 100 | 100 |
| Индиффер. (1,8<HER2/Chr 17 ratio<2,2) (**n=1: м-дом FISH 2.2**) | Оценка HER2/Chr 17 2,3 | Оценка HER2/Chr 17 2,4 | Оценка HER2/Chr 17 2,9 |
| Положит. (отношение HER2/Chr 17 >2,2) (**n= 22**) | 100 | 100 | 100 |

*Таблица 3. Аналитическая чувствительность*

2. Аналитическую специфичность (эффективность гибридизации) зонда INFORM *HER2* DNA Probe оценивали путем окрашивания нормальных метафазных пластинок человека; была показана специфичность к хромосоме 17. Перекрестной отвечаемости к другим хромосомам человека не наблюдалось.
3. Было проведено исследование воспроизводимости результатов окрашивания между отдельными опытами. Исследование охватывало в общей сложности 32 среза ткани, в том числе образцы раковой опухоли молочной железы человека, ранее изученные методом FISH. На каждом из двух приборов (BenchMark XT и BenchMark) были окрашены в каждом опыте следующие срезы: четыре гетеротрансплантатных контрольных среза HER2 3-in-1 Xenograft Control Slides, четыре среза из двух положительных образцов и четыре среза из одного отрицательного образца. Полученные ISH срезы были оценены тремя экспертами на статус амплификации гена *HER2* и характер окрашивания фона согласно разделу "Интерпретация результатов" данного листка-вкладыша. Все срезы, окрашенные с применением зонда INFORM HER2 DNA Probe, показали сопоставимую структуру и приемлемую интенсивность окрашивания. Пользователи должны верифицировать воспроизводимость результатов окрашивания как в пределах одного опыта, так и между опытами путем окрашивания нескольких серий образцов.
4. Воспроизводимость результатов окрашивания между опытами и аппаратными платформами определяли на выборке из 144 срезов ткани в ходе трех отдельных опытов на двух различных типах приборов (двух модели BenchMarkXT и двух модели BenchMark). В ходе каждого опыта были окрашены три контрольных среза HER2 3-in-1 и по три среза каждого из трех образцов ткани раковой опухоли молочной железы человека (два положительных случая и один отрицательный, по данным FISH). Срезы оценивались тремя экспертами на статус амплификации гена *HER2* и характер окрашивания фона, согласно методу № 1. 139 срезов из 144 были признаны годными, а повторная выборка показала 96,5 %-ную степень согласия между платформами и многократными опытами. 5 срезов ткани не прошли критерия адекватности по причине тусклой окраски. Пользователи должны верифицировать воспроизводимость результатов окрашивания как между опытами, так и между инструментальными платформами путем окрашивания нескольких серий образцов.
5. Воспроизводимость от одно лаборатории к другой: В исследовании участвовали три лаборатории. Срезы, полученные из 12 образцов ткани рака молочной железы, зафиксированных нормальным забуференным формалином, а также шесть (6) контрольных срезов HER2 3-in-1 окрашивали на автоматическом устройстве компании Ventana согласно рекомендуемому протоколу. Результаты были переданы в компанию Ventana для анализа данных. Все срезы оценивали согласно методу № 1. Контроль осуществляли при помощи гетеротрансплантатных контрольных срезов HER2 3-in-1 Xenograft Control Slides. В 2 случаях образцы не прошли критерия отбраковки по причине тусклой окраски. В 10 из 12 случаев образцы были признаны годными и оценены согласно предлагаемому алгоритму. Согласие между результатами окрашивания в разных лабораториях имело место в 9 случаях из 10 (90 %), при этом критерием согласия было совпадение оценок всех трех экспертов.
6. Окрашивание тканей рака желудка. Исследование корреляции проводилось между первичным антителом INFORM HER2 DNA и CONFIRM anti-HER-2/neu (4B5) на микропрепаратах тканей рака желудка. Была произведена оценка 153 ядер. Результаты представлены в Таблице 4. Положительный контроль CONFIRM anti-HER-2 (4B5) был определен как 3+, а отрицательный – как 0 или как 1+, в зависимости от системы оценивания по Хофману.[23]

Таблица 4. Корреляция между испытаниями CONFIRM 4B5 и INFORM HER2 DNA.

| | | Испытание INFORM HER2 DNA | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Амплиф. | Неамплиф. | Итого |
| **CONFIRM anti-HER-2 (4B5)** | Положит. | 23 | 1* | 24 (16 %) |
| | Отрицат. | 10# | 119 | 129 (84 %) |
| | Итого | 33 (22 %) | 120 (78 %) | 153 (100 %) |

*В этом случае использовалось 11 копий HER2 и 10 копий Chr17 в соотношении 1,1

# Процентное соотношение IHC отрицат. к ISH положит. (30 %) находится в пределах, установленных для рака желудка (25 %-36 %)[23, 24]

## ПРОБЛЕМЫ И ИХ УСТРАНЕНИЕ

1. Очень важно оценить наличие соответствующих сигналов при внутреннем положительном контроле. Нормальные сигналы HER2 или CHR17 (1-2 копии на клетку) служат для внутреннего положительного контроля; они обязательно должны быть видны в образце. Окрашивание ядерного вещества может наблюдаться в разнообразных типах нераковых клеток, в том числе: стромальных фибробластах, клетках эндотелия, лимфоцитах, а также доброкачественных эпителиальных клетках молочной железы.
2. Недостаточное окрашиевание или слабое окрашивание контрольных стекол HER2 3–in-1 Xenograft Control Slides указывает на возможную проблему с реагентом или инструментом. Проверьте правильность работы всех диспенсеров.
3. Окрашивание неправильно собранных или зафиксированных образцов, а также несоблюдение условий их хранения может не дать надлежащих результатов окрашивания. Для повышения силы сигнала может понадобиться повысить время гибридизации (6 часов). Кроме того, можно использовать ISH Protease 3 более 8 минут или ISH Protease 2 4 минуты и более.
4. Если на срезах обнаруживается фоновое окрашивание, которое может помешать подсчету образцов, ISH Protease 3 можно использовать 4 минуты, вместо 8 минут.
5. Если контрольные срезы HER2 3-in-1 Xenograft Control Slides окрашены правильно, но образцы пациента окрашены плохо, проверьте правильность фиксации образцов пациента. Если образец зафиксирован правильно, но окрашивание слабое, можно использовать ISH Protease 3 более 8 минут или ISH Protease 2 4 минуты и более.
6. О корректирующем воздействии см. раздел Постадийная процедура в Руководстве пользователя автоматического приспособления для окрашивания гистологических препаратов или свяжитесь с вашим местным представительством компании Ventana.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-ongene in human breast and ovarian cancer. Science 1989;244:707-712.
2. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: target for cancer therapy. Nat Rev Cancer 2004;4;361-370.
3. Muleris M, et al., Assignment of v-erb-b2 avian erythroblastic leukemic viral oncogene homolog 2 (ERBB2) to human chromosome band 17121.1 by in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet 1997; 76:34-5.
4. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao Y-C, chen E, Gray A, McGrath et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. Science 1985;230:1132-1139.
5. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987;235:177-182.
6. Narita M, Nakao K, Ogino N, et al. Independent prognostic factors in breast cancer patients. Am J Surg 1998;175:73-75.
7. O'Reilly SM, Barnes DM, Camplejohn RS, et al. The relationship between c-*erb*B-2 expression, S-phase fraction, and prognosis in breast cancer. Br J Cancer 1991;63:444-446.
8. Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, et al. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. Oncogene 1997;15:537-547.
9. Press MF, Pike MC, Chazin VR, et al. HER-2/neu expression in node-negative breast cancer: Direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. Cancer Res 1993;53:4960-4970.
10. Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: Poor prognosis in node-negative breast carcinomas. J Clin Oncol 1997;15:2894-2904.
11. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. J Clin Oncol 1992;10:1049-1056.
12. Bianchi S, Paglierani M, Zampi G, et al. Prognostic significance of c-erbB-2 expression in node negative breast cancer. Br J Cancer 1993;67:625-629.
13. Kallioniemi O-P, Holli K, Visakorpi T, et al. Association of c-erB-2 protein expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. Int J Cancer 1991;49:650-655.
14. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2002;20:719-726.
15. Baselga J, Carbonell X, Castaneda-Soto NJ, et al. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. J Clin Oncol 2005;23:2162-2171.
16. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Concurrent administration of anti-HER2 monoclonal antibody and first-line chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. A phase III, multinational, randomized controlled trial. N Engl J Med 2001;344:783-792.
17. Marty M, Cognetti F, Maraninichi D, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatments: The M77001 Study Group. J Clin Oncol 2005;23:4265-4274.
18. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 2005;353:1659-1672.
19. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 2005;353:1673-1684.
20. Bilous M et al. Current perspectives on HER2 Testing: A review of national testing guidelines. Mod Pathil 2003:173-182.
21. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.
22. Wolff, AC, Hammond, MEH, Schwartz, JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. Arch Pathol Lab Med 2007;131: 18-43.
23. Hofmann M. et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. Histopathology. 52(7):797-805, 2008.
24. Yano T. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. Oncol Rep.15(1):65-71, 2006.


## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ


INFORM, *ultra*VIEW, BENCHMARK, CONFIRM, VENTANA и Ventana являются товарными знаками компании Roche.

Все остальные товарные знаки являются собственностью их владельцев.

Компания Ventana предоставляет Покупателю одноразовую лицнезию на использование следующих патентов: патенты США №№. 6045759, 6192945, 6416713, 6945128, 7378058, и их аналоги за границей.

**КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ**

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

www.ventanamed.com

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.

CE

## Приложение A: Интерпретация результатов – подсчет баллов для Метода № 1, Метода № 2 и Метода № 2A

| **Метод № 1** | |
|---|---|
| | |
| ***HER2*** | |
| Среднее число сигналов *HER2* в целевой области 1 | a |
| | |
| **Chr17** | |
| Среднее число сигналов Chr17 в целевой области 1 | b |
| | |
| **Соотношение *HER2*/Chr17** | c = a/b |
| ☐ **Отрицательное: *HER2*/Chr17 ≤ 1,4** | |
| ☐ **Положительное: *HER2*/Chr17 ≥ 4,0** | |
| ☐ **Использовать метод #2** | |

**Метод № 2**

| **Целевая область 1** | | | | **Метод № 2A** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | **Целевая область 2** | | | |
| Клетка | Подсчет *HER2* | Клетка | Подсчет Chr17 | Клетка | *Подсчет HER2* | Клетка | Подсчет Chr17 |
| 1 | | 1 | | 1 | | 1 | |
| 2 | | 2 | | 2 | | 2 | |
| 3 | | 3 | | 3 | | 3 | |
| 4 | | 4 | | 4 | | 4 | |
| 5 | | 5 | | 5 | | 5 | |
| 6 | | 6 | | 6 | | 6 | |
| 7 | | 7 | | 7 | | 7 | |
| 8 | | 8 | | 8 | | 8 | |
| 9 | | 9 | | 9 | | 9 | |
| 10 | | 10 | | 10 | | 10 | |
| 11 | | 11 | | 11 | | 11 | |
| 12 | | 12 | | 12 | | 12 | |
| 13 | | 13 | | 13 | | 13 | |
| 14 | | 14 | | 14 | | 14 | |
| 15 | | 15 | | 15 | | 15 | |
| 16 | | 16 | | 16 | | 16 | |
| 17 | | 17 | | 17 | | 17 | |
| 18 | | 18 | | 18 | | 18 | |
| 19 | | 19 | | 19 | | 19 | |
| 20 | | 20 | | 20 | | 20 | |
| Общее число сигналов *HER2* в целевой области 1 | | Общее число сигналов Chr17 в целевой области 1 | | Общее число сигналов *HER2* в целевой области 2 | | Общее число сигналов Chr17 в целевой области 2 | |
| d | | e | | g | | h | |
| Соотношение *HER2*/Chr17 для целевой области 1 | | | | Соотношение *HER2*/Chr17 для целевой области 1 и 2 | | | |
| f = d/e | | | | k = g/h | | | |
| ☐ **Отрицательное: *HER2*/Chr17 < 1,8** | | | | ☐ **Отрицательное: *HER2*/Chr17 < 1,8** | | | |
| ☐ **Положительное: *HER2*/Chr17 > 2,2** | | | | ☐ **Положительное: *HER2*/Chr17 > 2,2** | | | |
| ☐ **1,8 ≤ *HER2*/Chr17 ≤ 2,2** **Использовать метод № 2A** | | | | ☐ **Двойственный: 1,8 ≤ *HER2*/Chr17 ≤ 2,2** | | | |

# INFORM HPV II Family 6 Probe

REF 800-2220

05278546001

IVD Σ 50

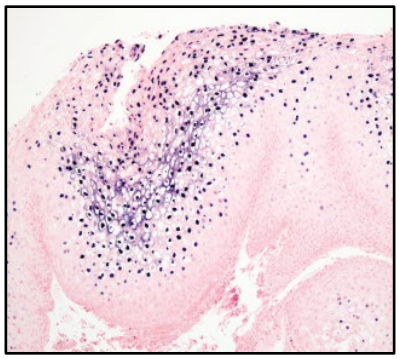


Figure 1. Condyloma tissue stained with the INFORM HPV II Family 6 Probe and the ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus Detection Kit. Magnification 10x.

## INTENDED USE

Ventana Medical Systems' (Ventana) INFORM HPV II Family 6 Probe is to be used in conjunction with ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus Detection Kit and other accessory reagents to stain neutral buffered formalin fixed, paraffin embedded tissue sections on the BenchMark IHC/ISH instruments.

Light microscopy is used to detect the staining reaction. Positive results aid in the classification of normal and abnormal specimens, and serve as an adjunct to conventional histopathology tests. The clinical interpretation of any staining, or the absence of staining, must be complemented by morphological studies and evaluation of proper controls. Evaluation must be made by a qualified pathologist within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests.

This product is intended for *in vitro* diagnostic (IVD) use.

## SUMMARY AND EXPLANATION

INFORM HPV II Family 6 Probe contains a cocktail of labeled human papillomavirus (HPV) genomic probes.[1] The intended targets are the common HPV genotypes not associated with cervical cancer. The probe cocktail has demonstrated positive hybridization to the low risk genotypes 6 and 11, but does not show positive hybridization to the most common high risk HPV genotypes.

Cervical cancer is the second most common cancer of women worldwide, with an estimated 529,000 new cases and 275,000 deaths globally per year.[2,3]

HPV is a double stranded DNA virus with more than 200 different genotypes containing approximately 7,900 base pairs.[4] The life cycle of HPV is tied directly to keratinocyte differentiation. One key event in the viral life cycle is the differentiation dependent escalation in viral replication. The increase in replication activity results in an amplification of the HPV genome from approximately 50 copies per cell, in basal keratinocytes during the sub clinical infection stage, to thousands of copies of viral genomes per cell in suprabasal keratinocytes during the clinical infection phase.[5] Infection of the cervical epithelium by HPV has been established as an initiating factor in the oncogenic process leading toward the development of cervical cancer.[6]

The risk of disease progression from dysplasia to cervical cancer is dependent on the HPV types. Therefore, HPV types have been grouped into different oncogenic risk groups. These groups are associated with the level of threat that a patient may develop cancer. For example, the high risk group, HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 and 82, has been recognized as tumor producing, whereas low risk group, HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, and 81, has little chance of progressing to malignant disease.[7,8] Identification of HPV risk group by slide based *in situ* hybridization (ISH) testing in combination with conventional morphologic slide evaluation may enhance clinical decisions.[9]

Slide based ISH is an easy to perform, reliable and reproducible method for detecting HPV on paraffin embedded tissue sections.[10] The detection level of both radioisotopic and nonisotopic labels using genomic probes appears to be between 10 to 50 viral copies per cell when using formalin fixed tissue samples.[11,12]

The ISH system offers several advantages over other methods that require destruction of the target cells, for example nucleic acid capture techniques or polymerase chain reaction (PCR). The advantages may include: direct correlation with the cytologic findings; the ability to test archival specimens; and the ability to identify the HPV ISH result in the context of tissue morphology.

## PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

INFORM HPV II Family 6 Probe is formulated for use with ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus Detection Kit and accessory reagents on the BenchMark XT IHC/ISH instrument.

The ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus Detection Kit detects specific DNP labeled probes and antibodies bound to a target sequence or antigen in paraffin-embedded tissue sections. The labeled probe or antibody is located by an anti-DNP antibody, then by an enzyme-labeled secondary antibody or a biotin-conjugated secondary antibody. This step is followed by the addition of a Streptavidin-AP (alkaline phosphatase) enzyme conjugate which binds to the biotin present on the secondary antibody. The complex is then visualized with 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and nitro blue tetrazolium (NBT) chromogen, which produces a blue precipitate that is readily detected by light microscopy. Figure 2 illustrates the Blue ISH reaction.

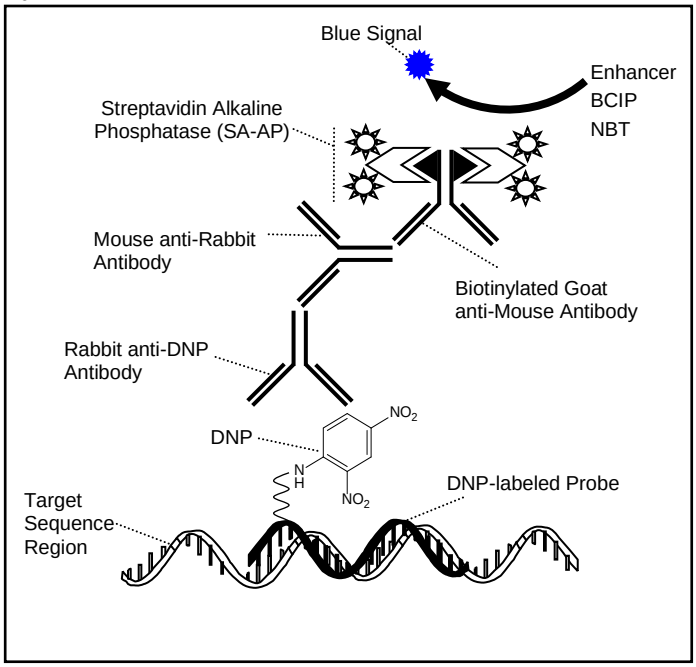



Figure 2. ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus Detection Reaction

## MATERIALS AND METHODS

### Reagent Provided

INFORM HPV II Family 6 Probe contains sufficient reagent for 50 tests.

One 10 mL dispenser of INFORM HPV II Family 6 Probe contains approximately 0.5 µg/mL of the probe cocktail labeled with DNP in a formamide based hybridization buffer.

Refer to the appropriate VENTANA detection kit package insert for detailed descriptions of: (1) Principles of the Procedure, (2) Materials and Reagents Needed but Not Provided, (3) Specimen Collection and Preparation for Analysis, (4) Quality Control Procedures, (5) Troubleshooting, (6) Interpretation of Results, and (7) General Limitations.

### Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration

No reconstitution, mixing, dilution, or titration is required. Further dilution may result in loss of staining specificity. The user must validate any such changes.

## MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Staining reagents, such as VENTANA detection kits and ancillary components, are not provided.

The following reagents and materials may be required but are not provided with the kit:

1. VENTANA HPV System Control Slides



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

2. VENTANA Alu Positive Control Probe II
3. VENTANA ISH Negative Control
4. VENTANA ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus Detection Kit
5. VENTANA ISH Protease 1, 2 or 3*
6. VENTANA Red Counterstain II
7. VENTANA Reaction Buffer (10X)
8. VENTANA SSC (10X)
9. VENTANA EZ Prep (10X)
10. VENTANA Cell Conditioning 2 (Pre-dilute)
11. VENTANA Liquid Coverslip (High Temperature)
12. BenchMark IHC/ISH instrument
13. Bar code labels (appropriate labels for control and probe being tested)
14. 10% neutral buffered formalin
15. Microtome
16. Microscope slides, appropriate for ISH
17. Positive and negative control slides
18. Xylene, histological grade
19. Ethanol or reagent alcohol, histological grade
20. Acetone
21. Deionized or distilled water
22. Mounting medium and cover glass or automated cover slipper
23. Staining jars or baths
24. Timer
25. Light microscope

* As needed for specific applications.

Not all products listed in the package insert may be available in all geographies. Consult your local support representative.

## STORAGE

Upon receipt and when not in use, store at 2–8 C. Do not freeze. The user must validate any storage conditions other than those specified in the package insert.

To ensure proper reagent delivery and stability of the probe after every run, replace the dispenser cap after every use and immediately place the dispenser in the refrigerator in an upright position.

Every dispenser is expiration dated. When properly stored, the reagent is stable to the date indicated on the label. Do not use reagent beyond the expiration date for the prescribed storage method.

There are no definitive signs to indicate instability of this product; therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with unknown specimens. Your local Roche office should be contacted immediately if there is an indication of reagent instability.

## SPECIMEN PREPARATION

Routinely processed, formalin-fixed, paraffin embedded tissues are suitable for this reagent. Tissue sections should be cut to the appropriate thickness for the proper staining.

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. For *in vitro* diagnostic (IVD) use.
2. For professional use only.
3. Clinical sensitivity of the assay must be validated in the user laboratory.
4. Warning, Product Contains Formamide. Formamide is toxic by inhalation and moderately toxic by ingestion. It is an irritant to skin, eyes, and mucous membranes and is absorbed through the skin. It may cause harm to the unborn child. Take precautions when handling reagents. Use disposable gloves and wear suitable protective clothing when handling suspected carcinogens or toxic materials.
5. Ensure that the waste container is empty prior to starting a run on the instrument. If this precaution is not taken, the waste container may overflow and the user risks a slip and fall.
6. Materials of human or animal origin should be handled as potentially biohazardous and disposed of with proper precautions.
7. Avoid contact of reagents with eyes, skin, and mucous membranes. If reagents come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. Avoid inhalation of reagents.
8. Avoid microbial contamination of reagents as this may produce incorrect results.
9. The reagents have been optimally diluted, and further dilution may result in loss of staining. The user must validate any such change.
10. Consult local and/or state authorities to determine the recommended method of disposal.
11. For supplementary safety information, refer to the product Safety Data Sheet and the Symbol and Hazard Guide located at www.ventana.com.

## INSTRUCTIONS FOR USE

### Post-run Processing

After the run is complete, please follow the following steps for proper dehydration of stained slides. (Proper dehydration will help ensure optimal signal visualization).

Dehydration Procedure

1. To remove coverslip solution, wash the slides in 2 sequential solutions of a mild dishwashing detergent (do not use detergent designed for automatic dishwashers).
2. Rinse slides well with distilled water, about 1 minute. Shake off excess water.
3. Transfer the slides to an 80% ethanol bath for approximately 1 minute.
4. Transfer the slides to a 90% ethanol bath for approximately 1 minute.
5. Transfer the slides to a 100% ethanol bath for approximately 1 minute.
6. Transfer the slides into a second bath of 100% ethanol for approximately 1 minute.
7. Dip slides 10 times into 100% acetone (one time use only; replace acetone after each staining run). Do not leave slides in acetone.
8. Transfer the slides into the first xylene bath for approximately 30 seconds.
9. Transfer the slides into a second xylene bath for approximately 30 seconds.
10. Place coverslip on slide.

Note: To ensure complete dehydration, ethanol baths need to be changed frequently and a third 100% ethanol bath may be added.

## QUALITY CONTROL PROCEDURES

### Positive Specimen Control

A positive specimen control (system level control) must be run with every staining run performed. The system level control is used to confirm that the probe was applied and the instrument functioned properly. This specimen should contain both positive and negative staining cells or tissue components. Control specimens should be biopsy or surgical specimens prepared or fixed in a manner identical to patient specimens. Such controls should monitor all steps of the procedure, from specimen preparation through staining. Use of a specimen fixed or processed differently from the patient specimen provides an appropriate control to confirm the reagents and instrument functioned properly. A specimen with weak positive staining, i.e. demonstrating a punctate staining pattern (which may require microscopic examination at magnifications as high as 20x or 40x) is more suitable than one with strong positive staining for optimal quality control and for detecting minor levels of reagent degradation. If the positive control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

### Negative Specimen Control

A negative specimen control must be run with every staining procedure performed. The purposes is to monitor unintended probe and antibody cross reactivity to cellular components. The same specimen used for the positive specimen control may also be used as the negative specimen control. The variety of different cell types present in most specimens offers internal negative control sites, but this should be verified by the user. The non-staining components should demonstrate absence of specific staining and provide an indication of background staining. If unacceptable staining occurs in the negative specimen control sites, result with the patient specimens should be considered invalid.

### Positive Reagent Control

A positive reagent control should be run during assay verification and troubleshooting since DNA accessibility may vary depending on fixation method and pretreatment of the specimen. Ventana Alu Positive Control Probe II can be used as a positive control for this assay.

### Negative Reagent Control

A negative reagent control must be substituted for the ISH probe with every specimen stained to aid in interpretation of each patient result. This provides an indication of nonspecific background staining for each slide. In place of the ISH probe, stain the slide



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

with Ventana ISH Negative Control. The incubation period for controls should correspond to that of the probe.

The negative control is especially important with the finding that the intestinal form of alkaline phosphatase may be found in cells other than the brush border of intestinal epithelial cells. Additionally, enzymes capable of reducing nitro blue tetrazolium may be preserved during fixation.

### Unexplained Discrepancies

Unexplained discrepancies in controls should be referred to your local support representative immediately. If quality control results do not meet specifications, patient results are invalid. See the Troubleshooting section of this insert. Identify and correct the problem, then repeat the patient samples.

### Assay Verification

Prior to initial use of a reagent in a diagnostic procedure, the performance of the reagent should be verified by testing it on a series of specimens with known ISH performance characteristics. These quality control assessments should be repeated for each new lot of reagents, or whenever there is a change in assay parameters.

.

## INTERPRETATION OF RESULTS

A qualified pathologist experienced in the microscopic interpretation of anatomic pathology specimens, ISH procedures and the recognition of *in situ* hybridization results (which require microscopic examination using 20x, 40x, and/or 60x objectives) must evaluate controls before interpreting results.[13] The presence of a blue reaction product in cervical epithelial nuclei in either a homogeneous or punctate staining pattern is indicative of positive reactivity. The homogeneous pattern appears as a large, uniform, globular dark blue precipitate within the epithelial cell nucleus. It is generally prominent in the superficial keratinized region of the epithelium often within koilocytotic cells. The punctate pattern is a discreet, stippled dark blue nuclear pattern. It is more often present in groups of cells in a more basal location within the epithelium. In some cases, the punctate pattern may require high magnification (40x objective) to visualize.

It is imperative that only epithelial cell nuclear staining be considered positive if a false positive interpretation is to be avoided. Non-cellular stromal precipitates and cytoplasmic staining of neutrophils and plasma cells represent artifactual nonspecific staining.

The morphology of each sample should also be examined utilizing an H&E stained section when interpreting any ISH result. The patient's morphologic findings and pertinent clinical data must be interpreted together with the ISH results.

Note: Use of 100x objective is not recommended. All of the design verification and validation testing was performed using 20x, 40x, and/or 60x objectives.

### Controls

The stained positive reagent and specimen controls should be examined first to ascertain that all reagents are functioning properly. The presence of a discrete, blue colored, precipitated reaction product within the target cell nuclei is indicative of positive reactivity.

The negative reagent and specimen controls should be examined after the positive control to verify the specificity of the reaction. There should be no specific staining in the negative control. If staining occurs, it may indicate nonspecific cross reactivity to cells or cellular components. Intact cells should be used for interpretation of staining results since necrotic or degenerated cells often stain nonspecifically.

If the positive or negative controls fail to demonstrate appropriate staining, any results with the test specimens should be considered invalid.

### Patient Specimen

Patient specimens should be examined last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any background staining of the negative reagent control. A negative result means that the DNA sequence in question was not detected, not necessarily that the sequence is absent in the cells assayed. The morphology of each sample should also be examined utilizing a hematoxylin and eosin stained section when interpreting any ISH result. The patient's morphologic findings and pertinent clinical data must be interpreted by a qualified pathologist.

## LIMITATIONS

1. ISH is a multiple step diagnostic process that requires specialized training in the selection of the appropriate reagents, specimen selection, processing, preparation of the ISH slide, and interpretation of the results.
2. Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning, or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, false positive or false negative results.
3. Inconsistent results may result from variations in fixation and embedding methods, or from inherent irregularities within the tissue.
4. Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.
5. The clinical interpretation of any positive staining, or its absence, must be evaluated within the context of clinical history and morphology, and must be complemented by proper controls and other diagnostic tests. It is the responsibility of a qualified pathologist to be familiar with the probes, reagents and methods used to produce the stained preparation. Staining must be performed under the supervision of a pathologist who is responsible for reviewing the stained slides and assuring the adequacy of positive and negative controls.
6. Reagents may demonstrate unexpected reactions in previously untested specimens. The possibility of unexpected reactions even in tested specimen groups cannot be completely eliminated due to biological variability of targeted sequence in biological specimens. Contact your local Ventana office with documented unexpected reactions.
7. Due to variation in specimen processing it may be necessary to increase or decrease the ISH protease treatment time on individual specimens. Such changes must be validated by the user.

## SUMMARY OF EXPECTED RESULTS

1. Ventana INFORM HPV II Family 6 Probe, ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus Detection Kit, and accessory reagents in conjunction with a BenchMark IHC/ISH instrument will result in blue precipitate at the target sequence sites as located by the ISH probes.
2. Specificity and sensitivity of target sequence detection has been optimized and tested by Ventana. The probe cocktail has demonstrated positive hybridization to the HPV genotypes 6 and 11 in cervical biopsy specimens. However, each ISH probe must be validated by user to ensure desired staining.
3. Intra run reproducibility of staining with INFORM HPV II Family 6 Probes was determined by staining 10 cervical tissue slides on a BenchMark XT IHC/ISH instrument. All slides stained with comparable intensity. Users should verify intra run (within run) reproducibility results by staining several sets of serial sections with low, medium, and high target sequences in a single run.
4. Inter run reproducibility of staining with INFORM HPV II Family 6 Probes was determined by staining triplicate slides of positive cervical tissues on 2 BenchMark and 2 BenchMark XT instruments for 3 runs on each instrument. Ninety-seven percent of slides stained with comparable intensity. Users should verify inter run (between run) reproducibility results by staining several sets of serial sections with low, medium, and high target sequences on different runs.

## TROUBLESHOOTING

1. If the positive control is negative, it should be checked to ensure that the slide has the proper bar code label.
2. If the positive control is negative or exhibits weaker staining than expected, any additional positive controls (e.g. positive tissue controls on the patient specimen slide) stained on the same staining run should be checked to determine if the failure is due to the control slide or reagents used. Specimens that have been improperly collected, fixed, stored, or deparaffinized may not exhibit appropriate staining.
3. If the specimen is washed off the slide, slides should be checked to ensure that they are positively charged.
4. If the slides demonstrate whiskering artifact from the detection chemistry, dehydration is not complete. Refer to the Dehydration Procedure section.
5. If nonspecific staining of the glass or nonspecific staining of areas of tissue (particularly areas other than the squamous epithelium) are observed, an additional section of the patient specimen should be stained.
6. For corrective actions, refer to the Step By Step Procedure section, the BenchMark IHC/ISH Instrument Operator's Manual or contact your local Roche office.

## REFERENCES


1. HPV Sequence Database (http://www.stdgen.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/).
2. WHO/ICO HPV Information Center. Human Papilloma Virus and Related Cancers. Summary Report Update. November 15, 2010. p8.





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

http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/country_pdf/XWX.pdf?CFID=5730279&CFTOKEN=65827281.
3. HPV Information Centre. http://www.hpvcentre.net/aboutus.php
4. Clinical Microbiology and Infection © 2015 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved, CMI, 21, 808-816.
5. Birner P, Schindl M, Stani J, Oberhuber G, Czerwenka K, Vutuc C, Breitenecker G. Hybrid capture based human papillomavirus typing in cervical screening compared to cytology and histology. Wien Klin Wochenschr. 2000;112(17):761-766.
6. Nindl I, Greinke C, Zahm DM, Stockfleth E, Hoyer H, Schneider A. Human papillomavirus distribution in cervical tissues of different morphology as determined by hybrid capture assay and PCR. Int J Gynecol Pathol. 1997;16(3):197-204.
7. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. Virology. 2009;384(2):260-265.
8. Munoz N, et al., Epidemiologic classification of human papillomavirus type associated with cervical cancer. N Engl J Med. 2003;348(6):518-527.
9. Delvenne P, Fontaine MA, Delvenne C, Nikkels A, Boniver J. Detection of human papillomaviruses in paraffin-embedded biopsies of cervical intraepithelial lesions: analysis by immunohistochemistry, in situ hybridization, and the polymerase chain reaction. Mod Pathol. 1994;7(1):113-119.
10. Zehbe I, Hacker GW, Su H, Hauser-Kronberger C, Hainfeld JF, Tubbs R. Sensitive in situ hybridization with catalyzed reporter deposition, streptavidin-Nanogold and silver acetate autometallography: detection of single-copy human papillomavirus. Am J Pathol. 1997;150(5):1553-1561.
11. Zehbe I, Rylander E, Strand, A, Wilander E. Use of Probemix and OmniProbe biotinylated cDNA probes for detecting HPV infection in biopsy specimens from the genital tract. J Clin Pathol. 1993;46(5):437-440.
12. Unger, ER. In situ diagnosis of human papillomaviruses. Clin Lab Med. 2000;20(2):289-301.
13. Evans MF, Aliesky HA, Cooper K. Optimization of biotinyl-tyramide-based in situ hybridization for sensitive background-free applications on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. BMC Clin Pathol. 2003;3(1):2.

## INTELLECTUAL PROPERTY

VENTANA, BENCHMARK and INFORM are registered trademarks of Roche.

All other trademarks are the property of their respective owners.

© 2017 Ventana Medical Systems, Inc.

## CONTACT INFORMATION

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.

www.ventana.com



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

# INFORM HPV II Family 6 Probe

REF 800-2220

05278546001

IVD Σ 50

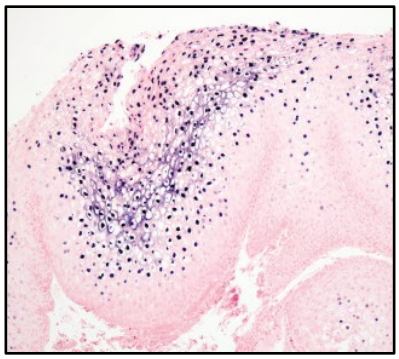


**Рис.** 1. Ткань кондиломы окрашивали с помощью зонда INFORM HPV II Family 6 и набора для обнаружения ISH iVIEW Blue Plus. Увеличение 10x.

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Ventana Medical Systems ' (Ventana) INFORM HPV II Family 6 Probe следует использовать вместе с ISH iVIEW Blue Plus Detection Kit и другие дополнительные реагенты для окрашивания срезов тканей, фиксированных в нейтральном буферном растворе формалина и залитых парафином, на приборах BenchMark IHC / ISH. Световая микроскопия используется для обнаружения реакции окрашивания. Положительные результаты помогают в классификации нормальных и аномальных образцов и служат дополнением к обычным игистопатологическим тестам. Клиническая интерпретация любого окрашивания или его отсутствия должна дополняться морфологическими исследованиями и оценкой надлежащих контролей. Оценка должна производиться квалифицированным патологом в контексте истории болезни пациента и других диагностических тестов.

Этот продукт предназначен для диагностики in vitro (IVD).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

INFORM HPV II Family 6 Probe содержит коктейль из меченого вируса папилломы человека. (HPV) геномные зонды1. Предполагаемыми мишенями являются общие генотипы HPV, не связанные с раком шейки матки. Комбинация зондов продемонстрировала положительную гибридизацию с генотипами 6 и 11 низкого риска, но не показала положительную гибридизацию с наиболее распространенными генотипами HPV высокого риска.

Рак шейки матки является вторым по распространенности раком у женщин во всем мире: ежегодно во всем мире регистрируется 529 000 новых случаев и 275 000 смертей.[2,3]

ВПЧ - это двухцепочечный ДНК-вирус с более чем 200 различными генотипами, содержащими примерно 7900 пар оснований. 4 Жизненный цикл ВПЧ напрямую связан с дифференцировкой кератиноцитов. Одним из ключевых событий в жизненном цикле вируса является зависимая от дифференциации эскалация репликации вируса. Повышение репликационной активности приводит к амплификации генома ВПЧ примерно с 50 копий на клетку в базальных кератиноцитах на стадии субклинической инфекции до тысяч копий вирусных геномов на клетку в супрабазальных кератиноцитах во время фазы клинической инфекции5. эпителия шейки матки вирусом папилломы человека считается инициирующим фактором онкогенного процесса, ведущего к развитию рака шейки матки. Риск прогрессирования заболевания от дисплазии до рака шейки матки зависит от типов ВПЧ. Таким образом, типы ВПЧ были сгруппированы в различные группы онкогенного риска. Эти группы связаны с уровнем угрозы того, что у пациента может развиться рак. Например, группа высокого риска, HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 и 82, была признана производящей опухоль, тогда как группа низкого риска группа риска, HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 и 81, имеет мало шансов на прогрессирование до злокачественного заболевания. 7,8 Идентификация группы риска HPV с помощью слайд-гибридизации in situ (ISH) тестирование в сочетании с традиционной морфологической оценкой слайдов может улучшить клинические решения. ISH на основе слайдов - это простой в исполнении, надежный и воспроизводимый метод обнаружения ВПЧ на срезах ткани, залитых парафином.10 Уровень обнаружения как радиоизотопных, так и неизотопных меток с использованием геномных зондов составляет от 10 до 50 вирусных копий на клетку при использовании фиксированного формалина. образцы тканей.[11,12]

Система ISH предлагает несколько преимуществ по сравнению с другими методами, которые требуют разрушения клеток-мишеней, например методами захвата нуклеиновых кислот или полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Преимущества могут включать: прямую корреляцию с цитологическими данными; возможность тестирования архивных образцов; и способность идентифицировать результат ISH HPV в контексте морфологии ткани.

## ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

INFORM HPV II Family 6 Probe разработан для использования с детектором ISH iVIEW Blue Plus. Набор и дополнительные реактивы на приборе BenchMark XT IHC / ISH. Набор для обнаружения ISH iVIEW Blue Plus обнаруживает специфические меченные DNP зонды и антитела, связанные с целевой последовательностью или антигеном в залитых в парафин срезах ткани. Меченый зонд или антитело локализуется с помощью антитела против ДНП, затем с помощью меченного ферментом вторичного антитела или вторичного антитела, конъюгированного с биотином. За этим этапом следует добавление ферментного конъюгата стрептавидин-АР (щелочная фосфатаза), который связывается с биотином, присутствующим на вторичном антителе. Затем комплекс визуализируется с помощью хромогена 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата (BCIP) и нитросинего тетразолия (NBT), что дает синий осадок, который легко обнаруживается с помощью световой микроскопии. Рисунок 2 иллюстрирует реакцию Blue ISH.

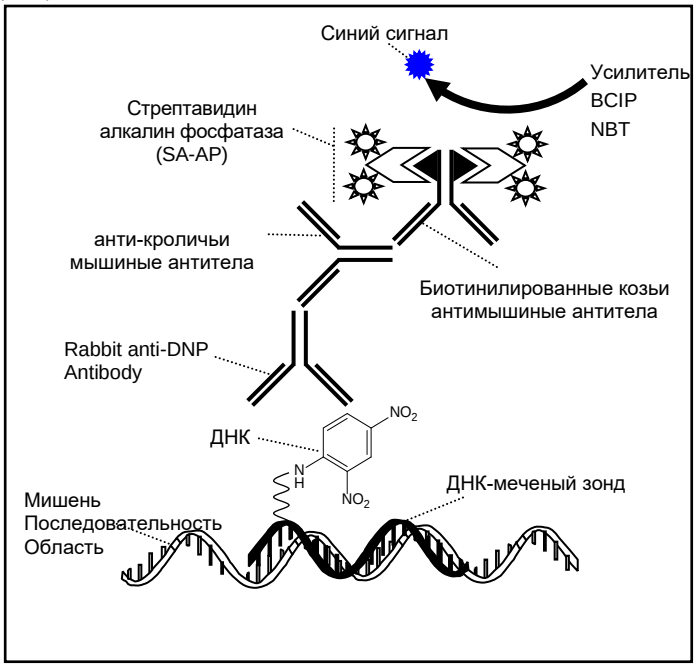



**Рис.** 2. Реакция обнаружения ISH iVIEW Blue Plus.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Реагенты, входящие в комплект

INFORM HPV II Family 6 Probe содержит достаточно реагента для 50 тестов. Один дозатор INFORM HPV II Family 6 Probe на 10 мл содержит примерно 0,5 мкг / мл смеси зондов, меченных DNP, в буфере для гибридизации на основе формамида. Обратитесь к вкладышу соответствующего набора для обнаружения VENTANA для получения подробных описаний: (1) принципов процедуры, (2) материалов и реагентов, необходимых, но не предоставленных, (3) сбора образцов и подготовки к анализу, (4) процедур контроля качества, (5) Устранение неполадок, (6) Интерпретация результатов и (7) Общие ограничения.

### Восстановление, смешивание, разбавление, титрование

Восстановление, смешивание, разбавление или титрование не требуется. Дальнейшее разбавление может привести к потере специфичности окрашивания. Пользователь должен подтвердить любые такие изменения.

## НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ МАТЕРИАЛЫ

Окрашивающие реагенты, такие как наборы для обнаружения VENTANA и вспомогательные компоненты, не предоставляются.

Могут потребоваться следующие реагенты и материалы, но они не входят в комплект:

1. VENTANA HPV System Control Slides



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

2. VENTANA Alu Positive Control Probe II
3. VENTANA ISH Negative Control
4. VENTANA ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus Detection Kit
5. VENTANA ISH Protease 1, 2 or 3*
6. VENTANA Red Counterstain II
7. VENTANA Reaction Buffer (10X)
8. VENTANA SSC (10X)
9. VENTANA EZ Prep (10X)
10. VENTANA Cell Conditioning 2 (Pre-dilute)
11. VENTANA Liquid Coverslip (High Temperature)
12. BenchMark IHC/ISH instrument
13. Этикетки со штрих-кодом (соответствующие этикетки для проверяемого контроля и датчика)
14. 10% нейтральный забуференный формалин
15. Микротом
16. Предметные стекла, подходящие для ISH
17. Слайды положительного и отрицательного контроля
18. Ксилол, гистологический класс
19. Этанол или реактивный спирт гистологического класса
20. Ацетон
21. Деионизированная или дисцилированная вода
22. Монтажная среда и покровноое стекло или автоматическое покровное стекло.
23. Окрашивающие банки или ванны.
24. Таймер
25. Световой микроскоп

* По мере необходимости для конкретных приложений.

Не все продукты, перечисленные в листке-вкладыше, могут быть доступны во всех регионах. Проконсультируйтесь с вашим местным представителем службы поддержки.

## ХРАНЕНИЕ

После получения и когда он не используется, хранить при 2–8 ° C. Не замораживать. Пользователь должен проверить любые условия хранения, кроме тех, которые указаны во вкладыше к упаковке. Чтобы обеспечить правильную подачу реагента и стабильность зонда после каждого цикла, закрывайте крышку дозатора после каждого использования и сразу же помещайте дозатор в холодильник в вертикальном положении. Срок годности каждого диспенсера истек. При правильном хранении реагент стабилен до даты, указанной на этикетке. Не используйте реагент после истечения срока годности для предписанного метода хранения. Нет однозначных признаков, указывающих на нестабильность этого продукта; поэтому положительный и отрицательный контроли следует проводить одновременно с неизвестными образцами. Если есть признаки нестабильности реагента, следует немедленно связаться с вашим местным офисом компании «ROCHE».

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Для этого реагента подходят регулярно обрабатываемые, фиксированные формалином, залитые в парафин ткани. Срезы ткани следует обрезать до необходимой толщины для надлежащего окрашивания.

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики in vitro (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. Клиническая чувствительность теста должна быть подтверждена в лаборатории пользователя.
4. Предупреждение, продукт содержит формамид. Формамид токсичен при вдыхании и умеренно токсичен при приеме внутрь. Он раздражает кожу, глаза и слизистые оболочки и впитывается через кожу. Это может нанести вред будущему ребенку. Соблюдайте меры предосторожности при обращении с реагентами. Используйте одноразовые перчатки и подходящую защитную одежду при работе с предполагаемыми канцерогенами или токсичными материалами.
5. Перед запуском цикла на приборе убедитесь, что контейнер для отходов пуст. Если не принять эту меру предосторожности, контейнер для отходов может переполниться, и пользователь может поскользнуться и упасть.
6. С материалами человеческого или животного происхождения следует обращаться как с потенциально биологически опасными и утилизировать с соблюдением надлежащих мер предосторожности.
7. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. Если реагенты попали на чувствительные участки, промойте их большим количеством воды. Избегайте вдыхания реагентов.
8. Избегайте микробного загрязнения реагентов, так как это может привести к неверным результатам.
9. Реагенты были оптимально разведены, дальнейшее разбавление может привести к потере окрашивания. Пользователь должен подтвердить любое такое изменение.
10. Проконсультируйтесь с местными и / или государственными властями, чтобы определить рекомендуемый метод утилизации.
11. Дополнительную информацию о безопасности см. В Паспорте безопасности продукта и Руководстве по символам и опасностям на сайте www.ventana.com

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

### Пост-прогонная обработка

После завершения цикла выполните следующие действия для надлежащего обезвоживания окрашенных слайдов. (Правильное обезвоживание поможет обеспечить оптимальную визуализацию сигнала).

**Процедура обезвоживания**

1. 1. Чтобы удалить раствор покровного стекла, промойте предметные стекла в двух последовательных растворах мягкого средства для мытья посуды (не используйте средство, предназначенное для автоматических посудомоечных машин).
2. Хорошо промойте предметные стекла дистиллированной водой примерно в течение 1 минуты. Стряхните лишнюю воду.
3. Перенесите слайды в баню с 80% этанолом примерно на 1 минуту.
4. Перенесите слайды в баню с 90% этанолом примерно на 1 минуту.
5. 5. Перенесите слайды в баню со 100% этанолом примерно на 1 минуту.
6. 6. Перенесите слайды во вторую ванну со 100% этанолом примерно на 1 минуту.
7. 7. Окуните предметные стекла 10 раз в 100% ацетон (используйте только один раз; заменяйте ацетон после каждого цикла окрашивания). Не оставляйте слайды в ацетоне.
8. 8. Перенесите слайды в первую ванну с ксилолом примерно на 30 секунд.
9. 9. Перенесите слайды во вторую ванну с ксилолом примерно на 30 секунд.
10. 10. Поместите покровное стекло на предметное стекло.

Примечание: Чтобы обеспечить полное обезвоживание, ванны с этанолом необходимо часто менять, и можно добавить третью ванну с 100% этанолом.

## ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

### Положительный контроль образцов

Положительный контроль образцов (контроль системного уровня) должен выполняться при каждом запуске окрашивания. Контроль системного уровня используется для подтверждения того, что датчик был применен и прибор работал правильно. Этот образец должен содержать как положительные, так и отрицательные окрашивающие клетки или компоненты ткани. Контрольные образцы должны представлять собой биопсийные или хирургические образцы, приготовленные или закрепленные так же, как образцы пациентов. Такой контроль должен контролировать все этапы процедуры, от подготовки образца до окрашивания. Использование образца, фиксированного или обработанного иначе, чем образец пациента, обеспечивает соответствующий контроль для подтверждения правильности работы реагентов и инструмента. Образец со слабым положительным окрашиванием, т. Е. Демонстрирующий точечный рисунок окрашивания (который может потребовать микроскопического исследования при увеличении до 20x или 40x) более подходит, чем метод с сильным положительным окрашиванием для оптимального контроля качества и для обнаружения незначительных уровней разложения реагентов. Если положительный контроль не показывает положительного окрашивания, результаты с тестируемыми образцами следует считать недействительными.

### Отрицательный контроль образцов

Отрицательный контроль образца должен выполняться при каждой выполненной процедуре окрашивания. Цель состоит в том, чтобы контролировать непреднамеренную перекрестную реактивность зонда и антител с клеточными компонентами. Тот же образец, что использовался для положительного контроля образца, также может быть использован в качестве отрицательного контроля образца. Разнообразие различных типов клеток, присутствующих в большинстве образцов, предлагает сайты внутреннего отрицательного контроля, но это должно быть проверено пользователем. Неокрашивающие компоненты должны демонстрировать отсутствие специфического окрашивания и указывать на фоновое окрашивание. Если на участках с отрицательными контрольными образцами возникает неприемлемое окрашивание, результаты с образцами пациентов следует считать недействительными.

### Положительный контроль реагентов

Положительный контроль реагентов должен выполняться во время проверки анализа и устранения неполадок, поскольку доступность ДНК может варьироваться в зависимости от метода фиксации и предварительной обработки образца. Датчик положительного контроля Ventana Alu II можно использовать в качестве положительного контроля для этого анализа.

### Отрицательный контроль реагентов

Отрицательный контроль реагента должен быть заменен на зонд ISH с каждым окрашенным образцом, чтобы помочь в интерпретации результатов каждого пациента. Это указывает на неспецифическое фоновое окрашивание для каждого слайда. Вместо зонда ISH окрашивайте предметное стекло


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

отрицательным контролем Ventana ISH. Инкубационный период контрольных образцов должен соответствовать периоду инкубации зонда. Отрицательный контроль особенно важен при обнаружении того факта, что кишечная форма щелочной фосфатазы может быть обнаружена в клетках, отличных от щеточной каймы кишечных эпителиальных клеток. Кроме того, ферменты, способные восстанавливать нитросиний тетразолий, могут сохраняться во время фиксации.

### Необъяснимые расхождения

Необъяснимые расхождения в элементах управления следует немедленно сообщать местному представителю службы поддержки. Если результаты контроля качества не соответствуют спецификациям, результаты пациентов недействительны. См. Раздел «Устранение неполадок» этой вставки. Определите и устраните проблему, затем повторите отбор проб пациента.

### Верификация анализа

Перед первоначальным использованием реагента в диагностической процедуре его эффективность следует проверить путем тестирования на серии образцов с известными рабочими характеристиками ISH. Эти оценки контроля качества следует повторять для каждой новой партии реагентов или при изменении параметров анализа.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Квалифицированный патологоанатом, имеющий опыт микроскопической интерпретации образцов анатомической патологии, процедур ISH и распознавания результатов гибридизации in situ (которые требуют микроскопического исследования с использованием объективов 20x, 40x и / или 60x), должен оценить средства контроля перед интерпретацией результатов.13 голубой продукт реакции в ядрах эпителия шейки матки в виде гомогенного или точечного окрашивания указывает на положительную реактивность. Гомогенный рисунок выглядит как большой однородный глобулярный осадок темно-синего цвета в ядре эпителиальной клетки. Это обычно заметно в поверхностной ороговевшей области эпителия, часто внутри койлоцитотических клеток. Точечный узор представляет собой неброский точечный темно-синий ядерный узор. Чаще он присутствует в группах клеток в более базальном месте эпителия. В некоторых случаях для визуализации точечного рисунка может потребоваться большое увеличение (40-кратный объектив). Крайне важно, чтобы только ядерное окрашивание эпителиальных клеток считалось положительным, если необходимо избежать ложноположительной интерпретации. Неклеточные стромальные преципитаты и цитоплазматическое окрашивание нейтрофилов и плазматических клеток представляют собой артефактное неспецифическое окрашивание. При интерпретации любого результата ISH также необходимо исследовать морфологию каждого образца с использованием окрашенного H&E среза. Морфологические данные пациента и соответствующие клинические данные должны интерпретироваться вместе с результатами ISH. Примечание: не рекомендуется использовать объектив 100x. Все испытания для проверки и валидации проекта проводились с использованием объективов 20x, 40x и / или 60x.

### Контроли

Окрашенные положительные реагенты и контроли образцов должны быть исследованы в первую очередь, чтобы убедиться, что все реагенты функционируют должным образом. Присутствие дискретного осажденного продукта реакции синего цвета в ядрах клеток-мишеней указывает на положительную реактивность. Отрицательные контроли реагентов и образцов следует исследовать после положительного контроля, чтобы проверить специфичность реакции. В отрицательном контроле не должно быть специфического окрашивания. Если происходит окрашивание, это может указывать на неспецифическую перекрестную реактивность с клетками или клеточными компонентами. Интактные клетки следует использовать для интерпретации результатов окрашивания, поскольку некротические или дегенерированные клетки часто окрашиваются неспецифически. Если положительные или отрицательные контроли не демонстрируют надлежащего окрашивания, любые результаты с исследуемыми образцами следует считать недействительными.

### Образцы пациентов

В последнюю очередь следует исследовать образцы пациентов. Интенсивность положительного окрашивания следует оценивать в контексте любого фонового окрашивания отрицательного контроля реагента. Отрицательный результат означает, что рассматриваемая последовательность ДНК не была обнаружена, не обязательно, что последовательность отсутствует в анализируемых клетках. Морфология каждого образца также должна быть исследована с использованием окрашенного гематоксилином и эозином среза при интерпретации любого результата ISH. Морфологические данные пациента и соответствующие клинические данные должны интерпретироваться квалифицированным патологом.

## ОСОБЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

1. ISH - это многоэтапный диагностический процесс, который требует специальной подготовки по выбору подходящих реагентов, отбору образцов, обработке, подготовке слайда ISH и интерпретации результатов.
2. Окрашивание тканей зависит от обращения и обработки ткани перед окрашиванием. Неправильная фиксация, замораживание, оттаивание, стирка, сушка, нагревание, разрезание, или загрязнение другими тканями или жидкостями может привести к артефактам, ложноположительным или ложноотрицательным результатам.
3. Несогласованные результаты могут быть результатом различий в методах фиксации и заделки или внутренних неровностей ткани.
4. Чрезмерное или неполное контрастное окрашивание может нарушить правильную интерпретацию результатов.
5. Клиническая интерпретация любого положительного окрашивания или его отсутствия должна оцениваться в контексте истории болезни и морфологии и должна дополняться надлежащими контролями и другими диагностическими тестами. Квалифицированный патолог должен быть знаком с датчиками, реагентами и методами, используемыми для получения окрашенного препарата. Окрашивание должно выполняться под наблюдением патологоанатома, который отвечает за анализ окрашенных слайдов и обеспечение соответствия положительных и отрицательных контролей.
6. Реагенты могут демонстрировать неожиданные реакции в ранее непроверенных образцах. Возможность неожиданных реакций даже в тестируемых группах образцов не может быть полностью исключена из-за биологической изменчивости целевой последовательности в биологических образцах. Свяжитесь с местным офисом Ventana, чтобы получить документально подтвержденные неожиданные реакции.
7. Из-за различий в обработке образцов может потребоваться увеличить или уменьшить время обработки протеазой ISH на отдельных образцах. Такие изменения должны быть подтверждены пользователем.

## РЕЗЮМЕ ОЖИДАЕМЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Датчик Ventana INFORM HPV II Family 6, набор для обнаружения ISH iVIEW Blue Plus и дополнительные реагенты в сочетании с прибором BenchMark IHC / ISH приведут к образованию синего осадка на участках последовательности-мишени, обнаруженных датчиками ISH.
2. Специфичность и чувствительность обнаружения целевой последовательности были оптимизированы и протестированы компанией Ventana. Смесь зондов продемонстрировала положительную гибридизацию с генотипами 6 и 11 ВПЧ в биоптатах шейки матки. Однако каждый зонд ISH должен быть проверен пользователем, чтобы гарантировать желаемое окрашивание.
3. Воспроизводимость окрашивания зондами INFORM HPV II Family 6 в ходе анализа определяли путем окрашивания 10 слайдов ткани шейки матки на приборе BenchMark XT IHC / ISH. Все слайды окрашены с сопоставимой интенсивностью. Пользователи должны проверять результаты воспроизводимости результатов внутри цикла (в рамках цикла), окрашивая несколько наборов серийных срезов низкими, средними и высокими целевыми последовательностями за один цикл.
4. Воспроизводимость между анализами окрашивания зондами INFORM HPV II Family 6 Probes определяли путем окрашивания в трех экземплярах слайдов положительных тканей шейки матки на 2 приборах BenchMark и 2 приборах BenchMark XT по 3 цикла на каждом приборе. Девяносто семь процентов слайдов окрашены с сопоставимой интенсивностью. Пользователи должны проверять результаты воспроизводимости между прогонами (между прогонами), окрашивая несколько наборов серийных срезов с низкими, средними и высокими целевыми последовательностями в разных прогонах.

## ИСПРАВЛЕНИЕ ПРОБЛЕМ

1. Если положительный контроль отрицательный, его следует проверить, чтобы убедиться, что на слайде есть этикетка со штрих-кодом.
2. Если положительный контроль является отрицательным или проявляет более слабое окрашивание, чем ожидалось, любые дополнительные положительные контроли (например, положительные тканевые контроли на предметном стекле пациента), окрашенные в том же цикле окрашивания, должны быть проверены, чтобы определить, вызван ли отказ контрольным предметным стеклом или использованные реагенты. Образцы, которые были неправильно собраны, зафиксированы, хранились или депарафинизированы, могут не иметь надлежащего окрашивания.
3. Если образец смывается с предметного стекла, необходимо проверить предметные стекла, чтобы убедиться, что они заряжены положительно.
4. Если на слайдах видны артефакты усыхания из-за химического состава обнаружения, обезвоживание не завершено. См. Раздел «Процедура обезвоживания».
5. При неспецифическом окрашивании стекла или неспецифическом окрашивании участков ткани (особенно области, отличные от плоского эпителия), следует окрасить дополнительный участок образца пациента.
6. Чтобы узнать о корректирующих действиях, обратитесь к разделу «Пошаговая процедура» Руководства по эксплуатации прибора BenchMark IHC / ISH или обратитесь в местный офис компании Roche.

## REFERENCES


1. HPV Sequence Database (http://www.stdgen.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/).
2. WHO/ICO HPV Information Center. Human Papilloma Virus and Related Cancers. Summary Report Update. November 15, 2010. p8.





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

http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/country_pdf/XWX.pdf?CFID=5730279&CFTOKEN=65827281.
3. HPV Information Centre. http://www.hpvcentre.net/aboutus.php
4. Clinical Microbiology and Infection © 2015 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved, CMI, 21, 808-816.
5. Birner P, Schindl M, Stani J, Oberhuber G, Czerwenka K, Vutuc C, Breitenecker G. Hybrid capture based human papillomavirus typing in cervical screening compared to cytology and histology. Wien Klin Wochenschr. 2000;112(17):761-766.
6. Nindl I, Greinke C, Zahm DM, Stockfleth E, Hoyer H, Schneider A. Human papillomavirus distribution in cervical tissues of different morphology as determined by hybrid capture assay and PCR. Int J Gynecol Pathol. 1997;16(3):197-204.
7. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. Virology. 2009;384(2):260-265.
8. Munoz N, et al., Epidemiologic classification of human papillomavirus type associated with cervical cancer. N Engl J Med. 2003;348(6):518-527.
9. Delvenne P, Fontaine MA, Delvenne C, Nikkels A, Boniver J. Detection of human papillomaviruses in paraffin-embedded biopsies of cervical intraepithelial lesions: analysis by immunohistochemistry, in situ hybridization, and the polymerase chain reaction. Mod Pathol. 1994;7(1):113-119.
10. Zehbe I, Hacker GW, Su H, Hauser-Kronberger C, Hainfeld JF, Tubbs R. Sensitive in situ hybridization with catalyzed reporter deposition, streptavidin-Nanogold and silver acetate autometallography: detection of single-copy human papillomavirus. Am J Pathol. 1997;150(5):1553-1561.
11. Zehbe I, Rylander E, Strand, A, Wilander E. Use of Probemix and OmniProbe biotinylated cDNA probes for detecting HPV infection in biopsy specimens from the genital tract. J Clin Pathol. 1993;46(5):437-440.
12. Unger, ER. In situ diagnosis of human papillomaviruses. Clin Lab Med. 2000;20(2):289-301.
13. Evans MF, Aliesky HA, Cooper K. Optimization of biotinyl-tyramide-based in situ hybridization for sensitive background-free applications on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. BMC Clin Pathol. 2003;3(1):2.

## INTELLECTUAL PROPERTY

VENTANA, BENCHMARK and INFORM are registered trademarks of Roche.

All other trademarks are the property of their respective owners.

© 2017 Ventana Medical Systems, Inc.

## CONTACT INFORMATION

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.

www.ventana.com



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

# INFORM EBER (Epstein-Barr Virus Early RNA) Probe

REF 800-2842

05278660001

IVD Σ 50

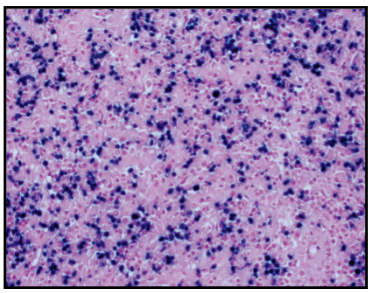


**Рис. 1.** Препарат Т-клеточной лимфомы, окрашенный с применением INFORM EBER Probe. Окрашивание в темно-синий цвет обозначает пораженные клетки.

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Ventana Medical Systems, Inc.'s (Ventana) INFORM EBER (Epstein-Barr Virus Early RNA) Probe (INFORM EBER Probe) предназначен для выявления клеток, которые экспрессируют РНК, кодированную вирусом Эпштейна-Барр (Epstein-Barr encoded RNA, EBER), в срезах тканей, зафиксированных формалином и залитых в парафин, при использовании методов гибридизации *in situ* и оптической микроскопии. В частности, посредством INFORM EBER Probe в результате гибридизации обнаруживаются транскрипты EBER РНК. Положительные результаты помогают выявить клетки, пораженные вирусом Эпштейна-Барр.

Результаты должны интерпретироваться квалифицированным патологоанатомом с учетом данных гистологического исследования, соответствующих клинических данных и сравнения с контрольными образцами.

Данный продукт предназначен для диагностики *in vitro* (IVD).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), поражающий В-лимфоциты, в основном передается со слюной. ВЭБ относится к семейству вирусов Herpes. Острая ВЭБ-инфекция вызывает активацию и пролиферацию В-лимфоцитов, что приводит к выраженному ответу клеточного иммунитета с активацией CD8-положительных Т-лимфоцитов. После разрешения активной инфекции ВЭБ переходит в латентное состояние, при котором вирус находится в В-лимфоцитах памяти, и в такой латентной форме ВЭБ-инфекция персистирует на протяжении всей жизни человека.[1]

Установлено, что к двадцати годам >90 % населения инфицировано вирусом ВЭБ. Как потенциально онкогенный вирус ВЭБ связывают с возникновением лимфомы Беркитта, назофарингеальной карциномы, В-клеточной лимфомы, посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания, а также, в последнее время, болезни Ходжкина, периферических Т-клеточных опухолей и рака желудка. Кроме того, ВЭБ можно обнаружить у пациентов со СПИДом.[2,3]

Каждый тест INFORM EBER Probe содержит смесь олигонуклеотидных зондов, меченых флуоресцеином, в растворителе на основе формамида. Эти зонды предназначены для использования в анализах, выполняемых на аппаратах BenchMark XT или BenchMark ULTRA. INFORM EBER Probe позволяет обнаружить первичные РНК-транскрипты ВЭБ-инфекции. Транскрипты РНК накапливаются в ядрах клеток, пораженных ВЭБ.

## ПРИНЦИП ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

INFORM EBER Probe разработан для совместного применения с набором для обнаружения ISH *i*VIEW$_{Blue}$ Detection Kit и вспомогательными реагентами на аппаратах BenchMark XT и BenchMark ULTRA.

Набор для обнаружения содержит первичные антитела и конъюгат биотина с вторичными антителами, связанные с щелочной фосфатазой (ЩФ), которая используется в качестве хромогенного фермента. В ходе процедуры ISH с синим окрашиванием происходит гибридизация меченого флуоресцеином зонда со специфическими целевыми РНК-последовательностями в клетках и тканях. За этой стадией следует добавление конъюгата стрептавидин-ЩФ (щелочная фосфатаза) - фермента, который связывается с биотином, присутствующим во вторичном антителе. После этого меченый флуоресцеином зонд визуализируется при помощи 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфата и хромогена нитросинего тетразолия. Выпадающий осадок синего цвета легко визуализируется при световой микроскопии. Реакция ISH с синим окрашиванием представлена на рисунке 2.

Протокол окрашивания состоит из нескольких этапов, на которых реактивы инкубируются в течение предварительно установленного времени и при предварительно заданной температуре. После завершения каждого этапа инкубации аппарат BenchMark XT или BenchMark ULTRA промывает срезы, чтобы удалить несвязанный материал, и применяет жидкое покрытие, минимизирующее испарение водных растворов реагентов с предметного стекла. Результаты интерпретируются при помощи световой микроскопии и используются для дифференциальной диагностики патофизиологических процессов, связанных или не связанных с положительным окрашиванием зонда.

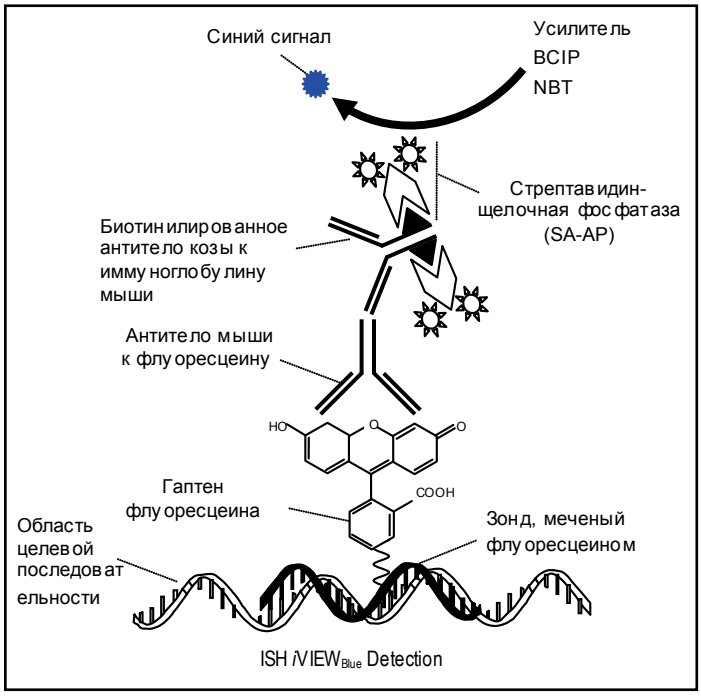



**Рис. 2.** Реакция ISH с синим окрашиванием

## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

INFORM EBER Probe содержит реагенты в количестве, достаточном для проведения 50 тестов.

Один дозатор INFORM EBER Probe объемом 5 мл содержит приблизительно 750 нг/мл меченого флуоресцеином зонда, смешанного с блокирующей DNA рыбы в буферном растворе для реакции гибридизации, содержащем формамид.

Подробное описание следующих разделов представлено в соответствующем листке-вкладыше к набору для обнаружения VENTANA: «Принцип процедуры», «Необходимые, но не входящие в комплект материалы и реагенты», «Отбор образцов и подготовка к анализу», «Процедуры контроля качества», «Интерпретация результатов», «Общие ограничения», «Проблемы и их устранение».

## НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ МАТЕРИАЛЫ

Реагенты для окрашивания, например наборы для обнаружения VENTANA и вспомогательные компоненты, не входят в комплект поставки.

Продукты, перечисленные в листке-вкладыше, могут быть недоступны в некоторых странах. Проконсультируйтесь с местным представителем службы поддержки.

## ХРАНЕНИЕ

После получения препарата и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживать.



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

Для обеспечения надлежащей подачи реагента и стабильности зонда, после каждого использования необходимо закрывать дозатор крышкой и сразу ставить его в холодильник в вертикальном положении.

На каждом дозаторе с зондом указан срок годности. При соблюдении условий хранения реагент остается стабильным до даты, указанной на этикетке. Не использовать реагент после истечения срока годности.

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Для использования с этим зондом пригодны подвергшиеся стандартной обработке, фиксированные формалином и залитые в парафин образцы тканей; анализ проводится на аппаратах BenchMark XT и BenchMark ULTRA. В качестве фиксатора для ткани рекомендуется использовать 10%-й раствор нейтрального забуференного формалина (Neutral Buffered Formalin, NBF)[4]. Перечень рекомендуемых и несовместимых с данным зондом фиксаторов см. в таблице 1. При наличии вопросов о рекомендуемых фиксаторах обратитесь к региональному представителю службы поддержки.

**Таблица 1.** Рекомендуемые и несовместимые фиксаторы

| Рекомендуемые фиксаторы | Несовместимые фиксаторы |
|---|---|
| Нейтральный забуференный формалин (NBF)<br>Цинк-формалин<br>Спирт-формалин<br>PREFER Fixative | Раствор Bouin<br>Спирт-формалин-уксусная кислота (AFA) |

Препараты следует окрашивать немедленно, так как качество мишеней НК в срезах ткани со временем может ухудшиться.

Одновременно с исследованием неизвестных образцов рекомендуется провести исследование на положительном и отрицательном контролях.

Для срезов, толщина которых превышает 4 мкм, может потребоваться обработка протеазой интенсивнее рекомендованной. Ввиду избытка парафина в ткани может отмечаться большее количество пузырей в ядрах, чем в более тонких срезах. Пузырьки в ядрах могут иметь большие и малые размеры. Также возможно наличие вакуолей. Как правило, этот артефакт подсчету сигналов не препятствует. Однако в сложных случаях пузырьки могут деформировать ядра или искажать сигналы, делая подсчет невозможным. Для этих образцов может потребоваться депарафинирование в ванночке с ксилолом или спиртом перед повторным окрашиванием на приборе. Также пользователь может выбрать опцию расширенного депарафинирования во время процедуры окрашивания (см. раздел «Устранение проблем»).

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики *in vitro* (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. **Внимание! Продукт содержит формамид.** Формамид токсичен при вдыхании и умеренно токсичен при проглатывании. Он оказывает раздражающее действие на кожу, глаза, слизистые оболочки и абсорбируется кожей. Он может оказать негативное воздействие на плод при беременности. При обращении с реагентами соблюдайте меры предосторожности. При обращении с предполагаемыми канцерогенами или токсичными материалами используйте одноразовые перчатки и защитную одежду.
4. Перед запуском анализа на приборе убедитесь, что контейнер для отходов пуст. В противном случае контейнер для отходов может переполниться, что может привести к поскальзыванию и падению пользователя.
5. Материалы животного или человеческого происхождения должны рассматриваться как потенциально биологически опасные и утилизироваться с соблюдением надлежащих мер предосторожности.
6. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды. Избегайте вдыхания реагентов.
7. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, т. к. это может стать причиной неверных результатов.
8. Относительно рекомендованного способа утилизации препарата проконсультируйтесь с местными или государственными органами власти.
9. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Зонды VENTANA разработаны для использования в аппаратах BenchMark XT и BenchMark ULTRA совместно с наборами для обнаружения VENTANA и вспомогательными принадлежностями.

Параметры автоматизированных процедур можно выводить на дисплей, распечатывать и редактировать в соответствии с процедурой, приведенной в руководстве по эксплуатации прибора. Подробные сведения о процедурах окрашивания методом гибридизации *in situ* (ISH) см. во вкладыше соответствующего набора для обнаружения VENTANA.

Для анализа с применением зонда INFORM EBER Probe в аппаратах BenchMark XT и BenchMark ULTRA используйте процедуры окрашивания, перечисленные в таблице 2.

**Таблица 2.** Процедуры окрашивания при использовании зонда INFORM EBER Probe в аппаратах BenchMark XT и BenchMark ULTRA

| Аппаратная платформа | Процедура окрашивания |
|---|---|
| BenchMark XT | XT INFORM Probes *i*VIEW Blue v3 |
| BenchMark ULTRA | U INFORM *i*VIEW Blue ISH |

Для анализа с применением зонда INFORM EBER Probe в аппаратах BenchMark XT и BenchMark ULTRA используйте рекомендуемые протоколы окрашивания, перечисленные в таблице 3.

**Таблица 3.** Рекомендуемые протоколы окрашивания при использовании зонда INFORM EBER Probe в аппаратах BenchMark XT и BenchMark ULTRA.

| Условие окрашивания | BenchMark XT | BenchMark ULTRA |
|---|---|---|
| **Депарафинирование** | Выбрано | Выбрано, продленное |
| **Предварительная обработка клеток*** | Стандартные условия | Смягченные условия |
| **ISH Протеаза 3** | 4 минуты | Нет |
| **Зонд** | INFORM EBER Probe | INFORM EBER Probe |
| **Контрастное окрашивание** | Red Counterstain II, 4 минуты | Red Counterstain II, 4 минуты |

* Обратите внимание, что на этапе Cell Conditioning BenchMark XT Instrument использует SSC (P/N 950-110) и на этапе Cell Conditioning BenchMark ULTRA Instrument использует CC2 (P/N 950-123).

## ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

### Положительный гистологический контроль

Положительный гистологический контроль должен осуществляться при каждом процессе окрашивания. Контроли используются для подтверждения того, что зонд был нанесен и что прибор работает надлежащим образом. Данный образец должен содержать как положительно, так и отрицательно окрашивающиеся клетки или компоненты тканей. Использование образцов, прошедших другой процесс фиксации или обработанных иначе, чем образцы, взятые у пациентов, обеспечивает надлежащий контроль, свидетельствующий только о том, что реагенты и прибор работают надлежащим образом. Образец со слабым положительным окрашиванием более пригоден, чем ткань с сильным положительным окрашиванием, для оптимального контроля качества и для обнаружения незначительной степени разложения реагентов. Если положительные контроли не обнаруживают положительного окрашивания, результаты, полученные для исследуемых образцов, следует считать недействительными. При выполнении каждой процедуры окрашивания рекомендуется использовать положительный гистологический контроль, соответствующий требованиям лаборатории. Контрольные образцы могут быть образцами, полученными при биопсии и подготовленными тем же способом,



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

который использовался для подготовки образцов пациента. Результаты анализа тестируемых образцов должны быть получены в течение одного сеанса.

### Отрицательный гистологический контроль

Отрицательный гистологический контроль должен осуществляться при каждом процессе окрашивания. Цель контроля — отслеживание непреднамеренной перекрестной реактивности зонда и антитела к клеточным компонентам. Тот же образец, который используется как положительный гистологический контроль, может использоваться как отрицательный гистологический контроль. Различные виды клеток, присутствующие в большинстве образцов, обеспечивают внутренние отрицательные контрольные участки, но пользователь в этом должен убедиться. Неокрашиваемые компоненты должны демонстрировать отсутствие специфического окрашивания и служить индикаторами фонового окрашивания. Если происходит неприемлемое окрашивание участков ткани, выбранных в качестве отрицательного контроля, результаты, полученные на образцах пациента, следует считать недействительными.

### Положительный контрольный зонд

Анализ с использованием положительного контрольного зонда (то есть U6) следует проводить либо при каждом анализе образца, либо с целью поиска и устранения неисправностей для оценки целостности РНК или ДНК, которая может варьироваться в зависимости от метода фиксации и предварительной обработки образца.

### Реагент для отрицательного контроля

Реактив отрицательного контроля должен использоваться вместо зонда ISH с каждым окрашенным образцом как средство для интерпретации результатов для каждого пациента. Это будет служить доказательством неспецифического фонового окрашивания для каждого предметного стекла. Вместо зонда ISH окрасьте предметное стекло при помощи VENTANA ISH Negative Control или Negative Control Probe. Период инкубации для контролей должен соответствовать таковому для зонда.

Отрицательный контроль особенно важен в свете того факта, что кишечную форму щелочной фосфатазы можно обнаружить в клетках, отличных от щеточной каемки клеток кишечного эпителия. Кроме того, при фиксации могут присутствовать ферменты, способные восстанавливать нитросиний тетразолий.

### Необъяснимые расхождения

В случае необъяснимых расхождений контрольных образцов необходимо немедленно обратиться к представителю местной службы поддержки. Если результаты контроля качества не соответствуют спецификациям, результаты, полученные на образцах пациента, следует считать недействительными. См. раздел «Устранение проблем» в данном вкладыше. Выявите и устраните проблему, после чего повторите работу с образцами пациента.

### Верификация анализа

Перед начальным использованием реагента в диагностической процедуре следует верифицировать его эффективность. Для этого выполняется тестирование реагента на серии образцов с известными характеристиками эффективности ISH. Эти процедуры контроля качества следует повторять для каждой новой партии реагента и в каждом случае, когда изменяются параметры исследования.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Процедура автоматического окрашивания стекол на аппарате компании VENTANA приводит к осаждению продукта реакции синего цвета на целевых участках ДНК или РНК, локализованных с помощью меченого зонда. Перед интерпретацией результатов квалифицированный патоморфолог, имеющий опыт проведения процедур ISH, должен оценить положительный и отрицательный контроли. Примечание. Применение объектива с увеличением ×100 не рекомендовано.

### Контроли

Окрашенный положительный гистологический контроль должен исследоваться в первую очередь для оценки надлежащего функционирования всех реагентов. Наличие синего окрашенного продукта реакции на клетках-мишенях является показателем положительной реактивности.

Отрицательный контроль должен исследоваться после положительного контроля для проверки специфичности реакции. Не должно наблюдаться никакого специфического окрашивания для отрицательного контроля. Если окрашивание произошло, то это может свидетельствовать о неспецифичной перекрестной реактивности к клеткам или клеточным компонентам. Для интерпретации результатов окрашивания следует оценивать неповрежденные клетки, поскольку некротические и дегенеративные клетки часто окрашиваются неспецифически.

Если положительный или отрицательный контроль не обнаруживает соответствующего окрашивания, все результаты, полученные для исследуемых образцов, считаются недействительными.

### Образцы пациента

Образцы пациента следует исследовать в последнюю очередь. Интенсивность положительного окрашивания следует оценивать в контексте любого фонового окрашивания отрицательного контроля для реагента. Отрицательный результат означает, что целевой фрагмент РНК или ДНК не обнаружен, а не обязательно то, что фрагмент не содержится в исследуемых клетках. При интерпретации всех данных ISH следует также исследовать морфологию каждого образца при помощи среза, окрашенного гематоксилином и эозином. Интерпретация результатов морфологических исследований и соответствующих клинических данных пациента должна проводиться квалифицированным патоморфологом.

## ОГРАНИЧЕНИЯ

### Общие ограничения

1. На результаты окрашивания ткани влияет обращение с тканью и обработка ее перед окрашиванием. Ненадлежащие фиксация, замораживание, оттаивание, промывка, просушка, нагрев, неправильное выполнение срезов или загрязнение другими тканями или жидкостями могут привести к появлению артефактов, захвату антитела или получению ложноотрицательных результатов. Несогласующиеся результаты могут быть получены вследствие несоблюдения методики фиксации и заливки или присущей ткани неоднородности.
2. Избыточное или неполное контрастное окрашивание может негативно повлиять на правильность интерпретации результатов.
3. Вследствие разброса условий обработки образцов может оказаться необходимым увеличить или уменьшить время обработки ISH протеазой, а для отдельных образцов использовать иную ISH протеазу. Пользователь должен подтвердить такие изменения. Пользователи, допускающие отклонения от рекомендуемых методик проведения исследования, несут ответственность за интерпретацию результатов, полученных на образцах ткани пациента.
4. При использовании реагентов с тканями, которые ранее не тестировались, могут возникать неожиданные реакции. В связи с биологической вариабельностью тканей, полностью исключить возможность непредусмотренной реактивности нельзя даже для тех тканей, на которых данные реагенты уже тестировались. Документированные случаи неожиданных реакций следует доводить до сведения регионального представителя службы поддержки.

### Специфические ограничения

1. Фиксатор Bouin продемонстрировал несовместимость с зондами ISH. В фиксировавшихся при помощи фиксатора Bouin образцах не удалось обнаружить единичные копии гена.
2. Для данного анализа не рекомендуется использовать фиксатор ФУС.
3. Окрашивание после фиксации цинк-формалином не продемонстрировало такое же качество, как после фиксации 10%-ым раствором нейтрального забуференного формалина.
4. При использовании меченых флуоресцеином зондов и набора для обнаружения ISH iVIEW$_{Blue}$ Detection Kit возможно окрашивание ядер и/или цитоплазмы эпителиальных клеток тканей ЖКТ. Для обнаружения этого окрашивания используйте отрицательный контрольный зонд.



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

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Характеристики зонда INFORM EBER Probe проходили оценку в исследованиях специфичности, чувствительности и повторяемости, результаты которых перечислены в таблице 4 и в таблице 5, а также в разделе «Повторяемость».

### Специфичность

**Таблица 4.** Специфичность зонда INFORM EBER Probe определяли путем окрашивания фиксированных формалином и залитых в парафин нормальных тканей.

| Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев | Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|---|---|
| Головной мозг | 0/3 | Периферический нерв (тонкий) | 0/3 |
| Мозжечок | 0/3 | Тимус | 0/3 |
| Надпочечник | 0/3 | Миелоидная ткань (костный мозг) | 0/3 |
| Яичник | 0/3 | Легкое | 0/3 |
| Поджелудочная железа | 0/3 | Мезотелий | 0/3 |
| Лимфоузлы | 0/12 | Сердце | 0/3 |
| Паращитовидная железа | 0/3 | Пищевод | 0/3 |
| Мочевой пузырь | 0/3 | Желудок | 0/3 |
| Гипофиз (питуитарная железа) | 0/3 | Тонкий кишечник | 0/3 |
| Яичко | 0/3 | Толстый кишечник | 0/3 |
| Щитовидная железа | 0/3 | Печень | 0/3 |
| Молочная железа | 0/3 | Слюнная железа | 0/3 |
| Селезенка | 0/4 | Почка | 0/3 |
| Миндалины | 0/5 | Простата | 0/3 |
| Эндометрий | 0/3 | Шейка матки | 0/3 |
| Скелетная мышца | 0/3 | Кожа | 0/3 |

### Чувствительность

**Таблица 5.** Чувствительность зонда INFORM EBER Probe определяли путем окрашивания фиксированных формалином и залитых в парафин нормальных тканей.

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Глиобластома | 0/1 |
| Менингиома | 0/1 |
| Эпендимома | 0/1 |
| Олигодендроглиома | 0/1 |
| Серозная аденокарцинома (яичник) | 0/1 |
| Аденокарцинома | 0/1 |
| Инсулинома | 0/1 |
| Аденокарцинома | 0/1 |
| Семинома | 0/2 |
| Медуллярная карцинома (щитовидная железа) | 0/1 |
| Папиллярная карцинома (щитовидная железа) | 0/1 |
| Протоковая карцинома in situ (DCIS) (молочная железа) | 0/1 |
| Микроинвазивная протоковая карцинома in situ (DCIS) (молочная железа) | 0/1 |
| Инвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 0/1 |
| В-клеточная лимфома (неопределенный подтип) | 4/20 |
| Мелкоклеточная карцинома (легкое) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (легкое) | 0/1 |
| Аденокарцинома (легкое) | 0/1 |
| Нейроэндокринная карцинома | 0/1 |
| Аденокарцинома (пищевод) | 0/1 |
| Перстневидноклеточный рак | 0/1 |
| Аденокарцинома (тонкий кишечник) | 0/1 |
| Стромальная саркома (тонкий кишечник) | 0/1 |
| Аденокарцинома (толстый кишечник) | 0/1 |
| Гастроинтестинальная стромальная опухоль (GIST) | 0/2 |
| Аденокарцинома (прямая кишка) | 0/1 |
| Гепатоцеллюлярная карцинома | 0/1 |
| Гепатобластома | 0/1 |
| Светлоклеточная карцинома (почка) | 0/1 |
| Аденокарцинома (предстательная железа) | 0/2 |
| Лейомиома (матка) | 0/1 |
| Аденокарцинома (матка) | 0/1 |
| Светлоклеточная карцинома (матка) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (шейка матки) | 0/2 |
| Эмбриональная рабдомиосаркома | 0/1 |
| Меланома (прямая кишка) | 0/1 |
| Базальноклеточная карцинома | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (кожа) | 0/1 |
| Нейрофиброма | 0/1 |
| Нейробластома | 0/1 |



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

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Мезотелиома | 0/1 |
| Лимфома Ходжкина | 21/52 |
| Анапластическая лимфома | 3/9 |
| Уротелиальная карцинома | 0/1 |
| Лейомиосаркома | 0/2 |
| Остеосаркома | 0/1 |
| Веретеноклеточная рабдомиосаркома | 0/1 |
| Диффузная В-крупноклеточная лимфома | 1/22 |
| В-клеточная лимфома из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT-лимфома) | 0/5 |
| Т-клеточная лимфома | 29/64 |
| Миелома | 2/10 |
| Лимфома Беркитта | 3/3 |
| Фолликулярная лимфома | 0/3 |
| NK/T-клеточная лимфома, назальный тип | 7/8 |

### Повторяемость

Исследования повторяемости для зонда INFORM EBER Probe проводились с целью оценки:

- воспроизводимости результатов в пределах одного сеанса и между сеансами на аппарате BenchMark XT;
- воспроизводимости внутри платформы при использовании аппаратов BenchMark XT и BenchMark ULTRA;
- Воспроизводимость между платформами с использованием приборов серии BenchMark XT и BenchMark ULTRA.

Все исследования соответствовали критериям приемлемости.

## ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Для поиска и устранения неисправностей см. таблицу 6.

**Таблица 6.** Поиск и устранение неисправностей

| Проблема | Способ устранения |
|---|---|
| Отрицательный результат положительного контроля | Убедитесь, что на предметном стекле имеется этикетка с правильным штрих-кодом |
| Ткани смываются с предметных стекол. | Убедитесь, что используются положительно заряженные предметные стекла |
| Положительный контроль не окрашивается или степень окрашивания слабее ожидаемой. | Чтобы понять, с чем связана проблема (с микропрепаратом для контроля или с используемыми реагентами), проверьте другие положительные контроли, окрашенные во время того же сеанса окрашивания. Каждый образец содержит сигналы для внутреннего положительного контроля; так, наличие ожидаемого синего окрашивания здоровых клеток по методике ISH означает положительный результат окрашивания. Для поиска потенциальных проблем рекомендуется в ходе каждого сеанса использовать положительные контрольные образцы. |
| В ядрах на срезах толщиной более 4 мкм присутствуют пузырьки, что связано с избыточным количеством парафина. | При настройке процедуры окрашивания выберите опцию «Продленное депарафинирование». (Примечание. Эта опция доступна только для протокола аппарата BenchMark XT, поскольку протокол аппарата BenchMark ULTRA прошел оптимизацию с включением продленного депарафинирования.) |

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ


1. Ioachim H, Medeiros J. Ioachim's Lymph Node Pathology Fourth Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2009:76-77
2. Ambinder RF, et al. Epstein-Barr-Encoded RNA In Situ Hybridization: Diagnostic Applications. Human Pathology 1994;25:602-605.
3. Randhawa PS, et al. Renal Allograft Involvement by Epstein-Barr Virus Associated Post-transplant Lymphoproliferative Disease. American Journal of Surgical Pathology 1996;20(5):563-571.
4. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.


## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ


VENTANA, BENCHMARK, INFORM и логотип VENTANA являются товарными знаками компании Roche.

Все остальные товарные знаки являются собственностью соответствующих владельцев.

© 2017 Ventana Medical Systems, Inc.


## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ


Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.

www.ventana.com





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

# INFORM Kappa Probe

REF 800-2843

05278678001

IVD Σ 50

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Зонд INFORM Kappa Probe производства компании Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana) предназначен для обнаружения цитоплазматической мРНК для легкой каппа-цепи иммуноглобулина в образцах тканей, обработанных формалином и залитых парафином. Как правило, он используется совместно с зондом INFORM Lambda Probe для легкой лямбда-цепи иммуноглобулина. Комбинированное определение помогает отличить пролиферацию поликлональных антител (мРНК, несущей ген каппа-цепи и лямбда-цепи), связанную с доброкачественной пролиферацией реактивных плазматических клеток и пролиферацией В-лимфоцитов в лимфоидной ткани, от пролиферации моноклональных антител (либо содержащих каппа-цепи и не содержащих лямбда-цепи, либо не содержащих каппа-цепи и содержащих лямбда-цепи), связанной с пролиферациями неопластических плазматических клеток и В-лимфоцитов.[1,2,3] Зонд INFORM Kappa Probe предназначен для использования с диагностическим набором ISH *i*VIEW$_{Blue}$ Detection Kit и другими вспомогательными реактивами для окрашивания срезов ткани, зафиксированных в нейтральном забуференном растворе формалина и залитых парафином, или со стеклами с цитологическими образцами на автоматических иммуногистостейнерах BenchMark, BenchMark XT и BenchMark ULTRA.

Для обнаружения реакции окрашивания используется световая микроскопия. Положительные результаты облегчают классификацию нормальных и аномальных образцов и служат дополнением к традиционным гистопатологическим или цитопатологическим исследованиям.

Оценку должен производить квалифицированный патологоанатом с учетом результатов гистологического исследования, необходимых клинических данных и после сравнения с соответствующими контрольными образцами.

Данный продукт предназначен для диагностики *in vitro*.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И КОММЕНТАРИИ

Зонд INFORM Kappa Probe содержит смесь олигонуклеотидных зондов меченых флуоресцеином в составе конъюгата, в разбавителе на основе формамида. Намеченной мишенью является матричная РНК (мРНК), кодирующая легкую каппа-цепь иммуноглобулина, в цитоплазме больших активированных В-лимфоцитов, плазматических клеток и плазмацитоидных клеток.

## ПРАВИЛА ПРИМЕНЕНИЯ

Зонд INFORM Kappa Probe предназначен для использования с набором VENTANA ISH *i*VIEW$_{Blue}$ Detection Kit и дополнительными реактивами на приборах BenchMark, BenchMark XT и BenchMark ULTRA.

Диагностический набор содержит первичные антитела и конъюгат биотина со вторичными антителами, связанный с пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой, используемой в качестве хромогенного фермента. В процессе синего окрашивания ISH меченый флуоресцеином зонд гибридизуется к мишени – специфичным последовательностям РНК в клетках и тканях. За этой стадией следует добавление конъюгата стрептавидин/щелочная фосфатаза-фермент, который связывается с биотином, присутствующим во вторичном антителе. После этого меченый флуоресцеином зонд визуализируется при помощи 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфата и хромогена нитросинего тетразолия. Выпадающий осадок синего цвета легко визуализируется при световой микроскопии.

Протокол окрашивания состоит из нескольких этапов, на которых реактивы инкубируются в течение предварительно установленного времени и при заданной температуре. После завершения каждого этапа инкубации автоматический иммуногистостейнер BenchMark, BenchMark XT или BenchMark ULTRA промывает срезы, чтобы удалить несвязанный материал, и применяет жидкое покрытие, минимизирующее испарение со стекла водных растворов реактивов. Результаты интерпретируются при помощи световой микроскопии и используются для дифференциальной диагностики патофизиологических процессов, связанных или не связанных с положительным окрашиванием зонда.

Рисунок 1 поясняет синюю реакцию ISH.

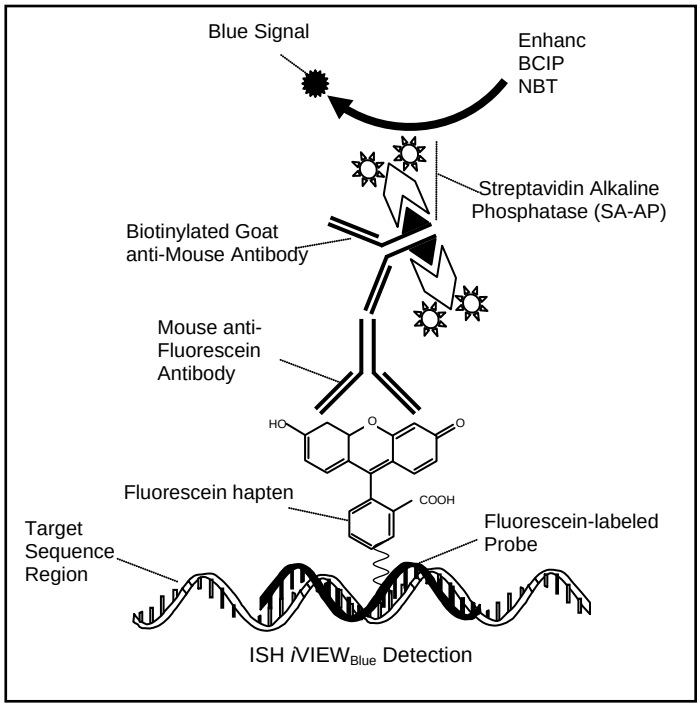



**Рисунок 1.** Синяя реакция ISH

## РЕАКТИВЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

INFORM Kappa Probe содержит достаточное количество реактива для проведения 50 тестов.

Один дозатор INFORM Kappa Probe емкостью 5 мл содержит приблизительно 550 нг/мл меченого флуоросцеином зонда в содержащем формамид буфере для гибридизации.

Подробное описание вопросов, перечисленных ниже, см. в соответствующей части вкладыша в упаковку диагностического набора VENTANA: 1) принципы процедуры; 2) необходимые, но не входящие в комплект материалы и реактивы; 3) отбор образцов тканей и подготовка к анализу; 4) порядок контроля качества; 5) проблемы и их устранение; 6) интерпретация результатов; 7) общие ограничения.

## НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

Реактивы для окрашивания, например диагностические наборы VENTANA и дополнительные компоненты в комплект поставки не входят.

## ХРАНЕНИЕ

Хранить при температуре от 2 до 8 °C. Не замораживать.

Чтобы обеспечить надлежащую сохранность и стабильность зонда, после каждого использования необходимо заменять колпачок дозатора. Дозатор следует немедленно ставить в холодильник в вертикальном положении.

На каждом дозаторе зонда указана дата окончания срока годности. При правильном хранении реактив сохраняет стабильность до даты, указанной на этикетке. Не используйте реактив после истечения срока годности.

## ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА ОБРАЗЦА

Данный зонд пригоден для использования с подвергшимися стандартной обработке, фиксированными формалином и залитыми парафином срезами тканей на приборах BenchMark, BenchMark XT и BenchMark ULTRA. Рекомендуется использовать в качестве фиксатора для ткани 10 % нейтральный забуференный раствор формалина.[2] Перечни рекомендуемых и несовместимых с данным зондом фиксаторов см. в Табл 1. При наличии вопросов о рекомендуемых фиксаторах обратитесь к региональному представителю службы поддержки.



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

| Рекомендуемые фиксаторы | Несовместимые фиксаторы |
|---|---|
| Нейтральный забуференный формалин<br>Цинк-формалин<br>Спирт-формалин<br>PREFER | Bouin's<br>Спирт-формалин-уксусная кислота (ФУС) |

**Табл 1.** Рекомендуемые и несовместимые фиксаторы

Препараты следует окрашивать немедленно, так как качество мишеней НК в срезах ткани со временем может ухудшиться.

Для срезов, толщина которых превышает 4 мкм, может потребоваться обработка протеазой интенсивнее рекомендованной. Ввиду избытка парафина в ткани может отмечаться большее количество пузырьков в ядрах, чем в более тонких срезах. Пузырьки в ядрах могут иметь большие и малые размеры. Также возможно наличие вакуолей. Как правило, этот артефакт подсчету сигналов не препятствует. Тем не менее, в наиболее выраженных случаях пузырьки в ядрах способны искажать ядра или сигналы, делая подсчет невозможным. Перед повторным окрашиванием при помощи прибора может потребоваться депарафинизировать такие образцы в ванночках с ксилолом и спиртом. Кроме того, пользователь может выбрать опцию пролонгированного депарафинирования в процедуре окрашивания (см. раздел "Проблемы и их устранение").

## ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики *in vitro*.
2. **Внимание! Продукт содержит формамид!** Формамид токсичен при вдыхании и умеренно токсичен при приеме внутрь. Он оказывает раздражающее действие на кожу, глаза, слизистые оболочки и абсорбируется кожей. Он может оказать негативное воздействие на плод при беременности. Обращаться с осторожностью! При обращении с предполагаемыми канцерогенами или токсичными материалами используйте одноразовые перчатки и защитную одежду.
3. Перед началом сеанса убедитесь, что контейнер для отходов пуст. В противном случае контейнер для отходов может переполниться, что приведет к риску для пользователя поскользнуться и упасть.
4. С материалами человеческого или животного происхождения следует обращаться как с потенциально биологически опасными. Их утилизация должна производиться с выполнением надлежащих мер предосторожности.
5. Избегайте попадания реактивов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. При попадании реактивов на чувствительные участки промойте их большим количеством воды. Не вдыхайте реактивы.
6. Не допускайте микробной контаминации реактивов, так как она может привести к получению недостоверных результатов.
7. Относительно рекомендованного способа утилизации препарата проконсультируйтесь с местными или государственными органами власти.
8. Дополнительная информация содержится в Паспорте безопасности вещества.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Зонды VENTANA предназначены для использования с приборами BenchMark, BenchMark XT и BenchMark ULTRA в сочетании с диагностическими наборами и вспомогательными материалами VENTANA.

Параметры автоматизированных процедур можно выводить на дисплей, распечатывать и редактировать в соответствии с процедурой, приведенной в руководстве пользователя прибором. Подробные сведения о процедурах окрашивания гибридизацией *in situ* см. во вкладыше диагностического набора VENTANA.

В связи с различиями в фиксации и обработке тканей, а также в лабораторном оборудовании и внешних условиях, может потребоваться увеличение или уменьшение времени гибридизации зонда, кондиционирования клеток и предварительной обработки протеазой в зависимости от конкретных образцов, диагностических методов и предпочтений пользователя.

### Дегидратация *i*VIEW$_{Blue}$ Assay

Компания Ventana рекомендует следующую процедуру:

1. Чтобы удалить покровный раствор, последовательно промойте предметные стекла в 2 растворах мягкого моющего средства (не используйте моющие средства, предназначенные для автоматической мойки).
2. В течение 1 минуты тщательно промойте стекла дистиллированной водой. Стряхните избыток воды.
3. Перенесите предметные стекла в ванночку с этанолом 80 % приблизительно на 1 минуту.
4. Перенесите предметные стекла в ванночку с этанолом 90 % приблизительно на 1 минуту.
5. Перенесите предметные стекла в ванночку с этанолом 100 % приблизительно на 1 минуту.
6. Перенесите предметные стекла во вторую ванночку с этанолом 100 % приблизительно на 1 минуту.
7. Перенесите предметные стекла в ванночку с ацетоном и погрузите их 10 раз подряд.
8. Перенесите предметные стекла в первую ванночку с ксилолом приблизительно на 30 секунд.
9. Перенесите предметные стекла во вторую ванночку с ксилолом приблизительно на 30 секунд.
10. Накройте предметное стекло покровным.

    Примечание. Чтобы обеспечить полную дегидратацию, требуется частая замена ванночек с этанолом. Допускается использование третьей ванночки с этанолом 100 %.

### Контроль качества

**Положительный контроль образца**

Положительный контроль образца должен проводиться при каждой процедуре окрашивания. Контроли используются для подтверждения применения зонда и правильности функционирования прибора. Такой образец должен содержать как положительно, так и отрицательно окрашиваемые клетки или компоненты тканей. Контрольными образцами могут служить материалы цитологического исследования, биопсии, а также образцы, полученные в ходе операции или недавней аутопсии, приготовленные или зафиксированные как можно быстрее после взятия способом, который идентичен способу обработки образцов пациента. С использованием таких образцов должны контролироваться все этапы процедуры, от подготовки образца до окрашивания. Использование образцов, зафиксированных или обработанных не как образцы пациента, обеспечивает соответствующий контроль только правильности функционирования реактивов и прибора. Образец со слабо положительным окрашиванием более пригоден для оптимального контроля качества и обнаружения незначительной степени разложения реактива, чем образец с более выраженным положительным окрашиванием. Если в какой-либо партии препаратов не наблюдается положительного окрашивания заведомо положительных структур тканей, результаты окрашивания данной партии исследуемых образцов следует считать недостоверными.

**Отрицательный контроль образца**

Отрицательный контроль образца должен проводиться при каждой процедуре окрашивания. Он проводится с целью выявления непредусмотренной перекрестной реактивности зонда и антител с клеточными компонентами. Образец, используемый для положительного контроля, может также использоваться для отрицательного контроля. Различные типы клеток, присутствующие в большинстве образцов, обеспечивают внутренний отрицательный контроль, что, однако, должно быть подтверждено пользователем. Неокрашиваемые компоненты должны демонстрировать отсутствие специфического окрашивания и служить индикаторами фонового окрашивания. Если наблюдается неприемлемое окрашивание участков отрицательного контроля образца, результаты, полученные на исследуемых образцах пациента, признаются недействительными.

**Реактив положительного контроля**

Реактив положительного контроля должен использоваться в ходе верификации метода определения и при устранении проблем, так как доступность ДНК и РНК может различаться в зависимости от метода фиксации образца и его предварительной обработки.

**Реактив отрицательного контроля**

Реактив отрицательного контроля должен использоваться вместо зонда ISH для гибридизации in situ для каждого окрашенного образца, чтобы облегчить интерпретацию каждого результата окрашивания образцов пациента. Это обеспечивает индикацию неспецифического фонового окрашивания для каждого стекла. Вместо зонда ISH окрасьте предметное стекло при помощи VENTANA ISH Negative Control или Negative Control Probe. Период инкубации контролей должен быть таким же, как и период инкубации зонда.

Отрицательный контроль особенно важен в свете того факта, что кишечную форму щелочной фосфатазы можно обнаружить не только в клетках щеточной каемки кишечного эпителия. Кроме того, в ходе фиксации образца могут быть сохранены ферменты, вызывающие уменьшение окрашивания нитросиним тетразолием.



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

**Необъяснимые расхождения**

В случае получения необъяснимых расхождений в результатах окрашивания контрольных образцов следует немедленно обратиться к региональному представителю службы поддержки. Если результаты контроля качества не соответствуют спецификациям, результаты, полученные на образцах пациента, следует считать недействительными. См. раздел "Проблемы и их устранение" в данном вкладыше. Идентифицируйте и устраните причину несоответствия, а затем повторите исследование образцов, взятых у пациента.

**Верификация диагностической системы**

Перед первым использованием реактива в диагностической процедуре, специфичность реактива должна быть верифицирована испытанием на серии положительных и отрицательных образцов с установленными характеристиками эффективности гибридизации in situ (см. изложенные выше процедуры контроля качества и рекомендации по контролю качестваCollege of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,[4] и NCCLS Approved Guideline[5]). Процедуры контроля качества следует выполнять для каждой новой партии реактивов и при изменении параметров анализа.

## Интерпретация результатов

Процедура окрашивания стекол на автоматическом иммуногистостейнере VENTANA приводит к осаждению продукта реакции синего цвета на целевых участках ДНК или РНК, локализованных с помощью меченого зонда. Перед интерпретацией результатов квалифицированный патоморфолог, имеющий опыт проведения процедур ISH, должен оценить положительный и отрицательный контроли.

**Контроли**

В первую очередь необходимо оценить окрашенный положительный контроль, чтобы подтвердить, что все реактивы функционируют должным образом. Появление синего окрашивания в целевых клетках свидетельствует о наличии положительной реактивности.

Отрицательный контроль должен исследоваться после положительного контроля для проверки специфичности реакции. Специфическое окрашивание при отрицательном контроле должно отсутствовать. Если окрашивание произошло, то это может свидетельствовать о неспецифичной перекрестной реактивности к клеткам или клеточным компонентам. Для интерпретации окрашивания следует оценивать неповрежденные клетки, поскольку некротические и дегенеративные клетки часто окрашиваются неспецифически.

Если положительные или отрицательные контроли не демонстрируют соответствующего окрашивания, любые результаты, полученные на исследуемых образцах, признаются недействительными.

**Образец ткани пациента**

Препараты пациента оцениваются в последнюю очередь. При оценке интенсивности специфического окрашивания следует учитывать интенсивность фоновой окраски препарата, обработанного реактивом отрицательного контроля. Отрицательный результат означает, что целевая последовательность ДНК или РНК в исследуемых клетках не была обнаружена, а не то, что целевая последовательность в исследованных клетках отсутствует. При интерпретации любых результатов ISH морфология каждого образца также оценивается после окрашивания срезов гематоксилином и эозином. Выявленные морфологические изменения и связанные с ними клинические данные должны интерпретироваться квалифицированным патоморфологом.

## ОГРАНИЧЕНИЯ

### Общие ограничения

1. На результаты окрашивания влияют методы хранения и обработки ткани. Неправильное проведение процесса фиксации, замораживания, оттаивания, промывки, сушки, нагрева, получения срезов или загрязнение другими тканями или жидкостями может привести к артефактам, захвату антител или ложноотрицательным результатам. Расхождения в результатах могут возникать из-за непостоянства процедур фиксации и заливки, а также из-за дефектов ткани.
2. Как избыточное, так и недостаточное контр-окрашивание затруднят интерпретацию результатов.
3. Вследствие разброса условий обработки образцов может оказаться необходимым увеличить или уменьшить время обработки ISH протеазой, а для отдельных образцов использовать иную ISH протеазу. Подобные действия могут проводиться только после оценки пользователем. Пользователи, допускающие отклонения от рекомендуемых методик проведения исследования, несут ответственность за интерпретацию результатов, полученных на образцах ткани пациента.
4. Реактивы могут вступать в неожиданные реакции в тканях, впервые подвергающихся анализу. Возможность неожиданных реакций даже в анализированных тканях нельзя полностью исключить из-за биологической вариабельности тканей. Документированные случаи неожиданных реакций следует доводить до сведения регионального представителя службы поддержки.

### Особые ограничения

1. Фиксатор Bouin's продемонстрировал несовместимость с зондами ISH. В фиксировавшихся при помощи Bouin's образцах не удалось обнаружить единичных копий гена.
2. Для данного анализа не рекомендуется использовать фиксатор ФУС.
3. Окрашивание после фиксации цинк-формалином не продемонстрировало такое же качество, как после фиксации нейтральным забуференным раствором формалина 10 %.
4. При использовании меченых флуоресцеином зондов и диагностического набора ISH iVIEW$_{Blue}$ Detection Kit возможно окрашивание ядер и/или цитоплазмы эпителиальных клеток тканей ЖКТ. Для обнаружения этого окрашивания воспользуйтесь зондом отрицательного контроля.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Использование наборов VENTANA INFORM Kappa Probe, ISH iVIEW$_{Blue}$ Detection Kit и дополнительных реактивов с автоматическим иммуногистостейнером VENTANA приводит к появлению синего осадка на участках целевых последовательностей, локализованных с помощью зонда ISH.
2. Чувствительность и специфичность определения целевой последовательности оптимизирована и проверена компанией Ventana. Специфичность определяли при помощи 22 образцов опухолей с активной пролиферацией B-лимфоцитов, 16 образцов известных положительных гистологических контролей и 13 образцов известных отрицательных контролей. Все стекла проявили приемлемое окрашивание. Тем не менее, для обеспечения получения желаемого окрашивания каждый зонд ISH должен быть валидирован пользователем.
3. Воспроизводимость результатов окрашивания в пределах цикла использования INFORM Kappa Probe определялась на 8 образцах тканей. Результаты показали 100 %-ную воспроизводимость. Пользователи должны убедиться в воспроизводимости результатов в одном исследовании (в пределах одного цикла) путем окрашивания нескольких наборов серийных срезов с низким, средним и высоким содержанием целевых последовательностей в одном и том же цикле.
4. Воспроизводимость результатов окрашивания между циклами использования INFORM Kappa Probe определялась на 6 образцах клеточных линий и 13 образцах тканей. Результаты показали 100 %-ную воспроизводимость. Пользователи должны убедиться в воспроизводимости результатов от исследования к исследованию (между исследованиями) путем окрашивания нескольких наборов серийных образцов срезов с низким, средним и высоким содержанием целевых последовательностей в разные дни.

## ПРОБЛЕМЫ И ИХ УСТРАНЕНИЕ

| Проблема | Решение |
|---|---|
| Отрицательный результат положительного контроля | Убедитесь, что на предметном стекле имеется этикетка с правильным штрих-кодом |
| Ткани смываются с предметных стекол | Убедитесь, что используются положительно заряженные предметные стекла |



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

## ССЫЛКИ


1. Pringle JH, Ruprai AK, Primrose L, Keyte J, Potter L, Close P, Lauder I, In situ hybridization of immunoglobulin light chain mRNA in paraffin sections using biotinylated or hapten-labelled oligonucleotide probes. J. Pathol. 1990;162(3):197-207.
2. Beck RC, Tubbs RR, Hussein M, Pettay J, Hsi ED. Automated Colorimetric In Situ Hybridization (CISH): Detection of immunoglobulin (Ig) light chain mRNA expression in plasma cell (PC) dyscrosias and non-Hodgkin's lymphoma. Diagn. Mol. Pathol. 2003;12:14-20.
3. Euscher E, Nuovo GJ. Detection of kappa- and lambda- expressing cells in the endometrium by in situ hybridization. Int. J. Gynecol Pathol. 2002;21:383-390.
4. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2001.
5. NCCLS. Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline. NCCLS document MM4-A- (ISBN 1-56238-396-5). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 1999.
6. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.


## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ


INFORM, VENTANA, BENCHMARK, *ultra*View и логотип Ventana являются торговыми марками Roche.

Все другие товарные знаки являются собственностью их законных владельцев.

Компания Ventana Medical Systems, Inc предоставляет покупателю разовую лицензию в соответствии с патентами США № 6045759, 6945128 и 7378058 и в соответствии с аналогичными патентами, выданными в других странах.

© 2012, 2013 Ventana Medical Systems, Inc.


## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ


Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.

www.ventana.com


CE




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

# INFORM Cytoplasmic Lambda mRNA Probe

REF 800-2844

05278686001

IVD Σ 50

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Зонд Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana) INFORM Cytoplasmic Lambda mRNA Probe (INFORM Lambda Probe) предназначен для обнаружения цитоплазматической мРНК для легкой лямбда-цепи иммуноглобулина в образцах тканей, обработанных формалином и залитых парафином. Как правило, он используется совместно с зондом INFORM Kappa Probe для легкой каппа-цепи иммуноглобулина. Комбинированное определение помогает отличить пролиферацию поликлональных антител (мРНК, несущей ген каппа-цепи и лямбда-цепи), связанную с доброкачественной пролиферацией реактивных плазматических клеток и пролиферацией В-лимфоцитов в лимфоидной ткани, от пролиферации моноклональных антител (либо содержащих каппа-цепи и не содержащих лямбда-цепи, либо не содержащих каппа-цепи и содержащих лямбда-цепи), связанной с пролиферациями неопластических плазматических клеток и пролиферацией В-лимфоцитов в лимфоидной ткани.[1,2,3] Зонд INFORM Lambda Probe предназначен для использования с диагностическим набором ISH *i*VIEW$_{Blue}$ Detection Kit и другими вспомогательными реактивами для окрашивания срезов ткани, зафиксированных в нейтральном забуференном растворе формалина и залитых парафином, или со стеклами с цитологическими образцами на автоматических иммуногистостейнерах BenchMark, BenchMark XT или BenchMark ULTRA.

Для обнаружения реакции окрашивания используется световая микроскопия. Положительные результаты облегчают классификацию нормальных и аномальных образцов и служат дополнением к традиционным гистопатологическим или цитопатологическим тестам. Клиническая интерпретация любого окрашивания или отсутствия окрашивания должна дополняться морфологическими исследованиями и оценкой соответствующих контролей. Оценка должна выполняться квалифицированным патоморфологом с учетом анамнеза пациента и результатов иных диагностических исследований.

Данный продукт предназначен для диагностики *in vitro*.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И КОММЕНТАРИИ

Зонд INFORM Lambda Probe содержит смесь олигонуклеотидных зондов меченых флуоресцеином в составе конъюгата, в разбавителе на основе формамида. Намеченной мишенью является матричная РНК (мРНК), кодирующая легкую лямбда-цепь иммуноглобулина, в цитоплазме больших активированных В-лимфоцитов, плазматических клеток и плазмацитоидных клеток.

## ПРИНЦИПЫ ПРОЦЕДУРЫ

INFORM Lambda Probe предназначен для использования с диагностическим набором VENTANA ISH *i*VIEW$_{Blue}$ Detection Kit и дополнительными реактивами на приборах BenchMark, BenchMark XT и BenchMark ULTRA .

Диагностический набор содержит первичные антитела и конъюгат биотина со вторичными антителами, связанный с пероксидазой хрена ПХ или щелочной фосфатазой ЩФ, используемой в качестве хромогенного фермента. В процессе синего окрашивания ISH меченый флуоресцеином зонд гибридизуется к мишени – специфичным последовательностям РНК в клетках или тканях. За этой стадией следует добавление конъюгата стрептавидин-ЩФ (щелочная фосфатаза)-фермент, который связывается с биотином, присутствующим во вторичном антителе. После этого меченый флуоресцеином зонд визуализируется при помощи 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфата (BCIP) и хромогена нитросинего тетразолия (NTB). Выпадающий осадок синего цвета легко визуализируется при световой микроскопии.

Протокол окрашивания состоит из нескольких этапов, на которых реактивы инкубируются в течение предварительно установленного времени и при предварительно заданной температуре. После завершения каждого этапа инкубации автоматический иммуногистостейнер BenchMark, BenchMark XT или BenchMark ULTRA промывает срезы, чтобы удалить несвязанный материал, и применяет жидкое покрытие, минимизирующее испарение со стекла водных растворов реактивов. Результаты интерпретируются при помощи световой микроскопии и используются для дифференциальной диагностики патофизиологических процессов, связанных или не связанных с положительным окрашиванием зонда.

Рисунок 1 поясняет синюю реакцию ISH.

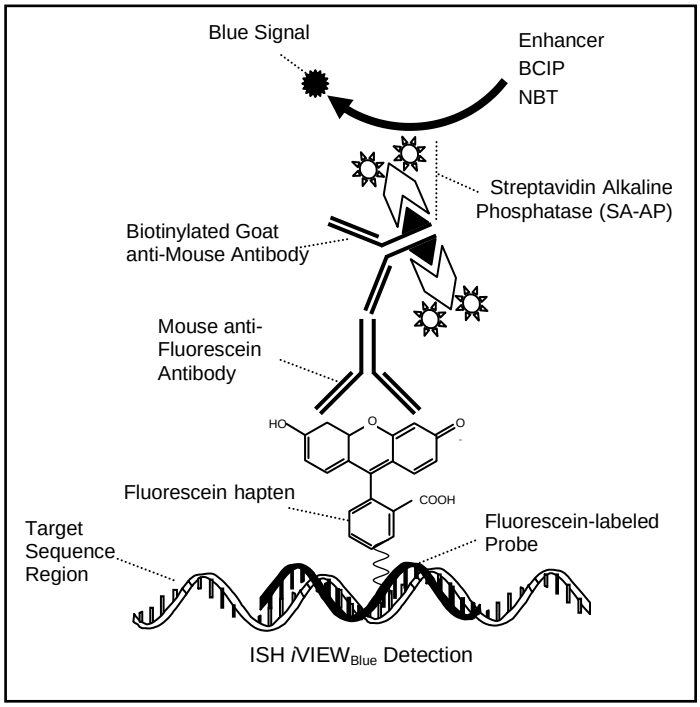



**Рисунок 1.** Синяя реакция ISH

## РЕАКТИВЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

INFORM Lambda Probe содержит достаточное количество реактива для проведения 50 тестов.

Один дозатор INFORM Lambda Probe 5 мл содержит приблизительно 550 нг/мл меченого флуоросцеином зонда в содержащем формамид буфере для гибридизации.

Подробное описание вопросов, перечисленных ниже, см. в соответствующей части вкладыша в упаковке диагностического набора VENTANA: 1) принципы процедуры; 2) необходимые, но не входящие в комплект материалы и реактивы; 3) отбор образцов тканей и подготовка к анализу; 4) процедуры контроля качества; 5) проблемы и их устранение; 6) интерпретация результатов; 7) общие ограничения.

## НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ МАТЕРИАЛЫ

Реактивы для окрашивания, например диагностические наборы VENTANA и дополнительные компоненты в комплект поставки не входят.

## ХРАНЕНИЕ

Хранить при температуре от 2 до 8 °C. Не замораживать.

Чтобы обеспечить надлежащую подачу реактива и стабильность зонда, после каждого использования необходимо заменять колпачок дозатора. Дозатор следует немедленно ставить в холодильник в вертикальном положении.

На каждом дозаторе зонда указана дата окончания срока годности. При правильном хранении реактив сохраняет стабильность до даты, указанной на этикетке. Не используйте реактив после истечения срока годности.

## ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА ОБРАЗЦА

Данный зонд пригоден для использования с подвергшимися стандартной обработке, фиксированных формалином и залитых парафином срезов тканей на приборах BenchMark, BenchMark XT или BenchMark ULTRA. Рекомендуется использовать в качестве фиксатора для ткани 10%-й раствор забуференного нейтрального формалина. [2] Перечень рекомендуемых и несовместимых с данным зондом фиксаторов см. в Табл. 1. При наличии вопросов о рекомендуемых фиксаторах обратитесь к региональному представителю службы поддержки.



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

| Рекомендуемые фиксаторы | Несовместимые фиксаторы |
|---|---|
| Нейтральный забуференный формалин<br>Цинк-формалин<br>Спирт-формалин<br>PREFER | Bouin's<br>Спирт-формалин-уксусная кислота (ФУС) |

**Табл. 1.** Рекомендуемые и несовместимые фиксаторы

Препараты следует окрашивать немедленно, так как качество мишеней НК в срезах ткани со временем может ухудшиться.

Для срезов, толщина которых превышает 4 мкм, может потребоваться обработка протеазой интенсивнее рекомендованной. Ввиду избытка парафина в ткани может отмечаться большее количество пузырьков в ядрах, чем в более тонких срезах. Пузырьки в ядрах могут иметь большие и малые размеры. Также возможно наличие вакуолей. Как правило, этот артефакт подсчету сигналов не препятствует. Тем не менее, в наиболее выраженных случаях пузырьки в ядрах способны искажать ядра или сигналы, делая подсчет невозможным. Перед повторным окрашиванием при помощи прибора может потребоваться депарафинизировать такие образцы в ванночках с ксилолом и спиртом. Кроме того, пользователь может выбрать опцию пролонгированного депарафинирования в процедуре окрашивания (см. раздел "Проблемы и их устранение").

## ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики *in vitro*.
2. **Внимание! Продукт содержит формамид!** Формамид токсичен при вдыхании и умеренно токсичен при приеме внутрь. Он оказывает раздражающее действие на кожу, глаза, слизистые оболочки и абсорбируется кожей. Он может оказать негативное воздействие на плод при беременности. Обращаться с осторожностью! При обращении с предполагаемыми канцерогенами или токсичными материалами используйте одноразовые перчатки и защитную одежду.
3. Перед началом сеанса убедитесь, что контейнер для отходов пуст. В противном случае контейнер для отходов может переполниться, что приведет к риску для пользователя поскользнуться и упасть.
4. С материалами человеческого или животного происхождения следует обращаться как с потенциально биологически опасными. Их утилизация должна производиться с выполнением надлежащих мер предосторожности.
5. Избегайте попадания реактивов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. При попадании реактивов на чувствительные участки промойте их большим количеством воды. Не вдыхайте реактивы.
6. Не допускайте микробной контаминации реактивов, так как она может привести к получению недостоверных результатов.
7. Относительно рекомендованного способа утилизации препарата проконсультируйтесь с местными и/или государственными органами власти.
8. Дополнительная информация содержится в Паспорте безопасности вещества.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Зонды VENTANA предназначены для использования с приборами BenchMark, BenchMark XT и BenchMark ULTRA в сочетании с диагностическими наборами и вспомогательными материалами VENTANA.

Параметры автоматизированных процедур можно выводить на дисплей, распечатывать и редактировать в соответствии с процедурой, приведенной в руководстве пользователя прибором. Подробные сведения о процедурах окрашивания гибридизацией *in situ* см. во вкладыше диагностического набора VENTANA.

В связи с различиями в фиксации и обработке тканей, а также в лабораторном оборудовании и внешних условиях, может потребоваться увеличение или уменьшение времени гибридизации зонда, кондиционирования клеток и предварительной обработки протеазой в зависимости от конкретных образцов, диагностических методов и предпочтений пользователя.

### Дегидратация *i*VIEW$_{Blue}$ Assay

Компания Ventana рекомендует следующую процедуру:

1. Чтобы удалить покровный раствор, последовательно промойте предметные стекла в 2 растворах мягкого моющего средства (не используйте моющие средства, предназначенные для автоматической мойки).
2. В течение 1 минуты тщательно промойте стекла дистиллированной водой. Стряхните избыток воды.
3. Перенесите предметные стекла в ванночку с этанолом 80 % приблизительно на 1 минуту.
4. Перенесите предметные стекла в ванночку с этанолом 90 % приблизительно на 1 минуту.
5. Перенесите предметные стекла в ванночку с этанолом 100 % приблизительно на 1 минуту.
6. Перенесите предметные стекла во вторую ванночку с этанолом 100 % приблизительно на 1 минуту.
7. Перенесите предметные стекла в ванночку с ацетоном и погрузите их 10 раз подряд.
8. Перенесите предметные стекла в первую ванночку с ксилолом приблизительно на 30 секунд.
9. Перенесите предметные стекла во вторую ванночку с ксилолом приблизительно на 30 секунд.
10. Накройте предметное стекло покровным.

    Примечание. Чтобы обеспечить полную дегидратацию, требуется частая замена ванночек с этанолом. Допускается использование третьей ванночки с этанолом 100 %.

### Процедуры контроля качества

**Положительный контроль образца**

Положительный контроль образца должен проводиться при каждой процедуре окрашивания. Контроли используются для подтверждения применения зонда и правильности функционирования прибора. Такой образец должен содержать как положительно, так и отрицательно окрашиваемые клетки или компоненты тканей. Контрольными образцами могут служить материалы цитологического исследования, биопсии, а также образцы, полученные в ходе операции или недавней аутопсии, приготовленные или зафиксированные как можно быстрее после взятия способом, который идентичен способу обработки образцов пациента. С использованием таких образцов должны контролироваться все этапы процедуры, от подготовки образца до окрашивания. Использование образцов, зафиксированных или обработанных не как образцы пациента, обеспечивает соответствующий контроль только правильности функционирования реактивов и прибора. Образец со слабо положительным окрашиванием более пригоден для оптимального контроля качества и обнаружения незначительной степени ухудшения качества реактива, чем образец с более выраженным положительным окрашиванием. Если в какой-либо партии препаратов не наблюдается положительного окрашивания заведомо положительных структур тканей, результаты окрашивания данной партии исследуемых образцов следует считать недостоверными.

**Отрицательный контроль образца**

Отрицательный контроль образца должен проводиться при каждой процедуре окрашивания. Он проводится с целью выявления непредусмотренной перекрестной реактивности зонда и антител с клеточными компонентами. Образец, используемый для положительного контроля, может также использоваться для отрицательного контроля. Различные типы клеток, присутствующие в большинстве образцов, обеспечивают внутренний отрицательный контроль, что, однако, должно быть подтверждено пользователем. Неокрашиваемые компоненты должны демонстрировать отсутствие специфического окрашивания и служить индикаторами фонового окрашивания. Если наблюдается неприемлемое окрашивание участков отрицательного контроля образца, результаты, полученные на исследуемых образцах пациента, признаются недействительными.

**Реактив положительного контроля**

Реактив положительного контроля должен использоваться в ходе верификации метода определения и при устранении проблем, так как доступность ДНК и РНК может различаться в зависимости от метода фиксации образца и его предварительной обработки.

**Реактив отрицательного контроля**

Реактив отрицательного контроля должен использоваться вместо зонда ISH для гибридизации in situ для каждого окрашенного образца, чтобы облегчить интерпретацию каждого результата окрашивания образцов пациента. Это обеспечивает индикацию неспецифического фонового окрашивания для каждого стекла. Вместо зонда ISH окрасьте предметное стекло при помощи VENTANA ISH Negative Control или Negative Control Probe. Период инкубации контролей должен быть таким же, как и период инкубации зонда.



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

Отрицательный контроль особенно важен в свете того факта, что кишечную форму щелочной фосфатазы можно обнаружить не только в клетках щеточной каемки кишечного эпителия. Кроме того, в ходе фиксации образца могут быть сохранены ферменты, вызывающие уменьшение окрашивания нитросиним тетразолием.

**Необъяснимые расхождения**

В случае получения необъяснимых расхождений в результатах окрашивания контрольных образцов следует немедленно обратиться к региональному представителю службы поддержки. Если результаты контроля качества не соответствуют спецификациям, результаты, полученные на образцах пациента, следует считать недействительными. См. раздел "Проблемы и их устранение" в данном вкладыше. Идентифицируйте и устраните причину несоответствия, а затем повторите исследование образцов, взятых у пациента.

**Верификация диагностической системы**

Перед первым использованием реактива в диагностической процедуре, специфичность реактива должна быть верифицирована испытанием на серии положительных и отрицательных образцов с установленными характеристиками эффективности гибридизации in situ (см. изложенные выше процедуры контроля качества и рекомендации по контролю качества College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,[4] и NCCLS Approved Guideline[5]). Процедуры контроля качества следует выполнять для каждой новой партии реактивов и при изменении параметров анализа.

### Интерпретация результатов

Процедура окрашивания стекол на автоматическом иммуногистостейнере VENTANA приводит к осаждению продукта реакции синего цвета на целевых участках ДНК или РНК, локализованных с помощью меченого зонда. Перед интерпретацией результатов квалифицированный патоморфолог, имеющий опыт проведения процедур ISH, должен оценить положительный и отрицательный контроли.

**Контроли**

В первую очередь необходимо оценить окрашенный положительный контроль, чтобы подтвердить, что все реактивы функционируют должным образом. Появление синего окрашивания в целевых клетках свидетельствует о наличии положительной реактивности.

Отрицательный контроль должен исследоваться после положительного контроля для проверки специфичности реакции. Специфическое окрашивание при отрицательном контроле должно отсутствовать. Если окрашивание произошло, то это может свидетельствовать о неспецифичной перекрестной реактивности к клеткам или клеточным компонентам. Для интерпретации окрашивания следует оценивать неповрежденные клетки, поскольку некротические и дегенеративные клетки часто окрашиваются неспецифически.

Если положительные или отрицательные контроли не демонстрируют соответствующего окрашивания, любые результаты, полученные на исследуемых образцах, признаются недействительными.

**Образец ткани пациента**

Препараты пациента оцениваются в последнюю очередь. При оценке интенсивности специфического окрашивания следует учитывать интенсивность фоновой окраски препарата, обработанного реактивом отрицательного контроля. Отрицательный результат означает, что целевая последовательность ДНК или РНК в исследуемых клетках не была обнаружена, а не то, что целевая последовательность в исследованных клетках отсутствует. При интерпретации любых результатов ISH морфология каждого образца также оценивается после окрашивания срезов гематоксилином и эозином. Выявленные морфологические изменения и связанные с ними клинические данные должны интерпретироваться квалифицированным патоморфологом.

## ОГРАНИЧЕНИЯ

### Общие ограничения

1. На результаты окрашивания влияют методы хранения и обработки ткани перед окрашиванием. Неправильное проведение процесса фиксации, замораживания, оттаивания, промывки, сушки, нагрева, получения срезов или загрязнение другими тканями или жидкостями может привести к артефактам, захвату антител или ложноотрицательным результатам. Расхождения в результатах могут возникать из-за непостоянства процедур фиксации и заливки, а также из-за дефектов врожденных ткани.
2. Как избыточное, так и недостаточное контр-окрашивание может скомпрометировать интерпретацию результатов.
3. Вследствие разброса условий обработки образцов может оказаться необходимым увеличить или уменьшить время обработки ISH протеазой, а для отдельных образцов использовать иную ISH протеазу. Подобные действия могут проводиться только после оценки пользователем. Пользователи, допускающие отклонения от рекомендуемых методик проведения исследования, несут ответственность за интерпретацию результатов, полученных на образцах ткани пациента.
4. Реактивы могут вступать в неожиданные реакции в тканях, впервые подвергающихся анализу. Возможность неожиданных реакций даже в анализированных групп тканей нельзя полностью исключить из-за биологической вариабельности тканей. Документированные случаи неожиданных реакций следует доводить до сведения регионального представителя службы поддержки.

### Особые ограничения

1. Фиксатор Bouin's продемонстрировал несовместимость с зондами ISH. В фиксировавшихся при помощи Bouin's образцах не удалось обнаружить единичных копий гена.
2. Для данного анализа не рекомендуется использовать фиксатор ФУС.
3. Окрашивание после фиксации цинк-формалином не продемонстрировало такое же качество, как после фиксации нейтральным забуференным раствором формалина 10 %.
4. При использовании меченых флуоресцеином зондов и диагностического набора ISH *i*VIEW$_{Blue}$ Detection Kit возможно окрашивание ядер и/или цитоплазмы эпителиальных клеток тканей ЖКТ. Для обнаружения этого окрашивания воспользуйтесь зондом Negative Control Probe.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. VENTANA Использование INFORM Cytoplasmic Lambda mRNA Probe, ISH *i*VIEW$_{Blue}$ Detection Kit и дополнительных реактивов с автоматическим иммуногистостейнером VENTANA приводит к появлению синего осадка на участках целевых последовательностей, локализованных с помощью зонда ISH.
2. Чувствительность и специфичность определения целевой последовательности оптимизирована и проверена компанией Ventana. Тем не менее, для обеспечения получения желаемого окрашивания каждый зонд ISH должен быть валидирован пользователем.
3. Воспроизводимость результатов окрашивания в пределах цикла использования диагностического набора ISH *i*VIEW$_{Blue}$ Detection Kit определялась окрашиванием при помощи зонда INFORM Cytoplasmic Lambda mRNA Probe на автоматических иммуногистостейнерах BenchMark. Была получена сравнимая интенсивность окрашивания всех образцов. Пользователи должны убедиться в воспроизводимости результатов в одном исследовании (в пределах одного цикла) путем окрашивания нескольких наборов серийных срезов с низким, средним и высоким содержанием целевых последовательностей в одном и том же цикле.
4. Воспроизводимость результатов окрашивания между циклами использования набора диагностического ISH *i*VIEW$_{Blue}$ Detection Kit определялась окрашиванием срезов тканей при помощи зонда INFORM Cytoplasmic Lambda mRNA Probe на различных приборах. Была получена сравнимая интенсивность окрашивания всех образцов. Пользователи должны убедиться в воспроизводимости результатов от цикла к циклу путем окрашивания нескольких наборов серийных образцов срезов с низким, средним и высоким содержанием целевых последовательностей в разные дни.



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

## ПРОБЛЕМЫ И ИХ УСТРАНЕНИЕ

| Проблема | Решение |
|---|---|
| Отрицательный результат положительного контроля | Убедитесь, что на предметном стекле имеется этикетка с правильным штрих-кодом |
| Ткани смываются с предметных стекол | Убедитесь, что используются положительно заряженные предметные стекла |

## ССЫЛКИ


1. Pringle JH, Ruprai AK, Primrose L, Keyte J, Potter L, Close P, Lauder I, In situ hybridization of immunoglobulin light chain mRNA in paraffin sections using biotinylated or hapten-labelled oligonucleotide probes. J. Pathol. 162(3): 197-207, 1990.
2. Beck RC, Tubbs RR, Hussein M, Pettay J, Hsi ED. Automated Colorimetric In Situ Hybridization (CISH): Detection of immunoglobulin (Ig) light chain mRNA expression in plasma cell (PC) dyscrosias and non-Hodgkin's lymphoma. Diagn. Mol. Pathol. 12: 14-20, 2003.
3. Euscher E, Nuovo GJ. Detection of kappa- and lambda- expressing cells in the endometrium by in situ hybridization. Int. J. Gynecol Pathol. 21: 383-390, 2002.
4. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2001.
5. NCCLS. Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline. NCCLS document MM4-A- (ISBN 1-56238-396-5). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 1999.
6. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.


## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ


INFORM, VENTANA, BENCHMARK, *ultra*View, и логотип VENTANA являются торговыми марками Roche.

Все другие товарные знаки являются собственностью их законных владельцев.

Компания Ventana Medical Systems, Inc. предоставляет покупателю разовую лицензию в соответствии с патентами США № 6045759, 6945128 и 7378058 и в соответствии с аналогичными патентами, выданными в других странах.

© 2012 Ventana Medical Systems, Inc.


## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ


Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

www.ventana.com

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.


CE




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

# INFORM HPV III Family 16 Probe (B)

REF 800-4295

05278856001

IVD Σ 50

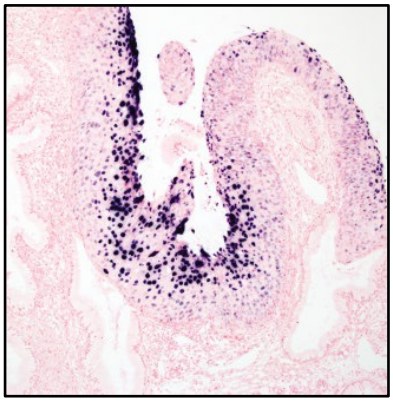


Figure 1. Cervical tissue stained with the INFORM HPV III Family 16 Probe and ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus Detection Kit. Magnification 10x.

## INTENDED USE

Ventana Medical Systems' (Ventana) INFORM HPV III Family 16 Probe (B) is to be used in conjunction with the ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus Detection Kit and other accessory reagents to stain neutral buffered formalin fixed, paraffin embedded tissue sections on the VENTANA BenchMark IHC/ISH instruments. Light microscopy is used to detect the staining reaction. Positive results aid in the classification of normal and abnormal specimens, and serve as an adjunct to conventional histopathology tests. The clinical interpretation of any staining, or the absence of staining, must be complemented by morphological studies and evaluation of proper controls. Evaluation must be made by a qualified pathologist within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests.

This product is intended for *in vitro* diagnostic (IVD) use.

## SUMMARY AND EXPLANATION

INFORM HPV III Family 16 Probe (B) contains a cocktail of labeled human papillomavirus (HPV) genomic probes.[1] The intended targets are the common HPV genotypes found to be associated with cervical cancer. The probe cocktail has demonstrated positive hybridization to the following genotypes: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 56, 58, and 66.

Cervical cancer is the second most common cancer of women worldwide, with an estimated 529,000 new cases and 275,000 deaths globally per year.[2,3]

HPV is a double stranded DNA virus with more than 200 different genotypes containing approximately 7,900 base pairs.[4] The life cycle of HPV is tied directly to keratinocyte differentiation. One key event in the viral life cycle is the differentiation dependent escalation in viral replication. The increase in replication activity results in an amplification of the HPV genome from approximately 50 copies per cell, in basal keratinocytes during the sub clinical infection stage, to thousands of copies of viral genomes per cell in suprabasal keratinocytes during the clinical infection phase.[5] Infection of the cervical epithelium by HPV has been established as an initiating factor in the oncogenic process leading toward the development of cervical cancer.[6]

The risk of disease progression from dysplasia to cervical cancer is dependent on the HPV types. Therefore, HPV types have been grouped into different oncogenic risk groups. These groups are associated with the level of threat that a patient may develop cancer. For example, the high-risk group, HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 and 82, has been recognized as tumor producing, whereas low-risk group, HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, and 81, has little chance of progressing to malignant disease.[7,8] Identification of HPV risk group by slide-based *in situ* hybridization (ISH) testing in combination with conventional morphologic slide evaluation may enhance clinical decisions.[9]

Slide based ISH is an easy to perform, reliable and reproducible method for detecting HPV on paraffin embedded tissue sections.[10] The detection level of both radioisotopic and nonisotopic labels using genomic probes appears to be as low as 10 to 50 viral copies per cell when using formalin fixed tissue samples.[11,12]

The ISH system offers several advantages over other methods that require destruction of the target cells, for example nucleic acid capture techniques or polymerase chain reaction (PCR). The advantages may include: direct correlation with the cytologic findings; the ability to test archival specimens; and the ability to identify the HPV ISH result in the context of tissue morphology.

## PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

INFORM HPV III Family 16 Probe (B) is formulated for use with ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus Detection Kit and accessory reagents on the BenchMark XT IHC/ISH instrument.

The ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus Detection Kit detects specific DNP labeled probes and antibodies bound to a target sequence or antigen in paraffin-embedded tissue sections. The labeled probe or antibody is located by an anti-DNP antibody, then by an enzyme-labeled secondary antibody or a biotin-conjugated secondary antibody. This step is followed by the addition of a Streptavidin-AP (alkaline phosphatase) enzyme conjugate which binds to the biotin present on the secondary antibody. The complex is then visualized with 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and nitro blue tetrazolium (NBT) chromogen, which produces a blue precipitate that is readily detected by light microscopy. Figure 2 illustrates the Blue ISH reaction.

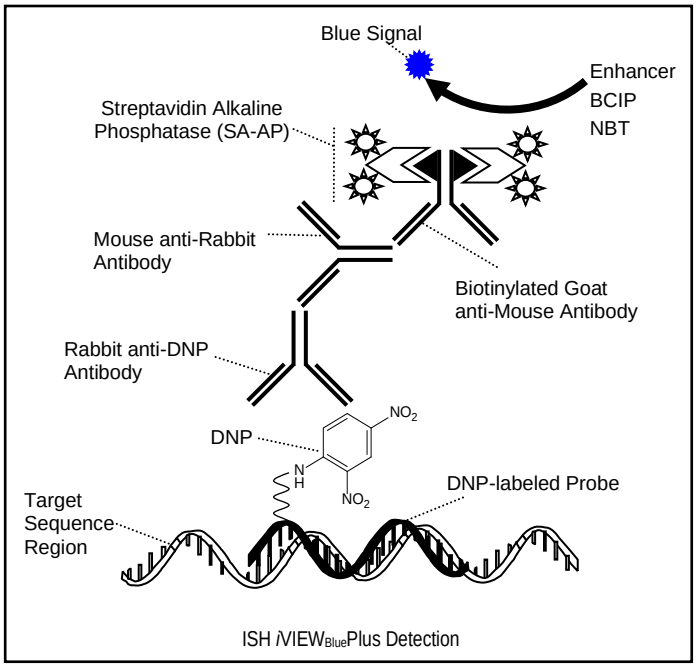



Figure 2. ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus Detection Reaction

## MATERIALS AND METHODS

### Reagent Provided

INFORM HPV III Family 16 Probe (B) contains sufficient reagent for 50 tests.

One 10 mL dispenser of INFORM HPV III Family 16 Probe (B) contains approximately 3.4 µg/mL of the probe cocktail labeled with DNP and human placental blocking DNA in a formamide based hybridization buffer.

Refer to the appropriate VENTANA detection kit package insert for detailed descriptions of: (1) Principles of the Procedure, (2) Materials and Reagents Needed but Not Provided, (3) Specimen Collection and Preparation for Analysis, (4) Quality Control Procedures, (5) Troubleshooting, (6) Interpretation of Results, and (7) General Limitations.

### Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration

No reconstitution, mixing, dilution, or titration is required. Further dilution may result in loss of staining specificity. The user must validate any such changes.

## MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Staining reagents, such as VENTANA detection kits and ancillary components, are not provided.



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

The following reagents and materials may be required but are not provided with the kit:

1. VENTANA HPV System Control Slides
2. VENTANA Alu Positive Control Probe II
3. VENTANA ISH Negative Control
4. VENTANA ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus Detection Kit
5. VENTANA ISH Protease 1, 2 or 3*
6. VENTANA Red Counterstain II
7. VENTANA Reaction Buffer (10X)
8. VENTANA SSC (10X)
9. VENTANA EZ Prep (10X)
10. VENTANA Cell Conditioning 2 (Pre-dilute)
11. VENTANA Liquid Coverslip (High Temperature)
12. BenchMark XT IHC/ISH instrument
13. Bar code labels (appropriate labels for control and probe being tested)
14. 10% neutral buffer formalin
15. Microtome
16. Microscope slides, appropriate for ISH
17. Positive and negative control slides
18. Xylene, histological grade
19. Ethanol or reagent alcohol, histological grade
20. Acetone
21. Deionized or distilled water
22. Mounting medium and cover glass or automated cover slipper
23. Staining jars or baths
24. Timer
25. Light microscope

* As needed for specific applications.

Not all products listed in the package insert may be available in all geographies. Consult your local support representative.

## STORAGE

Upon receipt and when not in use, store at 2-8°C. Do not freeze. The user must validate any storage conditions other than those specified in the package insert.

To ensure proper reagent delivery and stability of the probe after every run, replace the dispenser cap after every use and immediately place the dispenser in the refrigerator in an upright position.

Every dispenser is expiration dated. When properly stored, the reagent is stable to the date indicated on the label. Do not use reagent beyond the expiration date for the prescribed storage method.

There are no definitive signs to indicate instability of this product; therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with unknown specimens. Your local Roche office should be contacted immediately if there is an indication of reagent instability.

## SPECIMEN PREPARATION

Routinely processed, formalin fixed, paraffin embedded tissues are suitable for this reagent. Tissue sections should be cut to the appropriate thickness for the proper staining.

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. For *in vitro* diagnostic (IVD) use.
2. For professional use only.
3. Clinical sensitivity of the assay must be validated in the user laboratory.
4. Warning, Product Contains Formamide. Formamide is toxic by inhalation and moderately toxic by ingestion. It is an irritant to skin, eyes, and mucous membranes and is absorbed through the skin. It may cause harm to the unborn child. Take precautions when handling reagents. Use disposable gloves and wear suitable protective clothing when handling suspected carcinogens or toxic materials
5. Ensure that the waste container is empty prior to starting a run on the instrument. If this precaution is not taken, the waste container may overflow and the user risks a slip and fall.
6. Materials of human or animal origin should be handled as potentially biohazardous and disposed of with proper precautions.
7. Avoid contact of reagents with eyes and mucous membranes. If reagents come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.
8. Avoid microbial contamination of reagents, as this could produce incorrect results.
9. The reagents have been optimally diluted, and further dilution may result in loss of target staining. The user must validate any such change.
10. Consult local or state authorities with regard to recommended method of disposal.
11. For supplementary safety information, refer to the product Safety Data Sheet and the Symbol and Hazard Guide located at www.ventana.com.

## INSTRUCTIONS FOR USE

### Post-run Slide Processing

After the run is complete, please follow the following steps for proper dehydration of stained slides. (Proper dehydration will help ensure optimal signal visualization).

Dehydration Procedure

1. To remove coverslip solution, wash the slides in 2 sequential solutions of a mild dishwashing detergent (do not use detergent designed for automatic dishwashers).
2. Rinse slides well with distilled water, about 1 minute. Shake off excess water.
3. Transfer the slides to an 80% ethanol bath for approximately 1 minute.
4. Transfer the slides to a 90% ethanol bath for approximately 1 minute.
5. Transfer the slides to a 100% ethanol bath for approximately 1 minute.
6. Transfer the slides into a second bath of 100% ethanol for approximately 1 minute.
7. Dip slides 10 times into 100% acetone (one time use only, replace acetone after each staining run). Do not leave slides in acetone.
8. Transfer the slides into the first xylene bath for approximately 30 seconds.
9. Transfer the slides into a second xylene bath for approximately 30 seconds.
10. Place coverslip on slide.

Note: To ensure complete dehydration, ethanol baths need to be changed frequently and a third 100% ethanol bath may be added.

## QUALITY CONTROL PROCEDURES

### Positive Specimen Control

A positive specimen control (system level control) must be run with every staining run performed. The system level control is used to confirm that the probe was applied and the instrument functioned properly. This specimen should contain both positive and negative staining cells or tissue components. Control specimens should be biopsy or surgical specimens prepared or fixed in a manner identical to patient specimens. Such controls should monitor all steps of the procedure, from specimen preparation through staining. Use of a specimen fixed or processed in the same manner as the patient specimen provides an appropriate control to confirm that the reagents and instrument functioned properly. A specimen with weak positive staining (i.e. demonstrating a punctate staining pattern) may require microscopic examination at magnifications as high as 20x or 40x is recommended for optimal quality control and for detecting minor levels of reagent degradation. If the positive control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

### Negative Specimen Control

A negative specimen control must be run with every staining procedure performed. The purpose is to monitor unintended probe and antibody cross reactivity to cellular components. The same specimen used for the positive specimen control may also be used as the negative specimen control. The variety of different cell types present in most specimens offers internal negative control sites, but this should be verified by the user. The non-staining components should demonstrate absence of specific staining and provide an indication of background staining. If unacceptable staining occurs in the negative specimen control sites, result with the patient specimens should be considered invalid.

### Positive Reagent Control

Positive reagent control should be run during assay verification and troubleshooting since DNA accessibility may vary depending on fixation method and pretreatment of the specimen. Ventana Alu Positive Control Probe II can be used as a positive control for this assay.

### Negative Reagent Control

A negative reagent control must be substituted for the ISH probe with every specimen stained to aid in interpretation of each patient result. This provides an indication of nonspecific background staining for each slide. In place of the ISH probe, stain the slide



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

with Ventana ISH Negative Control. The incubation period for controls should correspond to that of the probe.

The negative control is especially important with the finding that the intestinal form of alkaline phosphatase may be found in cells other than the brush border of intestinal epithelial cells. Additionally, enzymes capable of reducing nitro blue tetrazolium may be preserved during fixation.

### Unexplained Discrepancies

Unexplained discrepancies in controls should be referred to your local support representative immediately. If quality control results do not meet specifications, patient results are invalid. See the Troubleshooting section of this insert. Identify and correct the problem, then repeat the patient samples.

### Assay Verification

Prior to initial use of a reagent in a diagnostic procedure, the performance of the reagent should be verified by testing it on a series of specimens with known ISH performance characteristics. These quality control assessments should be repeated for each new lot of reagents, or whenever there is a change in assay parameters.

## INTERPRETATION OF RESULTS

A qualified pathologist experienced in the microscopic interpretation of anatomic pathology specimens, ISH procedures and the recognition of *in situ* hybridization results (which require microscopic examination using 20x, 40x, and/or 60x objectives) must evaluate controls before interpreting results.[13] The presence of a blue reaction product in cervical epithelial nuclei in either a homogeneous or punctate staining pattern is indicative of positive reactivity. The homogeneous pattern appears as a large, uniform, globular dark blue precipitate within the epithelial cell nucleus. It is generally prominent in the superficial keratinized region of the epithelium often within koilocytotic cells. The punctate pattern is a discreet, stippled dark blue nuclear pattern. It is more often present in groups of cells in a more basal location within the epithelium. In some cases, the punctuate pattern may require high magnification (40x objective) to visualize.

It is imperative that only epithelial cell nuclear staining be considered positive if a false positive interpretation is to be avoided. Non-cellular stromal precipitates and cytoplasmic staining of neutrophils and plasma cells represent artifactual nonspecific staining.

The morphology of each sample should also be examined utilizing an H&E stained section when interpreting any ISH result. The patient's morphologic findings and pertinent clinical data must be interpreted together with the ISH results.

Note: Use of 100x objective is not recommended. All of the design verification and validation testing was performed using 20x, 40x, and/or 60x objectives.

### Controls

The stained positive reagent and specimen controls should be examined first to ascertain that all reagents are functioning properly. The presence of a discrete, blue colored, precipitated reaction product within the target cell nuclei is indicative of positive reactivity.

The negative reagent and specimen controls should be examined after the positive control to verify the specificity of the reaction. There should be no specific staining in the negative control. If staining occurs, it may indicate nonspecific cross reactivity to cells or cellular components. Intact cells should be used for interpretation of staining results since necrotic or degenerated cells often stain nonspecifically.

If the positive or negative controls fail to demonstrate appropriate staining, any results with the test specimens should be considered invalid.

### Patient Specimen

Patient specimens should be examined last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any background staining of the negative reagent control. A negative result means that the DNA sequence in question was not detected, not necessarily that the sequence is absent in the cells assayed. The morphology of each sample should also be examined utilizing a hematoxylin and eosin stained section when interpreting any ISH result. The patient's morphologic findings and pertinent clinical data must be interpreted by a qualified pathologist.

## LIMITATIONS

1. ISH is a multiple step diagnostic process that requires specialized training in the selection of the appropriate reagents, specimen selection, processing, preparation of the ISH slide, and interpretation of the results.
2. Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning, or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, false positive or false negative results.
3. Inconsistent results may result from variations in fixation and embedding methods, or from inherent irregularities within the tissue.
4. Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.
5. The clinical interpretation of any positive staining, or its absence, must be evaluated within the context of clinical history and morphology, and must be complemented by proper controls and other diagnostic tests. It is the responsibility of a qualified pathologist to be familiar with the probes, reagents and methods used to produce the stained preparation. Staining must be performed under the supervision of a pathologist who is responsible for reviewing the stained slides and assuring the adequacy of positive and negative controls.
6. Reagents may demonstrate unexpected reactions in previously untested specimens. The possibility of unexpected reactions even in tested specimen groups cannot be completely eliminated due to biological variability of targeted sequence in biological specimens. Contact your local Ventana office with documented unexpected reactions.
7. Due to variation in specimen processing it may be necessary to increase or decrease the ISH protease treatment time on individual specimens. Such changes must be validated by the user.

## SUMMARY OF EXPECTED RESULTS

1. Ventana INFORM HPV III Family 16 Probe (B), ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus Detection Kit, and accessory reagents in conjunction with a BenchMark IHC/ISH instrument will result in blue precipitate at the target sequence sites as located by the ISH probes.
2. Specificity and sensitivity of target sequence detection has been optimized and tested by Ventana. The probe cocktail has demonstrated positive hybridization to the following HPV genotypes: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 56, 58, and 66 in cervical biopsy specimens. Both homogeneous and punctate (as observed in HeLa cells, 10-50 viral copies[15]) HPV staining patterns can be detected.
3. Intra run and Inter run reproducibility of staining with INFORM HPV III Family 16 Probe (B) was determined by staining 60 multiblock slides (consisting of sections prepared from formalin-fixed paraffin embedded CaSki, HeLa and T24 cell lines). Slides were stained on 2 different BenchMark and 2 different BenchMark XT IHC/ISH instruments, 3 runs per instrument. All slides stained with comparable intensity. Users should verify intra run (within run) reproducibility results by staining several sets of serial sections with low, medium, and high target sequences in a single run.

## TROUBLESHOOTING

1. If the positive control is negative, it should be checked to ensure that the slide has the proper bar code label.
2. If the positive control is negative or exhibits weaker staining than expected, an additional positive controls (e.g. positive tissue controls on the patient specimen slide) stained on the same staining run should be checked to determine if the failure is due to the control slide or reagents used. Specimens that have been improperly collected, fixed, stored, or deparaffinized may not exhibit appropriate staining.
3. If the specimen is washed off the slide, slides should be checked to ensure that they are positively charged.
4. If the slides demonstrate whiskering artifact from the detection chemistry, dehydration process is not complete. Refer to the Dehydration Procedure section.
5. If nonspecific staining of the glass or nonspecific staining of areas of the tissue (particularly areas other than the squamous epithelium) are observed, an additional section of the patient specimen should be stained.
6. For corrective actions, refer to the Step By Step Procedure section in the BenchMark IHC/ISH Instrument Operator's Manual or contact your local Roche office.

## REFERENCES


1. HPV Sequence Database (http://www.stdgen.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/).
2. WHO/ICO HPV Information Center. Human Papilloma Virus and Related Cancers. Summary Report Update. November 15, 2010. p8. http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/country_pdf/XWX.pdf?CFID=5730279&CFTOKEN=65827281.
3. HPV Information Centre. http://www.hpvcentre.net/aboutus.php





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

4. Clinical Microbiology and Infection © 2015 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved, CMI, 21, 808-816.
5. Birner P, Schindl M, Stani J, Oberhuber G, Czerwenka K, Vutuc C, Breitenecker G. Hybrid capture based human papillomavirus typing in cervical screening compared to cytology and histology. Wien Klin Wochenschr. 2000;112(17):761-766.
6. Nindl I, Greinke C, Zahm DM, Stockfleth E, Hoyer H, Schneider A. Human papillomavirus distribution in cervical tissues of different morphology as determined by hybrid capture assay and PCR. Int J Gynecol Pathol. 1997;16(3):197-204.
7. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. Virology. 2009;384(2):260-265.
8. Munoz N, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus type associated with cervical cancer. N Engl J Med. 2003;348(6):518-527.
9. Delvenne P, Fontaine MA, Delvenne C, Nikkels A, Boniver J. Detection of human papillomaviruses in paraffin-embedded biopsies of cervical intraepithelial lesions: analysis by immunohistochemistry, in situ hybridization, and the polymerase chain reaction. Mod Pathol. 1994;7(1):113-119.
10. Zehbe I, Hacker GW, Su H, Hauser-Kronberger C, Hainfeld JF, Tubbs R. Sensitive in situ hybridization with catalyzed reporter deposition, streptavidin-Nanogold and silver acetate autometallography: detection of single-copy human papillomavirus. Am J Pathol. 1997;150(5):1553-1561.
11. Zehbe I, Rylander E, Strand, A, Wilander E. Use of Probemix and OmniProbe biotinylated cDNA probes for detecting HPV infection in biopsy specimens from the genital tract. J Clin Pathol. 1993;46(5):437-440.
12. Unger, ER. In situ diagnosis of human papillomaviruses. Clin Lab Med. 2000;20(2):289-301.
13. Evans MF, Aliesky HA, Cooper K. Optimization of biotinyl-tyramide-based in situ hybridization for sensitive background-free applications on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. BMC Clin Pathol. 2003;3(1):2.

## INTELLECTUAL PROPERTY

VENTANA, BENCHMARK and INFORM are registered trademarks of Roche.

All other trademarks are the property of their respective owners.

© 2017 Ventana Medical Systems, Inc.

## CONTACT INFORMATION

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.

www.ventana.com



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

# INFORM HPV III Family 16 Probe (B)

REF 800-4295

05278856001

IVD Σ 50

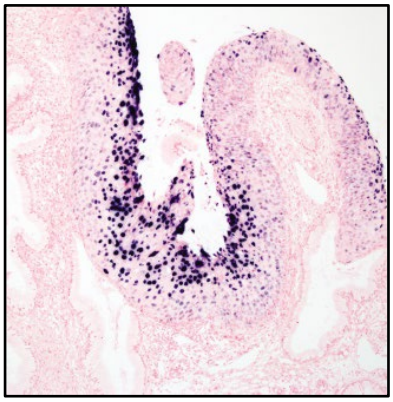


Figure 1. Cervical tissue stained with the INFORM HPV III Family 16 Probe and ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus Detection Kit. Magnification 10x.

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Ventana Medical Systems ' (Ventana) INFORM Зонд HPV III Family 16 (B) должен использоваться вместе с ISH Комплект обнаружения iVIEW Blue Plus и другие вспомогательные реагенты для окрашивания срезов тканей, фиксированных в нейтральном буферном растворе формалина и залитых парафином, на приборах VENTANA BenchMark IHC / ISH. Световая микроскопия используется для обнаружения реакции окрашивания. Положительные результаты помогают в классификации нормальных и аномальных образцов и служат дополнением к обычным гистопатологическим тестам. Клиническая интерпретация любого окрашивания или отсутствия окрашивания должна дополняться морфологическими исследованиями и оценкой надлежащих контролей. Оценка должна производиться квалифицированным патологом в контексте истории болезни пациента и других диагностических тестов.

Этот продукт предназначен для диагностики in vitro (IVD).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

INFORM HPV III Family 16 Probe (B) содержит смесь меченых геномных зондов вируса папилломы человека (HPV ).1 Предполагаемыми мишенями являются общие генотипы HPV, которые, как было установлено, связаны с раком шейки матки. Комбинация зондов продемонстрировала положительную гибридизацию со следующими генотипами: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 56, 58 и 66.

Рак шейки матки является вторым по распространенности раком у женщин во всем мире: ежегодно во всем мире регистрируется 529 000 новых случаев заболевания и 275 000 смертей2,3.

ВПЧ - это двухцепочечный ДНК-вирус с более чем 200 различными генотипами, содержащими примерно 7900 пар оснований4. Жизненный цикл ВПЧ напрямую связан с дифференцировкой кератиноцитов. Одним из ключевых событий в жизненном цикле вируса является зависимое от дифференциации усиление репликации вируса. Повышение репликационной активности приводит к амплификации генома ВПЧ примерно с 50 копий на клетку в базальных кератиноцитах на стадии субклинической инфекции до тысяч копий вирусных геномов на клетку в супрабазальных кератиноцитах во время фазы клинической инфекции5. эпителия шейки матки вирусом папилломы человека считается инициирующим фактором онкогенного процесса, ведущего к развитию рака шейки матки.

Риск прогрессирования заболевания от дисплазии до рака шейки матки зависит от типов ВПЧ. Таким образом, типы ВПЧ были сгруппированы в разные группы онкогенного риска. Эти группы связаны с уровнем угрозы того, что у пациента может развиться рак. Например, группа высокого риска, HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 и 82, признана производящей опухоль, тогда как Группа низкого риска, HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 и 81, имеет мало шансов на прогрессирование до злокачественного заболевания.7,8 Идентификация группы риска HPV с помощью слайд-шоу Тестирование гибридизации in situ (ISH) в сочетании с обычной морфологической оценкой слайдов может улучшить клинические решения.

ISH на основе слайдов - это простой в исполнении, надежный и воспроизводимый метод обнаружения ВПЧ на срезах ткани, залитых парафином.10 Уровень обнаружения как радиоизотопных, так и неизотопных меток с использованием геномных зондов составляет всего от 10 до 50 вирусных копий на клетку при использовании фиксированные формалином образцы тканей.11,12

Система ISH предлагает несколько преимуществ по сравнению с другими методами, которые требуют разрушения клеток-мишеней, например методами захвата нуклеиновых кислот или полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Преимущества могут включать: прямую корреляцию с цитологическими данными; возможность тестирования архивных образцов; и способность идентифицировать результат ISH HPV в контексте морфологии ткани.

## ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

INFORM HPV III Family 16 Probe (B) разработан для использования с ISH iVIEW Blue Plus Набор для обнаружения и дополнительные реагенты на приборе BenchMark XT IHC / ISH. Набор для обнаружения ISH iVIEW Blue Plus обнаруживает специфические меченные DNP зонды и антитела связаны с целевой последовательностью или антигеном в залитых парафином тканевых срезах. Меченый зонд или антитело локализуется с помощью антитела против ДНП, затем с помощью меченного ферментом вторичного антитела или вторичного антитела, конъюгированного с биотином. За этим этапом следует добавление ферментного конъюгата стрептавидин-АР (щелочная фосфатаза), который связывается с биотином, присутствующим на вторичном антителе. Затем комплекс визуализируется с помощью хромогена 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата (BCIP) и нитросинего тетразолия (NBT), что дает синий осадок, который легко обнаруживается с помощью световой микроскопии. Рисунок 2 иллюстрирует реакцию Blue ISH.

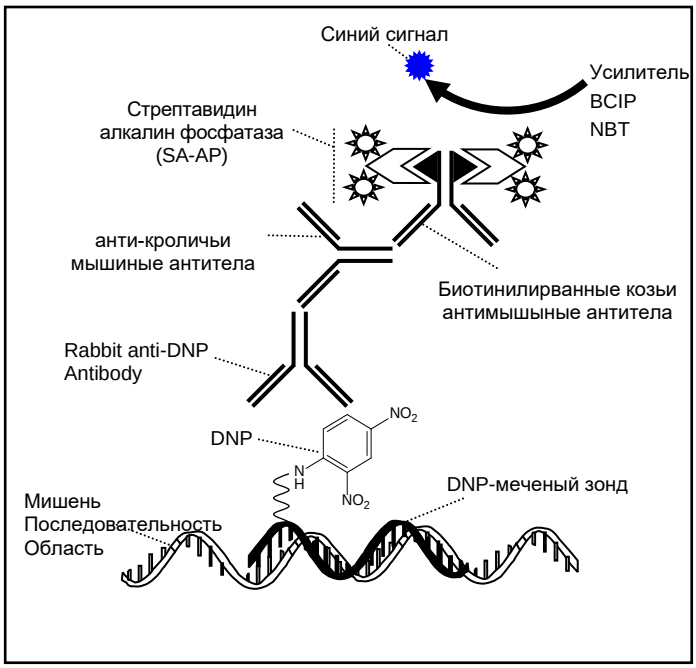



Figure 2. Реакция обнаружения ISH *i*VIEW $_{Blue}$ Plus

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Реагенты, входящие в комплект

INFORM HPV III Family 16 Probe (B) содержит реагент, достаточный для 50 тестов.

Один дозатор на 10 мл зонда INFORM HPV III Family 16 (B) содержит приблизительно 3,4 мкг / мл смеси зондов, меченных DNP и ДНК, блокирующей плаценту человека, в буфере для гибридизации на основе формамида.

Обратитесь к вкладышу соответствующего набора для обнаружения VENTANA для получения подробных описаний: (1) принципов процедуры, (2) материалов и реагентов, необходимых, но не поставляемых, (3) сбора образцов и подготовки к анализу, (4) процедур контроля качества, (5) Устранение неисправностей, (6) Интерпретация результатов и (7) Общие ограничения.

### Восстановление, смешивание, разбавление, титрование

Восстановление, смешивание, разбавление или титрование не требуется. Дальнейшее разбавление может привести к потере специфичности окрашивания. Пользователь должен подтвердить любые такие изменения.

## НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ МАТЕРИАЛЫ

Окрашивающие реагенты, такие как наборы для обнаружения VENTANA и вспомогательные компоненты, не предоставляются.



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

Могут потребоваться следующие реагенты и материалы, но они не входят в комплект:

1. VENTANA HPV System Control Slides
2. VENTANA Alu Positive Control Probe II
3. VENTANA ISH отрицательный контроль
4. VENTANA ISH iVIEW $_{Blue}$ Plus набор для определения
5. VENTANA ISH Фосфатаза 1, 2 or 3*
6. VENTANA Красный контраст II
7. VENTANAРеакционный буфер(10X)
8. VENTANA SSC (10X)
9. VENTANA EZ Prep (10X)
10. VENTANA Cell Conditioning 2 (предварительно разбавленный)
11. VENTANA жидкое покровное стекло (высокая температура)
12. BenchMark XT IHC/ISH инструмент
13. Наклейки со сштрих кодом (соответствующие этикетки для контроля и проверяемого зонда)
14. 10% нейтральный буфер формалин
15. ММикротом
16. Предметные стекла, подходящие для ISH
17. Слайды положительного и отрицательного контроля
18. Ксилен, гистологический класс
19. Этанол или спирт-реагент, гистологической чистоты
20. Ацетон
21. Деионизированная или дистилированная вода
22. Монтажная среда и покровное стекло или автоматическая покровная пленка
23. Окрашивающие банки или ванны
24. Таймер
25. Световой микроскоп

* По мере необходимости для конкретных приложений.

Не все продукты, перечисленные в листке-вкладыше, могут быть доступны во всех регионах. Проконсультируйтесь с вашим местным представителем службы поддержки.

## ХРАНЕНИЕ

После получения и неиспользования хранить при 2-8 ° C. Не замораживать. Пользователь должен проверить любые условия хранения, кроме тех, которые указаны во вкладыше к упаковке. Чтобы обеспечить надлежащую подачу реагента и стабильность зонда после каждого цикла, закрывайте крышку дозатора после каждого использования и сразу же помещайте дозатор в холодильник в вертикальном положении. Срок годности каждого диспенсера истек. При правильном хранении реагент стабилен до даты, указанной на этикетке. Не используйте реагент после истечения срока годности для предписанного метода хранения. Нет однозначных признаков, указывающих на нестабильность этого продукта; поэтому положительный и отрицательный контроли следует проводить одновременно с неизвестными образцами. Если есть признаки нестабильности реагента, следует немедленно связаться с вашим местным офисом компании «Рош».

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Для этого реагента подходят регулярно обработанные, фиксированные формалином, залитые в парафин ткани. Срезы ткани следует обрезать до необходимой толщины для надлежащего окрашивания.

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики in vitro (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. Клиническая чувствительность теста должна быть подтверждена в лаборатории пользователя.
4. Предупреждение, продукт содержит формамид. Формамид токсичен при вдыхании и умеренно токсичен при приеме внутрь. Он раздражает кожу, глаза и слизистые оболочки и впитывается через кожу. Это может нанести вред будущему ребенку. Соблюдайте меры предосторожности при обращении с реагентами. Используйте одноразовые перчатки и подходящую защитную одежду при работе с предполагаемыми канцерогенами или токсичными материалами.
5. Перед запуском цикла на приборе убедитесь, что контейнер для отходов пуст. Если не принять эту меру предосторожности, контейнер для отходов может переполниться, и пользователь может поскользнуться и упасть.
6. С материалами человеческого или животного происхождения следует обращаться как с потенциально биологически опасными и утилизировать с соблюдением надлежащих мер предосторожности.
7. Избегайте попадания реагентов в глаза и на слизистые оболочки. Если реагенты попали на чувствительные участки, промойте их большим количеством воды.
8. Избегайте микробного загрязнения реагентов, так как это может привести к неверным результатам.
9. Реагенты были оптимально разбавлены, и дальнейшее разбавление может привести к потере целевого окрашивания. Пользователь должен подтвердить любое такое изменение.
10. Проконсультируйтесь с местными или государственными властями относительно рекомендованного метода утилизации.
11. Дополнительную информацию о безопасности см. В Паспорте безопасности продукта и Руководстве по символам и опасностям на сайте www.ventana.com.

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

### Обработка слайдов после прогона

После завершения цикла выполните следующие шаги для надлежащего обезвоживания окрашенных слайдов. (Правильное обезвоживание поможет обеспечить оптимальную визуализацию сигнала).

**Дегидрационная процедура**

1. Чтобы удалить раствор покровного стекла, промойте предметные стекла двумя последовательными растворами мягкого моющего средства для мытья посуды (не используйте моющее средство, предназначенное для автоматических посудомоечных машин).
2. Хорошо промойте предметные стекла дистиллированной водой примерно в течение 1 минуты. Стряхните лишнюю воду.
3. Перенесите слайды в баню с 80% этанолом примерно на 1 минуту.
4. Перенесите слайды в баню с 90% этанолом примерно на 1 минуту.
5. Перенесите слайды в баню со 100% этанолом примерно на 1 минуту.
6. Перенесите слайды во вторую баню со 100% этанолом примерно на 1 минуту.
7. Окуните предметные стекла 10 раз в 100% ацетон (используйте только один раз, заменяйте ацетон после каждого цикла окрашивания). Не оставляйте слайды в ацетоне.
8. Перенесите слайды в первую ванну с ксилолом примерно на 30 секунд.
9. Перенесите слайды во вторую ванну с ксилолом примерно на 30 секунд.
10. Поместите покровное стекло на предметное стекло.

Примечание. Чтобы обеспечить полное обезвоживание, ванны с этанолом необходимо часто менять, и можно добавить третью ванну с 100% этанолом.

## ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

### Положительный контроль образцов

Положительный контроль образцов (контроль системного уровня) должен выполняться при каждом запуске окрашивания. Контроль системного уровня используется для подтверждения того, что зонд был применен и прибор работал правильно. Этот образец должен содержать как положительные, так и отрицательные окрашивающие клетки или компоненты ткани. Контрольные образцы должны представлять собой биопсийные или хирургические образцы, приготовленные или закрепленные так же, как образцы пациентов. Такой контроль должен контролировать все этапы процедуры, от подготовки образца до окрашивания. Использование образца, зафиксированного или обработанного таким же образом, как образец пациента, обеспечивает соответствующий контроль, подтверждающий правильность функционирования реагентов и инструмента. Образец со слабым положительным окрашиванием (т. Е. Демонстрирующий точечный рисунок окрашивания) может потребовать микроскопического исследования при увеличении до 20x или 40x, что рекомендуется для оптимального контроля качества и обнаружения незначительных уровней деградации реагентов. Если положительный контроль не показывает положительного окрашивания, результаты с тестируемыми образцами следует считать недействительными.

### Отрицательный контроль образцов

Отрицательный контроль образца должен выполняться при каждой выполненной процедуре окрашивания. Цель состоит в том, чтобы отслеживать непреднамеренную перекрестную реактивность зонда и антител с клеточными компонентами. Тот же образец, что использовался для положительного контроля образца, также может быть использован в качестве отрицательного контроля образца. Множество различных типов клеток, присутствующих в большинстве образцов, предлагает сайты внутреннего отрицательного контроля, но это должно быть подтверждено пользователем. Неокрашивающие компоненты должны демонстрировать отсутствие специфического окрашивания и указывать на фоновое окрашивание. Если на участках с отрицательными контрольными образцами возникает неприемлемое окрашивание, результаты с образцами пациентов следует считать недействительными.

### Положительный контроль реагентов

Положительный контроль реагентов следует проводить во время проверки анализа и устранения неполадок, поскольку доступность ДНК может варьироваться в зависимости от метода фиксации и предварительной обработки образца. Датчик положительного контроля Ventana Alu II можно использовать в качестве положительного контроля для этого анализа.

### Отрицательный контроль реагентов

Отрицательный контроль реагента необходимо заменить на зонд ISH с каждым окрашенным образцом, чтобы облегчить интерпретацию результатов каждого пациента. Это указывает на неспецифическое фоновое окрашивание каждого слайда. Вместо зонда ISH окрашивайте предметное стекло

с отрицательным контролем Ventana ISH. Инкубационный период контрольных образцов должен соответствовать периоду инкубации зонда.

Отрицательный контроль особенно важен при обнаружении того факта, что кишечная форма щелочной фосфатазы может быть обнаружена в клетках, отличных от щеточной каймы кишечных эпителиальных клеток. Кроме того, ферменты, способные восстанавливать нитросиний тетразолий, могут сохраняться во время фиксации.

### Необъяснимые расхождения

случае необъяснимых расхождений в элементах управления следует немедленно обращаться к местному представителю службы поддержки. Если результаты контроля качества не соответствуют спецификациям, результаты пациентов недействительны. См. Раздел «Устранение неисправностей» этой вставки.

Определите и устраните проблему, затем повторите взятие образцов пациента.

### Верификация анализа

Перед первоначальным использованием реагента в диагностической процедуре его эффективность следует проверить путем тестирования на серии образцов с известными рабочими характеристиками ISH. Эти оценки контроля качества следует повторять для каждой новой партии реагентов или при изменении параметров анализа.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТА

Квалифицированный патологоанатом, имеющий опыт микроскопической интерпретации образцов анатомической патологии, процедур ISH и распознавания результатов гибридизации in situ (которые требуют микроскопического исследования с использованием объективов 20x, 40x и / или 60x), должен оценить средства контроля перед интерпретацией результатов.13 голубой продукт реакции в ядрах эпителия шейки матки в виде гомогенного или точечного окрашивания указывает на положительную реактивность. Гомогенный рисунок выглядит как большой однородный глобулярный осадок темно-синего цвета в ядре эпителиальной клетки. Это обычно заметно в поверхностной ороговевшей области эпителия, часто внутри койлоцитотических клеток. Точечный узор представляет собой неброский точечный темно-синий ядерный узор. Чаще он присутствует в группах клеток в более базальном месте эпителия. В некоторых случаях для визуализации точечного рисунка может потребоваться большое увеличение (40-кратный объектив).

Крайне важно, чтобы только ядерное окрашивание эпителиальных клеток считалось положительным, если необходимо избежать ложноположительной интерпретации. Неклеточные стромальные преципитаты и цитоплазматическое окрашивание нейтрофилов и плазматических клеток представляют собой артефактное неспецифическое окрашивание.

Морфология каждого образца также должна быть исследована с использованием окрашенного H&E среза при интерпретации любого результата ISH. Морфологические данные пациента и соответствующие клинические данные должны интерпретироваться вместе с результатами ISH.

Примечание: не рекомендуется использовать объектив 100x. Все испытания для проверки и валидации проекта проводились с использованием объективов 20x, 40x и / или 60x.

### Контроли

Окрашенные положительные реагенты и контрольные образцы должны быть исследованы в первую очередь, чтобы убедиться, что все реагенты функционируют должным образом. Присутствие дискретного осажденного продукта реакции синего цвета в ядрах клеток-мишеней указывает на положительную реактивность. Отрицательные контроли реагентов и образцов следует исследовать после положительного контроля, чтобы проверить специфичность реакции. В отрицательном контроле не должно быть специфического окрашивания. Если происходит окрашивание, это может указывать на неспецифическую перекрестную реактивность с клетками или клеточными компонентами. Интактные клетки следует использовать для интерпретации результатов окрашивания, поскольку некротические или дегенерированные клетки часто окрашиваются неспецифически. Если положительные или отрицательные контроли не демонстрируют надлежащего окрашивания, любые результаты с исследуемыми образцами следует считать недействительными.

### Образец пациента

В последнюю очередь следует исследовать образцы пациентов. Интенсивность положительного окрашивания следует оценивать в контексте любого фонового окрашивания отрицательного контроля реагента. Отрицательный результат означает, что рассматриваемая последовательность ДНК не была обнаружена, не обязательно, что последовательность отсутствует в анализируемых клетках. Морфология каждого образца также должна быть исследована с использованием окрашенного гематоксилином и эозином среза при интерпретации любого результата ISH. Морфологические данные пациента и соответствующие клинические данные должны интерпретироваться квалифицированным патологом.

## ОГРАНИЧЕНИЯ

1. ISH - это многоэтапный диагностический процесс, который требует специальной подготовки по выбору подходящих реагентов, отбору образцов, обработке, подготовке слайда ISH и интерпретации результатов.
2. TOкрашивание ткани зависит от обращения с тканью и ее обработки перед окрашиванием. Неправильная фиксация, замораживание, оттаивание, стирка, сушка, нагревание, разрезание, или загрязнение другими тканями или жидкостями может привести к артефактам, ложноположительным или ложноотрицательным результатам.
3. Несогласованные результаты могут быть результатом различий в методах фиксации и заделки или внутренних неровностей ткани.
4. Чрезмерное или неполное контрастное окрашивание может помешать правильной интерпретации результатов.
5. Клиническая интерпретация любого положительного окрашивания или его отсутствия должна оцениваться в контексте истории болезни и морфологии и должна дополняться надлежащими контролями и другими диагностическими тестами. Квалифицированный патолог должен быть знаком с датчиками, реагентами и методами, используемыми для получения окрашенного препарата. Окрашивание должно выполняться под наблюдением патологоанатома, который отвечает за анализ окрашенных слайдов и обеспечение адекватности положительных и отрицательных контролей.
6. Реагенты могут демонстрировать неожиданные реакции в ранее непроверенных образцах. Возможность неожиданных реакций даже в тестируемых группах образцов не может быть полностью исключена из-за биологической изменчивости целевой последовательности в биологических образцах. Свяжитесь с местным офисом Ventana, если у вас есть документально подтвержденные неожиданные реакции.
7. Из-за различий в обработке образцов может потребоваться увеличить или уменьшить время обработки протеазой ISH на отдельных образцах. Такие изменения должны быть подтверждены пользователем.

## РЕЗЮМЕ ОЖИДАЕМЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Датчик Ventana INFORM HPV III Family 16 (B), набор для обнаружения ISH iVIEW Blue Plus и дополнительные реагенты в сочетании с прибором BenchMark IHC / ISH приведут к образованию синего осадка на участках последовательности-мишени, обнаруженных датчиками ISH.
2. Специфичность и чувствительность обнаружения целевой последовательности были оптимизированы и протестированы компанией Ventana. Комбинация зондов продемонстрировала положительную гибридизацию со следующими генотипами ВПЧ: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 56, 58 и 66 в образцах биопсии шейки матки. Могут быть обнаружены как гомогенные, так и пунктированные (как наблюдается в клетках HeLa, 10-50 вирусных копий15) паттерны окрашивания HPV.
3. Воспроизводимость внутри и между прогонами окрашивания с помощью зонда INFORM HPV III Family 16 (B) определяли путем окрашивания 60 многоблочных слайдов (состоящих из срезов, полученных из фиксированных формалином залитых парафином линий клеток CaSki, HeLa и T24). Слайды окрашивали на 2 разных BenchMark и 2 разных BenchMark XT.
4. Инструменты IHC / ISH, 3 цикла на инструмент. Все слайды окрашены с сопоставимой интенсивностью. Пользователи должны проверять воспроизводимость результатов внутри цикла (в рамках цикла), окрашивая несколько наборов серийных срезов низкими, средними и высокими последовательностями-мишенями за один цикл.

## TROUBLESHOOTING

1. Если положительный контроль отрицательный, его следует проверить, чтобы убедиться, что на слайде есть этикетка со штрих-кодом.
2. Если положительный контроль является отрицательным или проявляет более слабое окрашивание, чем ожидалось, следует проверить дополнительные положительные контроли (например, положительные тканевые контроли на предметном стекле пациента), окрашенные в том же цикле окрашивания, чтобы определить, вызвана ли неудача контрольным предметным стеклом. или использованные реагенты. Образцы, которые были неправильно собраны, зафиксированы, хранились или депарафинизированы, могут не иметь надлежащего окрашивания.
3. Если образец смывается с предметного стекла, необходимо проверить предметные стекла, чтобы убедиться, что они заряжены положительно.
4. Если на слайдах видны артефакты усыхания в результате химического анализа, процесс дегидратации не завершен. См. Раздел «Процедура обезвоживания».
5. При неспецифическом окрашивании стекла или неспецифическом окрашивании участков ткани (особенно области, отличные от плоского эпителия), следует окрасить дополнительный участок образца пациента.
6. Чтобы узнать о корректирующих действиях, обратитесь к разделу «Пошаговая процедура» в Руководстве оператора прибора BenchMark IHC / ISH или обратитесь в местный офис компании «Рош».

## ССЫЛКИ


1. HPV Sequence Database (http://www.stdgen.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/).
2. WHO/ICO HPV Information Center. Human Papilloma Virus and Related Cancers. Summary Report Update. November 15, 2010. p8. http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/country_pdf/XWX.pdf?CFID=5730279&CFTOKEN=65827281.
3. HPV Information Centre. http://www.hpvcentre.net/aboutus.php




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

4. Clinical Microbiology and Infection © 2015 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved, CMI, 21, 808-816.
5. Birner P, Schindl M, Stani J, Oberhuber G, Czerwenka K, Vutuc C, Breitenecker G. Hybrid capture based human papillomavirus typing in cervical screening compared to cytology and histology. Wien Klin Wochenschr. 2000;112(17):761-766.
6. Nindl I, Greinke C, Zahm DM, Stockfleth E, Hoyer H, Schneider A. Human papillomavirus distribution in cervical tissues of different morphology as determined by hybrid capture assay and PCR. Int J Gynecol Pathol. 1997;16(3):197-204.
7. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. Virology. 2009;384(2):260-265.
8. Munoz N, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus type associated with cervical cancer. N Engl J Med. 2003;348(6):518-527.
9. Delvenne P, Fontaine MA, Delvenne C, Nikkels A, Boniver J. Detection of human papillomaviruses in paraffin-embedded biopsies of cervical intraepithelial lesions: analysis by immunohistochemistry, in situ hybridization, and the polymerase chain reaction. Mod Pathol. 1994;7(1):113-119.
10. Zehbe I, Hacker GW, Su H, Hauser-Kronberger C, Hainfeld JF, Tubbs R. Sensitive in situ hybridization with catalyzed reporter deposition, streptavidin-Nanogold and silver acetate autometallography: detection of single-copy human papillomavirus. Am J Pathol. 1997;150(5):1553-1561.
11. Zehbe I, Rylander E, Strand, A, Wilander E. Use of Probemix and OmniProbe biotinylated cDNA probes for detecting HPV infection in biopsy specimens from the genital tract. J Clin Pathol. 1993;46(5):437-440.
12. Unger, ER. In situ diagnosis of human papillomaviruses. Clin Lab Med. 2000;20(2):289-301.
13. Evans MF, Aliesky HA, Cooper K. Optimization of biotinyl-tyramide-based in situ hybridization for sensitive background-free applications on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. BMC Clin Pathol. 2003;3(1):2.

## INTELLECTUAL PROPERTY

VENTANA, BENCHMARK and INFORM are registered trademarks of Roche.

All other trademarks are the property of their respective owners.

© 2017 Ventana Medical Systems, Inc.

## CONTACT INFORMATION

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.

www.ventana.com



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

# VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4493

05999570001

IVD Σ 50

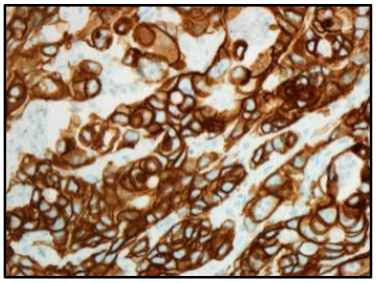


**Рисунок 1. Окрашивание** VENTANA HER2 (4B5) antibody 3+ **при карциноме желудка**

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Реагент VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (VENTANA HER2 (4B5) antibody) предназначен для полуколичественного определения уровня антигена HER2 в фиксированных формалином и залитых парафином срезах нормальных и опухолевых тканей молочной железы и желудка с помощью аппарата BenchMark IHC/ISH.

Данный продукт используется для оценки опухоли у пациентов с раком груди или желудка, которым планируется назначить препарат Herceptin, и у пациентов с раком молочной железы, которым планируется назначить препарат KADCYLA® (адо-трастузумаб эмтанзин) или PERJETA® (пертузумаб).

Результаты должны интерпретироваться квалифицированным патоморфологом с учетом данных гистологического исследования, соответствующих клинических данных и сравнения с контрольными образцами.

Данные антитела предназначены для диагностики in vitro (IVD).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

VENTANA HER2 (4B5) antibody представляет собой кроличье моноклональное антитело (Clone 4B5), специфически связывающееся с внутренним доменом онкогенного белка c-erbB-2 (HER2). Онкогенный белок c-erbB-2 был клонирован и описан в деталях группой Akiyama и др. в 1986 г.[1] Он представляет собой трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой около 185 кДа, напоминающий в структурном отношении рецептор эпителиального фактора роста (EGFR). Этот белок ассоциирован с активностью тирозинкиназы аналогично некоторым рецепторам фактора роста, а также трансформирующим белкам семейства src. Кодирующая последовательность соответствует внеклеточному связывающему домену и внутриклеточному домену киназы. Это позволяет предположить, что HER2 может быть вовлечен в процессы передачи сигналов и стимуляции митогенной активности.[1]

С помощью реакции вестерн-блоттинга показано взаимодействие реактива Clone 4B5 с гликопротеином молекулярной массой 185 кДа, полученным из лизата клеток линии SK-BR-3. SK-BR-3 — линия клеток рака груди, в которых наблюдается 128-кратное повышение экспрессии мРНК гена HER2.[2] Размер полученной на хроматограмме полосы соответствует полосе белка HER2 (185 кДа).[1] Иммуногистохимические эксперименты с трансфицированными клеточными линиями (HEK293) показали, что Clone 4B5 окрашивает клетки, трансфицированные геном HER2, и клетки, трансфицированные геном HER4. Окрашивание клеток, трансфицированных генами HER1 и HER3, не наблюдалось. Вестерн-блоттинг с рекомбинантным белком HER4 также показывает, что Clone 4B5 распознает эпитоп HER4.

При раке груди белок HER2 экспрессируется на уровне, достаточном для выявления иммуногистохимическими методами, в 20 % аденокарцином различных локализаций. Инвазивные протоковые раки положительны на белок HER2 в 15–30 % случаев.[3] Данный белок выявляется почти во всех случаях болезни Педжета молочной железы[4] и до 90 % случаев протоковой карциномы in situ комедо-типа.[3] При раке желудка белок HER2 экспрессируется на уровне, выявляемом иммуногистохимическими методами, не более чем в 30 % случаев кишечного типа рака, в 15 % случаев смешанного типа и в 5 % случаев диффузного типа. Иммуногистохимическое определение повышенной экспрессии белка HER2 используется для выявления пациентов, которым показана направленная терапия препаратом HER2.[5–10]

В компании Ventana была проведена оценка результатов окрашивания здоровых тканей, опухолевых тканей и 322 образцов ткани карциномы молочной железы с использованием реагента Clone 4B5. Результаты оценки экспрессии в здоровых тканях соответствовали опубликованным в литературе данным, то есть не наблюдалось специфического цитоплазматического или мембранного окрашивания, за исключением следующих случаев: наблюдалось окрашивание мембраны эпителиальных клеток в двух образцах тканей миндалин, а также окрашивание одного образца ткани паращитовидной железы и одного образца эпителия пищевода. Среди исследованных опухолевых тканей цитоплазматическое или мембранное окрашивание наблюдалось в раковых клетках молочной железы, толстой кишки и яичников. Было изучено 322 (триста двадцать два) случая рака груди двумя методами, которые сравнивались между собой: методы с использованием реагентов Clone 4B5 и PATHWAY HER-2/neu (CB11) mouse monoclonal antibody. Результаты окрашивания, полученные с использованием этих двух реагентов, в высокой степени коррелировали между собой. Более подробная информация приведена в разделе «Интерпретация окрашивания / ожидаемые результаты».

Использование разведенного VENTANA HER2 (4B5) antibody и готовых наборов для обнаружения iVIEW DAB Detection Kit и ultraView Universal DAB Detection Kit на аппарате BenchMark IHC/ISH позволяет снизить вероятность человеческой ошибки при ручном разведении реагентов, переносе их пипетками и ручном нанесении на препарат.

## КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Рак молочной железы является самой распространенной формой онкологических заболеваний у женщин и вторым по частоте онкологическим заболеванием, приводящим к летальному исходу. В Северной Америке вероятность того, что женщина заболеет раком груди, составляет 1:8.[11] Ранняя диагностика и адекватное лечение способны значительно увеличить общую выживаемость.[12] Рак желудка — четвертый по частоте рак и вторая по частоте причина смерти от злокачественных новообразований в мире. Наиболее распространенным методом лечения рака желудка является оперативное лечение. В большинстве случаев рак желудка диагностируется на поздней стадии, когда резекция желудка трудновыполнима. Для лечения рака желудка на поздней стадии используется химиотерапия, хотя выживаемость таких пациентов остается очень низкой. Небольшие образцы ткани могут быть легко использованы для обычного иммуногистохимического анализа (IHC), что делает эту методику в сочетании с антителами, выявляющими антигены, специфичные для интерпретации карциномы, эффективным инструментом для патоморфологов при диагностике и установлении прогноза заболевания. Онкопротеин c-erbB-2 является одним из важнейших маркеров рака груди и желудка (HER2).

HER2 — это трансмембранный белок.[13] Он обладает значительным сходством с EGFR и, как и EGFR проявляет тирозинкиназную активность.[1] Амплификация и избыточная экспрессия гена белка c-erbB-2 обнаружена во многих опухолях, в том числе в клетках рака груди и желудка.[13,14]

При раке груди и желудка в ряде случаев продемонстрирована эффективность направленной терапии HER2. Таким образом, направленная терапия HER2 будет эффективна только при раке груди и желудка, положительных на антиген HER2. Диагностика in vitro HER2-статуса при раке груди и желудка является важным методом, помогающим клиницисту определить пациентов, которым может быть назначена направленная терапия HER2.

При интерпретации результатов анализа HER2-статуса, выполненного по любому методу, следует иметь в виду, что белок HER2 экспрессируется как в клетках рака груди и желудка, так и в нормальных клетках, хотя уровень и характер экспрессии в здоровых и опухолевых клетках отличается.[15] В гистологических препаратах сохраняется морфология тканей, что способствует интерпретации HER2-положительного статуса образца.



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

## ПРИНЦИП ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

VENTANA HER2 (4B5) antibody является кроличьим моноклональным антителом, которое связывается с белком HER2 в залитых в парафин тканевых срезах. Специфическое антитело выявляется по биотин-конъюгированным вторичным антителам, реагирующим на кроличьи иммуноглобулины, с последующей обработкой конъюгатом (iVIEW DAB Detection Kit) пероксидазы хрена со стрептавидином (HRP) либо конъюгатом пероксидазы хрена с вторичным антителом (uItraView Universal DAB Detection Kit). После этого специфический комплекс антитела и фермента визуализируется путем осаждения продукта энзиматической реакции. Каждый этап процедуры включает в себя инкубацию в течение строго определенного промежутка времени при заданной температуре. В конце каждой инкубации аппарат BenchMark IHC/ISH промывает срезы, чтобы остановить реакцию и удалить не связавшиеся вещества, которые могут препятствовать протеканию необходимых реакций на последующих этапах. В стейнере также используется Liquid Coverslip, который позволяет свести к минимуму испарение водных реагентов с препарата ткани.

Клиническая оценка любого окрашивания либо его отсутствия должна осуществляться с учетом результатов соответствующих контролей. Компания Ventana рекомендует использовать для положительного контроля препараты опухолей, фиксируемых и обрабатываемых таким же образом, как образцы пациента (например, еженедельная подготовка контрольных образцов рака груди или желудка). Помимо окраски VENTANA HER2 (4B5) antibody, второй препарат следует обработать реагентом для отрицательного контроля CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Для того чтобы результаты анализа можно было признать действительными, в ткани положительного контроля должно наблюдаться мембранное окрашивание опухолевых клеток. При окрашивании реагентом CONFIRM Negative Control Rabbit Ig эти компоненты не должны проявляться. Кроме того, рекомендуется использовать один препарат для отрицательного контроля (например, препарат HER2-отрицательного рака груди или желудка) на каждую партию образцов, загружаемых в аппарат BenchMark IHC/ISH. Препарат для отрицательного контроля следует окрашивать VENTANA HER2 (4B5) antibody, чтобы убедиться, что методы раскрытия антигена и другие подготовительные процедуры не будут приводить к ложноположительным результатам.

## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 50 тестов.

В каждом дозаторе VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody объемом 5 мл содержится примерно 30 мкг кроличьего моноклонального антитела, специфически связывающего человеческий антиген c-erbB-2.

Антитело разведено в 0,05 M Tris-буферном солевом растворе, содержащем 0,01 M EDTA, 0,05 % раствор Brij-35 с 0,3 % белка-носителя и 0,05 % азида натрия в качестве консерванта. В буфере присутствуют следовые количества (приблизительно 0,25 %) эмбриональной телячьей сыворотки, попадающей из маточного раствора.

Общая концентрация белка в реагенте составляет примерно 16 мг/мл. Концентрация специфического антитела составляет примерно 6 мкг/мл. VENTANA HER2 (4B5) antibody представляет собой разбавленный кроличий IgG из супернатанта тканевой культуры.

На листке-вкладыше соответствующего набора для обнаружения VENTANA можно найти более подробное описание принципов действия; материалов и методов; сбора образцов тканей и подготовки к анализу; процесса контроля качества; принципов поиска и устранения проблем; результатов; общих ограничений.

## НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

В комплект поставки не входят красящие реагенты, например наборы для обнаружения VENTANA, а также вспомогательные компоненты, в том числе микропрепараты для отрицательного и положительного контроля.

Продукты, перечисленные в листке-вкладыше, могут быть недоступны в некоторых странах. Проконсультируйтесь с местным представителем службы поддержки.

Для окрашивания могут потребоваться следующие реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки:

1. Рекомендованный тканевый контроль.
2. Предметные стекла для микроскопа (с положительным зарядом).
3. Сушилка с поддержанием температуры 60 ± 5 °C.
4. Этикетки со штрихкодом.
5. Ксилол (гистологической степени очистки).
6. Этанол или спиртосодержащий реагент (гистологической степени очистки).
   - 100 % раствор: неразбавленный этанол или спиртосодержащий реагент.
   - 95 % раствор: смешать 95 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 5 частями деионизированной воды.
   - 80 % раствор: смешать 80 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 20 частями деионизированной воды.
7. Деионизированная или дистиллированная вода.
8. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (№ по каталогу 790-4795 / 06683380001)
9. uItraView DAB Detection Kit (№ по каталогу 760-500 / 05269806001)
10. iVIEW DAB Detection Kit (№ по каталогу 760-091 / 05266157001 (50 тестов))
11. EZ Prep Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-102 / 05279771001)
12. Reaction Buffer Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-300 / 05353955001)
13. LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-010 / 05264839001)
14. ULTRA LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-210 / 05424534001)
15. Cell Conditioning Solution (CC1) (№ по каталогу 950-124 / 05279801001)
16. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (№ по каталогу 950-224 / 05424569001)
17. Hematoxylin II (№ по каталогу 790-2208 / 05277965001)
18. Bluing Reagent (№ по каталогу 760-2037 / 05266769001)
19. Постоянная гистологическая среда для заливки образцов (Permount Fisher № по каталогу SP15-500 или эквивалентный продукт).
20. Покровное стекло (для помещения образцов ткани под стекло, например, VWR № по каталогу 48393-060)
21. Автоматический аппарат для заключения под покровное стекло (например, Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
22. Световой микроскоп.
23. Гигроскопические салфетки.

## ХРАНЕНИЕ

После получения препарата и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживать.

Для обеспечения надлежащей сохранности реагента и стабильности антител после каждого использования необходимо закрывать флакон-дозатор крышкой и сразу ставить его в холодильник в вертикальном положении.

На каждом флаконе-дозаторе с раствором антител указан срок годности. При соблюдении условий хранения реагент остается стабильным до даты, указанной на этикетке. Не использовать реагент после истечения срока годности.

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

При использовании наборов для обнаружения VENTANA и аппаратов BenchMark IHC/ISH данное первичное антитело можно применять для окрашивания подвергшихся стандартной обработке, фиксированных формалином и залитых в парафин срезов тканей. Рекомендованным фиксатором для тканей является 10 %-й нейтральный забуференный формалин.[2] Предметные стекла следует окрашивать незамедлительно после получения, поскольку антигенность в срезах тканей может снижаться со временем.

Одновременно с исследованием неизвестных образцов рекомендуется провести исследование на положительном и отрицательном контролях.

Толщина срезов должна составлять примерно 4 мкм. Срезы помещаются на предметные стекла. Следует использовать стекла Superfrost Plus или эквивалент. Исследования, проведенные компанией Ventana, показывают, что срезы тканей и клеточных линий, высушенные на воздухе стабильны при температуре 2–8 °C не менее 6 месяцев. Каждая лаборатория должна самостоятельно удостовериться в том, что используемые методики и условия хранения обеспечивают сохранность микропрепаратов.

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики in vitro (IVD).
2. Только для профессионального использования.



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

3. Обладающие положительным электрическим зарядом предметные стекла могут быть подвержены неблагоприятным воздействиям со стороны окружающей среды, вследствие чего окрашивание любыми иммуногистохимическими методами приведет к неудовлетворительным результатам, например вследствие недостаточного количества первичного антитела или контрастного окрашивания в тканях. Чтобы лучше понять принцип использования стекол такого типа, запросите у представителя компании Roche копию документа “Impacts of Environmental Stresses on IHC Positively Charged Slides”.
4. В некоторых странах возможность использования данного продукта для отбора пациентов, которым может быть показано лечение препаратом KADCYLA или PERJETA, может отсутствовать. Для подтверждения доступности продукта в вашем регионе обратитесь к региональному представителю компании Roche.
5. Материалы животного и человеческого происхождения должны рассматриваться как биологически опасные и утилизироваться с надлежащими предосторожностями.
6. Избегайте контакта реагентов с глазами и слизистыми оболочками. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды.
7. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.
8. При использовании согласно инструкции данный продукт не считается опасным веществом. В качестве консерванта в реагенте используется азид натрия. Симптомы передозировки азида натрия включают в себя раздражение глаз и кожи, а также раздражение слизистых оболочек и верхних дыхательных путей. Концентрация азида натрия в реагенте составляет 0,05 %, что соответствует требованиям OSHA к содержанию опасных веществ. По мере накопления NaN3 может взаимодействовать со свинцовыми и медными канализационными трубами с образованием крайне взрывоопасных азидов металлов. Чтобы предотвратить накопление азидов в канализационных трубах, при утилизации реагент следует смывать большим количеством воды.[16] У лиц с повышенной чувствительностью возможно развитие системных аллергических реакций.
9. Проконсультируйтесь с местными и (или) государственными органами в отношении рекомендованного способа утилизации.
10. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Первичные антитела VENTANA разработаны для использования в аппаратах BenchMark IHC/ISH с применением наборов для обнаружения и вспомогательных компонентов VENTANA. Для ознакомления с рекомендованными протоколами окрашивания см. таблицы Таблица 1 и Таблица 2

Данное антитело оптимизировано для инкубации в течение конкретных периодов времени, однако пользователю необходимо провести валидацию результатов, полученных с использованием данного реагента.

Параметры автоматических процедур могут быть отображены на экране, напечатаны и отредактированы согласно процедуре, описанной в руководстве пользователя, прилагаемом к соответствующему аппарату. Подробная информация о процедурах иммуногистохимического окрашивания содержится на листке-вкладыше соответствующего набора для обнаружения VENTANA.

**Таблица** 1. Рекомендованный протокол окрашивания для VENTANA HER2 (4B5) antibody с использованием iVIEW DAB Detection Kit на аппаратах BenchMark IHC/ISH

| | **Метод** | | |
|---|---|---|---|
| **Тип процедуры** | **Аппарат** BenchMark **или** BenchMark GX | **Аппарат** BenchMark XT | **Аппарат** BenchMark ULTRA |
| **Депарафинирование** | Выбрано | Выбрано | Выбрано |
| **Кондиционирование клеток (демаскирование антигена)** | CC1, стандартное | CC1, стандартное | ULTRA CC1, мягкое |
| **Антитело (первичное)** | 32 минуты, 37 °C | 32 минуты, 37 °C | 24 минуты, 36 °C |
| **Блок** A/B **(блокирование биотина)** | Не выбрано | Выбрано | Выбрано |
| **Контрастное окрашивание** (Hematoxylin) | Hematoxylin II, 4 минуты | Hematoxylin II, 4 минуты | Hematoxylin II, 4 минуты |
| **Обработка после контрастного окрашивания** | Bluing, 4 минуты | Bluing, 4 минуты | Bluing, 4 минуты |

**Таблица** 2. Рекомендованный протокол окрашивания для VENTANA HER2 (4B5) antibody с использованием ultraView DAB Detection Kit на аппаратах BenchMark IHC/ISH

| | **Метод** | |
|---|---|---|
| **Тип процедуры** | **Аппарат** BenchMark, BenchMark GX **или** BenchMark XT | **Аппарат** BenchMark ULTRA |
| **Депарафинирование** | Выбрано | Выбрано |
| **Кондиционирование клеток (демаскирование антигена)** | CC1, мягкое | ULTRA CC1, мягкое |
| **Антитело (первичное)** | 16 минут при 37 °C | 12 минут при 36 °C |
| ultraWash | Выбрано | Выбрано |
| **Контрастное окрашивание** | Hematoxylin II, 4 минуты | Hematoxylin II, 4 минуты |
| **Обработка после контрастного окрашивания** | Bluing, 4 минуты | Bluing, 4 минуты |

В связи с различиями в фиксации и обработке тканей, а также в лабораторном оборудовании и внешних условиях, может потребоваться увеличение или уменьшение времени инкубации первичных антител и кондиционирования клеток в зависимости от конкретных образцов, диагностических методов и предпочтений пользователя. Для получения дополнительной информации о параметрах фиксации см. «Immunohistochemistry Principles and Advances».[3] Таблица 3 содержит краткое описание рекомендуемых процедур окрашивания для рака груди и желудка.



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

**Таблица** 3. Процедуры окрашивания

| | **Аппарат** BenchMark **или** BenchMark GX | **Аппарат** BenchMark XT | **Аппарат** BenchMark ULTRA |
|---|---|---|---|
| Карцинома груди | Процедура окрашивания ultraView DAB или iVIEW DAB* | Процедура окрашивания ultraView DAB или iVIEW DAB* | Процедура окрашивания ultraView DAB или iVIEW DAB* |
| Карцинома желудка | GX uVDAB HER2 4B5 Gastric (Таблица 2) | XT uVDAB HER2 4B5 Gastric (Таблица 2) | ULTRA uVDAB HER2 4B5 Gastric (Таблица 2) |

* Образцы карциномы молочной железы окрашены на аппаратах BenchMark IHC/ISH согласно процедурам окрашивания для iVIEW DAB Detection Kit (Таблица 1) или ultraView Universal DAB Detection Kit (Таблица 2)

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

### Контрольные препараты из клеточных линий

Компания Ventana поставляет четыре типа контрольных препаратов из клеточных линий. Эти препараты фиксированы формалином и залиты парафином; из них приготовлены срезы, помещенные на односторонние предметные стекла. Контрольные препараты PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides (№ по каталогу: 781-2991) можно использовать для предварительной валидации метода окраски препаратов с помощью VENTANA HER2 (4B5) antibody. Препараты этих четырех клеточных линий отличаются по количеству копий гена, которое определено методом ISH (гибридизации in situ). При надлежащей обработке и окрашивании эти клеточные линии должны окрашиваться в соответствии с описанием, приведенным в таблице Таблица 4. Если окраска не удовлетворяет описанным критериям, особенно для контрольных препаратов на 1+ и 2+ балла, следует повторить процедуру окраски тканей.

**Таблица** 4. Характеристики контрольных препаратов PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides

| IHC **оценка** HER2 | **Клеточная линия** | **Отношение** HER2/Chr17* |
|---|---|---|
| 0 | Формат бумаги «MDA-MB-231» | 1,11. |
| 1+ | Формат бумаги «T47D» | 1,12. |
| 2+ | Формат бумаги «MDA-MB-453» | 2,66. |
| 3+ | Формат бумаги «BT-474» | 5,53. |

* Приведено среднее соотношение HER2/Chr17 по трем партиям контрольных препаратов PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides, установленное методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).

### Положительный тканевый контроль

Ткани положительного контроля, зафиксированные и обработанные аналогично образцам тканей пациентов, должны анализироваться для каждого набора условий проведения анализа и при каждом выполнении окрашивания с использованием VENTANA HER2 (4B5) antibody. Оптимальная лабораторная практика — помещение среза для положительного контроля на одно стекло с образцом исследуемой ткани. Используемая в качестве контроля ткань может содержать как положительно, так и отрицательно окрашиваемые компоненты клеток или ткани, и использоваться в качестве как положительного, так и отрицательного контроля. В качестве контроля следует использовать свежие образцы тканей, полученные в ходе вскрытия, биопсии или хирургических операций. Образцы следует как можно скорее подготовить и зафиксировать по точно такой же процедуре, что используется для исследуемых образцов. С помощью такой ткани можно контролировать все этапы анализа, начиная от подготовки ткани и заканчивая окрашиванием.

Использование среза ткани, зафиксированного или обработанного по процедуре, отличной от процедуры для исследуемого образца, позволяет контролировать качество всех реагентов и этапов анализа, за исключением фиксации и подготовки ткани. Образцы ткани со слабым положительным окрашиванием подходят для оптимального контроля качества и для выявления начальных стадий деградации реагента в большей мере, чем образцы с сильным положительным окрашиванием. Идеальным контролем чувствительности системы к незначительной деградации реагента или к проблемам в IHC методике, является ткань со слабым положительным окрашиванием. Однако, как правило, HER2-положительные опухолевые ткани резко положительны из природы патологических изменений (избыточная экспрессия гена). Примером препаратов для положительного контроля VENTANA HER2 (4B5) antibody являются препараты инвазивного рака груди или рака желудка с известной слабой экспрессией белка HER2. Окрашивание компонентов препаратов для положительного контроля (окрашивание мембран опухолевых клеток) используется для подтверждения того, что обработка антителом выполнялась, и что аппарат работает нормально.

Заведомо положительные контроли следует использовать только для проверки правильности самой процедуры окрашивания обработанных тканей и качества реагентов, но не для постановки конкретного диагноза на основании исследуемых образцов.

### Отрицательный тканевый контроль

Препарат, использовавшийся для положительного контроля (протоковый и дольковый инвазивный рак груди или рак желудка), можно использовать как отрицательный контроль. Неокрашиваемые части препарата (стромальные элементы, лимфоидные клетки и кровеносные сосуды) демонстрируют отсутствие специфической окраски и позволяют определить уровень фоновой окраски (ложноположительный) после обработки первичным антителом. Следует использовать известный препарат для отрицательного контроля, который фиксируется, обрабатывается и заливается парафином по той же процедуре, что образцы пациента.

### Отрицательный контроль реагента

Отрицательный контроль для реагента следует использовать для каждого образца с целью оказания помощи при интерпретации результатов. Отрицательный контроль реагентов используется вместо первичного антитела для оценки неспецифического окрашивания. Препарат обрабатывается реагентом для отрицательного контроля CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Время инкубации с отрицательным контролем для реагента и первичным антителом должно быть одинаковым.

### Необъяснимые расхождения

В случае необъяснимых различий контрольных образцов необходимо немедленно обратиться к представителю местной службы поддержки. Если результаты контроля качества не соответствуют спецификациям, результаты для пациента являются неверными. См. раздел «Поиск и устранение проблем» в данном вкладыше. Выявите и устраните проблему, после чего повторите работу с образцами пациента.

### Верификация анализа

Прежде чем использовать первичное антитело или систему окрашивания в диагностических целях, необходимо удостовериться в специфичности данного первичного антитела, окрасив серию тканей с известными иммуногистохимическими характеристиками. В серию должны входить как положительно, так и отрицательно окрашивающиеся контрольные ткани. Более подробная информация содержится в разделе «Контроль качества», приведенном выше в данном вкладыше, а также в «Quality Control recommendations of the College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist»[17] и в «CLSI Approved Guideline»[18]). Эти процедуры контроля качества необходимо повторять для каждой новой партии антител или при каждом изменении параметров анализа.
Для верификации диагностической системы можно использовать препараты рака груди или желудка с известным HER2-статусом.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОКРАШИВАНИЯ / ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении автоматического иммуногистохимического анализа VENTANA наблюдается выпадение коричневого осадка (DAB) в местах локализации антигена, обнаруженного VENTANA HER2 (4B5) antibody. Интерпретация результатов должна производиться квалифицированным патоморфологом, имеющим опыт работы с иммуногистохимическими методиками. Прежде чем интерпретировать результаты, необходимо оценить контроли и удостовериться в соответствии окрашенного препарата критериям качества.



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

### Принятая система баллов при интерпретации результатов окраски препаратов карциномы молочной железы с помощью VENTANA HER2 (4B5) antibody

Результат анализа препарата рака груди на белок HER2 считается положительным, если соблюдается критерий интенсивности окраски (балл 2+ и более по шкале от 0 до 3+) и критерий доли положительных опухолевых клеток (более 10 %). Окрашивание должно быть локализовано на клеточной мембране. Цитоплазматическое окрашивание допускается, но оно не должно расцениваться как положительное. Осмотрите весь срез. Оценку окраски следует проводить только в хорошо сохранившихся и хорошо окрашенных областях. Окрашивание по всей окружности цитоплазматической мембраны оценивается в 2+ или 3+ балла. Частичное окрашивание мембраны расценивается как 1+. При сомнении осмотрите препарат с увеличением 40x или больше, чтобы дифференцировать интенсивность 1+ и 2+. В отличие от случаев с интенсивностью 3+, для окрашивания с интенсивностью 2+ характерно более четкое и ясно очерченное кольцо; для интенсивности 3+ характерна очень толстая линия по контуру. Ниже приведена справочная таблица с критериями оценки окрашивания. В руководстве «Interpretation Guide for VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody Staining of Breast and Gastric Carcinoma» (*№ по каталогу*: 1012716) приведено более подробное описание с фотографиями тканей, окрашенных с использованием VENTANA HER2 (4B5) antibody.

**Таблица** 5. Критерии интенсивности и характера окраски клеточных мембран в препаратах карциномы молочной железы VENTANA HER2 (4B5) antibody

| Характер окрашивания | Оценка (отчет для лечащего врача) | Оценка окрашивания HER2 |
|---|---|---|
| Нет мембранного окрашивания | 0 | Отрицательный результат |
| Слабое частичное окрашивание мембран в любом количестве опухолевых клеток | 1+ | Отрицательный результат |
| Слабое полное окрашивание мембран более чем в 10 % раковых клеток | 2+ | Допускается двоякое толкование* |
| Интенсивное полное окрашивание мембран более чем в 10 % раковых клеток | 3+ | Положительный результат |

* Рекомендуется провести реакцию ISH

### Принятая система баллов при интерпретации результатов окраски VENTANA HER2 (4B5) antibody препаратов рака желудка

Результат анализа препарата рака желудка на белок HER2 считается положительным, если соблюдается критерий интенсивности и характера окраски (балл 2+ и более по шкале от 0 до 3+) и критерий процентного содержания положительных опухолевых клеток. Окрашиваться должны клеточные мембраны, но не обязательно по всей окружности. Базо-латеральная окраска часто встречается и должна учитываться при оценке. Цитоплазма и ядро также могут окрашиваться, но это не учитывается при определении результата теста. Критерий процентного содержания положительных опухолевых клеток зависит от способа забора материала: для биоптатов он составляет ≥ 5 связанных клеток, для резекционных препаратов — ≥ 10 %.

При установлении стандартов интерпретации результатов иммуногистохимического анализа на белок HER2 при раке желудка[19] имейте в виду, что показателем гиперэкспрессии белка HER2 в опухолевых клетках является интенсивное окрашивание мембран, хотя это окрашивание может не охватывать всю окружность клетки.

Отмечалось диффузное окрашивание цитоплазмы с окрашиванием или без окрашивания ядра в препаратах рака желудка.[20] Для оценки экспрессии белка HER2 при раке желудка следует учитывать только окраску мембран.

Иммуногистохимическая окраска реагентом Clone 4B5 способна приводить к окрашиванию цитоплазмы и ядер нормальных клеток слизистой оболочки желудка и, реже, опухолевых клеток при раке желудка и пищевода. Причина такого окрашивания цитоплазмы и ядер в настоящее время неизвестна. Такой характер окраски не следует путать с изолированной окраской мембран, т. к. последняя является признаком HER2-положительных опухолевых клеток.

Более подробное описание с микрофотографиями препаратов, окрашенных VENTANA HER2 (4B5) antibody, см. в документе «Interpretation Guide for VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody Staining of Breast and Gastric Carcinoma».

**Таблица** 6. Критерии интенсивности и характера окраски клеточных мембран в препаратах рака желудка VENTANA HER2 (4B5) antibody

| Характер окраски резекционного препарата | Характер окраски биоптата | Балл (указывается в заключении, которое передается врачу, заказавшему исследование) | Оценка окрашивания HER2 |
|---|---|---|---|
| Отсутствие окрашивания или окрашивание мембран < 10 % опухолевых клеток | Отсутствие окрашивания, в том числе отсутствие окрашивания мембран во всех опухолевых клеток | 0 | Отрицательный результат |
| Слабое (едва различимое) окрашивание мембран ≥ 10 % опухолевых клеток; частичное окрашивание мембран | Кластеры* опухолевых клеток со слабым (едва различимым) окрашиванием мембран независимо от доли окрашенных опухолевых клеток | 1+ | Отрицательный результат |
| Слабое или умеренное полное, базолатеральное или латеральное окрашивание мембран ≥ 10 % опухолевых клеток | Кластеры* опухолевых клеток со слабым или умеренным полным, базолатеральным или латеральным окрашиванием мембран независимо от доли окрашенных опухолевых клеток | 2+ | Допускается двоякое толкование** |
| Интенсивное полное, базолатеральное или латеральное окрашивание мембран ≥ 10 % опухолевых клеток | Кластеры* опухолевых клеток с интенсивным полным, базолатеральным или латеральным окрашиванием мембран независимо от доли окрашенных опухолевых клеток | 3+ | Положительный результат |

* ≥ 5 связанных клеток

**Рекомендуется провести реакцию ISH



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

## ОГРАНИЧЕНИЯ

### Общие ограничения

1. Иммуногистохимический анализ — это многоэтапный диагностический процесс, который требует специальной подготовки при выборе надлежащих реагентов и тканей, фиксации, обработке и подготовке иммуногистохимического микропрепарата, а также интерпретации результатов окрашивания.
2. На результаты окрашивания ткани влияет обращение с тканью и подготовка ее к окрашиванию. Ненадлежащая фиксация, замораживание, оттаивание, промывка, просушка, нагрев, микротомирование или загрязнение другими тканями или жидкостями может привести к появлению сторонних частиц, захвату антитела или получению ложноотрицательных результатов. Различия в методах фиксации и заливки или неоднородность свойств ткани могут стать причиной противоречивости получаемых результатов.
3. Избыточное или неполное контрастное окрашивание может негативно повлиять на правильность интерпретации результатов.
4. Клиническая интерпретация любого положительного окрашивания, либо его отсутствия, должна проводиться с учетом истории болезни, морфологических данных и других гистопатологических критериев. Клиническая интерпретация любого окрашивания или его отсутствия должна быть дополнена морфологическими исследованиями, надлежащими контролями и результатами других диагностических тестов. Квалифицированный патоморфолог обязан знать характеристики используемых антител, реагентов и методов для интерпретации результатов окрашивания препарата. Окрашивание должно проводиться в сертифицированной и лицензированной лаборатории под контролем патоморфолога, ответственного за просмотр окрашенных микропрепаратов и обеспечение достоверности положительных и отрицательных контролей.
5. Антитела и реагенты компании Ventana имеют оптимальную концентрацию для применения в соответствии с прилагающейся инструкцией. Любое отклонение от рекомендованных процедур проведения теста может привести к тому, что ожидаемые результаты будут недостоверны. Необходимо использовать надлежащие контрольные образцы и документировать их использование. Пользователи, которые отклоняются от рекомендованных процедур проведения теста, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.
6. Данный продукт не предназначен для использования в проточной цитометрии. Проверка характеристик не проводилась.
7. При использовании реагентов с тканями, которые ранее не тестировались, могут возникать неожиданные реакции. В связи с биологическим разнообразием экспрессии антигена в опухолях и других патологических тканях полностью исключить возможность непредусмотренной реагентности нельзя, даже для тех тканей, на которых данные реагенты уже тестировались.[21] В документированных случаях непредусмотренной реагентности свяжитесь с ближайшим представительством компании.
8. Ткани людей, инфицированных вирусом гепатита B и содержащие поверхностный антиген вируса гепатита B (HBsAg), могут неспецифически окрашиваться пероксидазой хрена.[22]
9. Ложно-положительные результаты могут наблюдаться вследствие неспецифического (не иммунологического) связывания белков или продуктов реакции субстрата. Кроме того, они возможны из-за псевдопероксидазной активности (эритроцитов), активности эндогенных пероксидаз (цитохром C) или из-за наличия эндогенного биотина (например, в печени, головном мозге, молочных железах и почках), в зависимости от используемого иммунологического красителя.[23]
10. Как и в любом иммуногистохимическом тесте, отрицательный результат означает, что антиген не обнаружен. Это не равнозначно отсутствию антигена в анализируемых клетках или ткани.

### Специфические ограничения

1. Реагент антитела оптимизирован для платформ и наборов реагентов компании VENTANA, указанных в Таблицах 1 и 2. В связи с различиями в фиксации и обработке ткани может потребоваться увеличить или уменьшить время инкубации первичного антитела для отдельных образцов. Дополнительную информацию о различиях в методиках фиксации см. в руководстве Immunohistochemistry Principles and Advances [24].
2. Данное антитело в сочетании с наборами для обнаружения VENTANA и вспомогательными принадлежностями обнаруживает антигены, которые переносят в неизменном виде фиксацию формалином, обработку ткани и микротомирование. Пользователи, которые отклоняются от рекомендованных процедур проведения теста, несут ответственность за интерпретацию и валидацию результатов пациента.
3. Специфичность окрашивания тканей костного мозга не изучалась. Пользователь должен получить соответствующее окрашивание вышеуказанных тканей, прежде чем приступать к интерпретации результатов окрашивания.
4. Иммуногистохимическая окраска реагентом Clone 4B5 способна приводить к окрашиванию цитоплазмы и ядер нормальных клеток слизистой оболочки желудка и, реже, опухолевых клеток при раке желудка и пищевода. Причина такого окрашивания цитоплазмы и ядер в настоящее время неизвестна. Такой характер окраски не следует путать с изолированной окраской мембран, т. к. последняя является признаком HER2-положительных опухолевых клеток.
5. Анализы могут регистрироваться не на каждом инструменте. Для получения дополнительной информации обратитесь к местному представителю компании Roche.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Чувствительность и специфичность

Эффективность реагента VENTANA HER2 (4B5) antibody оценивалась в исследованиях специфичности, воспроизводимости и в исследовании по сравнению методов. Во всех случаях, если не указано иное, окраска проводилась с помощью набора для обнаружения по указанному выше протоколу iVIEW DAB Detection Kit на аппарате BenchMark XT. Сначала будут представлены данные для рака груди, потом для рака желудка.

Результаты окрашивания тестовых препаратов с целью определения специфичности, чувствительности и воспроизводимости приведены в соответствующих таблицах (Таблица 7 и Таблица 8), а также в разделе Точность.

### Специфичность

**Таблица** 7. Специфичность окрашивания VENTANA HER2 (4B5) antibody, определенная путем окрашивания зафиксированных формалином и залитых в парафин нормальных тканей

| Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев | Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|---|---|
| Головной мозг | 0/6 | Матка | 0/3 |
| Мозжечок | 0/6 | Костный мозг | 0/3 |
| Надпочечник | 0/6 | Легкое | 0/6 |
| Яичник | 0/6 | Сердце | 0/5 |
| Поджелудочная железа | 0/6 | Пищевод | 1/6 |
| Паращитовидная железа | 4/6* | Желудок | 0/11 |
| Гипофиз | 0/5 | Тонкий кишечник | 0/3 |
| Яичко | 0/6 | Толстый кишечник | 0/46 |
| Щитовидная железа | 0/6 | Печень | 0/6 |
| Молочная железа | 0/16 | Слюнная железа | 0/3 |
| Селезенка | 0/6 | Почка | 0/6 |



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

| Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев | Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|---|---|
| Миндалины | 3/6 ** | Простата | 1/6 |
| Эндометрий | 0/3 | Шейка матки | 0/5 |
| Скелетная мускулатура | 0/6 | Кожа | 0/6 |
| Периферический нерв | 2/6 | Мезотелий и легкое | 0/3 |
| Тимус | 0/5 | Мочевой пузырь | 3/3 |
| Перикард | 0/3 | Лимфоузел | 0/12 |
| Эндоцервикс | 0/1 | Прямая кишка | 0/6 |
| Тонкий кишечник | 0/3 | Язык | 0/3 |

* очаговое окрашивание мембран

** очаговое окрашивание клеток поверхностного эпителия

### Чувствительность

**Таблица** 8. Чувствительность VENTANA HER2 (4B5) antibody, определенная путем окрашивания ряда фиксированных формалином и залитых в парафин препаратов опухолевых тканей

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Глиобластома (головной мозг) | 0/2 |
| Менингиома (головной мозг) | 0/1 |
| Олигодендроглиома (головной мозг) | 0/1 |
| Серозная аденокарцинома (яичники) | 0/2 |
| Карцинома яичника, неуточненная (без дополнительных уточнений) | 1/2 |
| Нейроэндокринное новообразование поджелудочной железы (поджелудочная железа) | 0/1 |
| Аденокарцинома (поджелудочная железа) | 0/1 |
| Семинома (яички) | 0/1 |
| Эмбриональная карцинома (яички) | 0/1 |
| Карцинома поджелудочной железы, неуточненная | 0/3 |
| Медуллярная карцинома (щитовидная железа) | 0/1 |
| Папиллярная карцинома (щитовидная железа) | 0/1 |
| Карцинома щитовидной железы, неуточненная | 0/3 |
| Микроинвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 2/2 |
| Инвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 44/99 |
| Карцинома молочной железы, неуточненная | 1/4 |
| В-клеточная лимфома, неуточненная (селезенка) | 0/1 |
| Мелкоклеточная карцинома (легкое) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (легкое) | 0/1 |
| Карцинома легкого, неуточненная | 0/2 |
| Аденокарцинома (легкое) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (пищевод) | 0/1 |
| Аденокарцинома (пищевод) | 0/1 |
| Муцинозная аденокарцинома (желудок) | 0/4 |
| Аденокарцинома (желудок) | 8/91 |
| Перстневидноклеточная карцинома (желудок) | 0/4 |
| Карцинома желудка, неуточненная | 0/3 |
| Аденокарцинома (тонкая кишка) | 0/1 |
| Стромальная опухоль ЖКТ (ЖКСО) (тонкая кишка) | 0/1 |
| Аденокарцинома (толстая кишка) | 2/36 |
| Стромальная опухоль ЖКТ (ЖКСО) (толстая кишка) | 0/1 |
| Аденокарцинома (прямая кишка) | 1/5 |
| Стромальная опухоль ЖКТ (ЖКСО) (прямая кишка) | 0/1 |
| Карцинома почки, неуточненная | 0/5 |
| Гепатоцеллюлярная карцинома (печень) | 0/6 |
| Гепатобластома (печень) | 0/1 |
| Лейомиома | 0/3 |
| Светлоклеточная карцинома (почки) | 0/1 |
| Аденокарцинома (простата) | 0/4 |
| Карцинома предстательной железы, неуточненная | 0/3 |
| Лимфома, неуточненная | 0/3 |
| Лимфома Ходжкина (Hodgkin) (лимфатический узел) | 0/1 |
| Уротелиальная карцинома (мочевой пузырь) | 0/1 |
| Лейомиосаркома (мочевой пузырь) | 0/1 |
| Остеосаркома (кость) | 0/1 |
| Плеоморфная рабдомиосаркома (брюшина) | 0/1 |
| Лейомиосаркома (гладкая мускулатура) | 0/1 |
| Метастатическая аденокарцинома (от прямой кишки) | 0/1 |
| Метастатическая аденокарцинома (от ободочной кишки) | 0/7 |
| Метастатическая муцинозная аденокарцинома (от ободочной кишки) | 0/1 |
| Карцинома толстой кишки, неуточненная | 1/3 |
| Меланома | 0/2 |
| Карциноид | 0/2 |



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

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Саркома, неуточненная | 0/2 |
| Недифференцированный рак | 0/1 |

1. Положительное окрашивание эпителия миндалин и пищевода, а также простаты, периферического нерва, паращитовидной железы, опухолевой ткани молочной железы, толстой кишки и яичника соответствует опубликованным в литературе данным об экспрессии HER2.
2. Чувствительность. Результаты исследования чувствительности приведены в таблицах 12 и 14: «Консенсус трех патоморфологов по баллу в IHC-анализе с использованием реагента Clone 4B5 по сравнению с FISH-анализом».
3. Воспроизводимость результата внутри цикла окрашивания на аппаратах BenchMark и BenchMark XT определялась по трем препаратам. Каждый препарат состоял из пяти образцов ткани рака груди с различными баллами экспрессии белка HER2 — 0, 1+, 2+ и 3+. В каждом случае три из трех срезов каждого образца окрашивались соответствующим образом в рамках одного подхода с использованием всех испытываемых платформ. Пользователь должен проверить воспроизводимость результатов в пределах одного подхода путем окрашивания в рамках одного подхода нескольких наборов серийных срезов с низким, средним и высоким содержанием антигена.
4. Воспроизводимость результата между циклами окрашивания и между платформами определялась по трем препаратам, каждый из которых состоял из пяти образцов ткани рака груди с различными баллами экспрессии белка HER2 — 0, 1+, 2+ и 3+. Проводилось по три цикла окрашивания групп из трех препаратов на каждую аппаратную платформу — BenchMark и BenchMark XT. В каждом случае все 9 препаратов окрашивались соответствующим образом: результат воспроизводился между тремя циклами окрашивания и между всеми исследуемыми аппаратными платформами.
5. Межлабораторная воспроизводимость результатов окрашивания с использованием аппарата BenchMark XT и воспроизводимость результатов оценки уровня экспрессии при ее выполнении разными экспертами. В исследовании воспроизводимости результата между лабораториями принимали участие три лаборатории. В каждую из лабораторий были переданы следующие материалы для окраски на аппаратной платформе BenchMark XT по рекомендованному протоколу окраски: 40 предметных стекол с препаратами инвазивного рака груди, фиксированные в нейтральном формалине на буфере (по 10 препаратов каждой HER2-категории: 0, 1+, 2+ и 3+), и шесть (6) контрольных препаратов PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides. Контроли включали в себя препараты PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides и второй срез каждого образца, окрашенный Ig-отрицательным реагентом. На основании данных исследований контролей результаты всех лабораторий были признаны достоверными. Результаты были проанализированы в компании Ventana. Одинаковые результаты оценки интенсивности окрашивания, выполненной в разных лабораториях, были получены для тридцати четырех из сорока (34/40) срезов. Результаты оценки шести образцов (6/40, или 15 %) отличались не более чем на 1 уровень интенсивности. Оценка трех образцов (3/6) варьировала между 0 и 1+, что расценивается как отрицательное окрашивание в обоих случаях. Оценка двух образцов (2/40, или 5 %) варьировала между 2+ и 3+, и одного образца (1/40) между 1+ и 2+.
6. Воспроизводимость результатов оценки уровня экспрессии с использованием аппарата BenchMark XT при ее выполнении разными экспертами. Во всех 40 случаях (100 %) не менее 2 патоморфологов из 3 давали одинаковый результат.
7. Воспроизводимость между партиями оценивалась при автоматическом окрашивании 5 образцов ткани рака молочной железы с уровнями экспрессии HER2 0, 1+, 2+ и 3+ с использованием 3 партий реагента HER2 (4B5). Окрашенные препараты оценивались по шкале от 0 до 3+ тремя квалифицированными патоморфологами. Было получено 100 % совпадение результатов между партиями и экспертами для 3 препаратов и 5 окрашенных образцов ткани.
8. Сравнительное исследование кроличьего моноклонального антитела Clone 4B5 и PATHWAY HER-2/neu (CB11) mouse monoclonal antibody: краткое описание результатов. Было проведено сравнительное исследование методов с целью проверки корреляции Clone 4B5 с PATHWAY HER-2/neu (CB11) mouse monoclonal antibody и PathVysion Her-2 FISH, оба из которых являются ранее утвержденными FDA диагностическими тестами. В исследовании приняли участие шесть специалистов. Две группы из трех исследователей оценивали две независимые группы образцов известных раков груди (группа 1: n = 178, группа 2: n = 144), окрашенных реагентами PATHWAY HER-2/neu (CB11) mouse monoclonal antibody и Clone 4B5. Данные FISH-анализа брались из истории болезни. Учитывались баллы по консенсусу трех патоморфологов для каждого образца по каждому антителу с целью снижения вариабельности оценок разных интерпретирующих врачей, которая присуща системе балльной оценки HER2-статуса.[25, 26, 27] Всего исследовано 322 образца. Препараты подготавливались и окрашивались реагентом PATHWAY HER-2/neu (CB11) mouse monoclonal antibody в соответствии с указаниями производителя реагента, приведенными в листке-вкладыше PATHWAY HER-2/neu (CB11). Средний срок между окраской и интерпретацией препаратов, окрашенных реагентом PATHWAY HER-2/neu (CB11) mouse monoclonal antibody, составил примерно один год. Так как результаты оценки одного из шести экспертов выходили за рамки доверительного интервала (ДИ), данные, полученные для двух групп, представлены ниже следующим образом.

**Воспроизводимость результатов между патоморфологами в сравнительном исследовании образцов**

**Таблица** 9. Группа 1: консенсус трех патоморфологов по баллу в IHC-анализе

| **Балл реагента** Clone 4B5 | **Оценка** PATHWAY HER-2/neu (CB11) mouse monoclonal antibody | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 3+ | 2+ | 0, 1+ | **Всего** |
| 3+ | 29 | 24 | 5 | 58 |
| 2+ | 2 | 13 | 17 | 32 |
| 0, 1+ | 0 | 0 | 53 | 53 |
| Всего | 31 | 37 | 75 | 143 |

Группа 1: результаты анализа в виде матрицы 3 x 3.

Общее количество образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет (29+13+53)/143 = 66,4 % (95 % ДИ = 38,6–59,7 %).

Группа 1: результаты анализов в виде матрицы 2 x 2 (объединены баллы HER2-положительного результата (2+ и 3+) и HER2-отрицательного результата (0 и 1+)).

- Количество положительных образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет (29+2+24+13)/(31+37) = 100 % (95 % ДИ = 97,5–100 %).
- Количество отрицательных образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет 53/75 = 70,7 % (95 % ДИ = 58,5–80,1 %).

Общее количество образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение (положительное/отрицательное), составляет (29+24+2+13+53)/143 = 84,7 % (95 % ДИ = 78,2–90,0 %).



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

**Таблица** 10. Группа 2: консенсус трех патоморфологов по баллу в IHC-анализе

| **Балл реагента** Clone 4B5 | **Оценка** PATHWAY HER-2/neu (CB11) mouse monoclonal antibody | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 3+ | 2+ | 0, 1+ | **Всего** |
| 3+ | 72 | 1 | 0 | 73 |
| 2+ | 1 | 12 | 5 | 18 |
| 0, 1+ | 0 | 7 | 80 | 87 |
| Всего | 73 | 20 | 85 | 178 |

Группа 2: результаты анализа в виде матрицы 3 x 3.

Общее количество образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет (72+12+80)/178 = 92,1 % (95 % ДИ = 80,1–93,1 %).

Группа 2: результаты анализов в виде матрицы 2 x 2 (объединены баллы HER2-положительного результата (2+ и 3+) и HER2-отрицательного результата (0 и 1+)).

- Количество положительных образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет (72+12+1+1)/(73+20) = 92,5 % (95 % ДИ = 85,2–96,9 %).
- Количество отрицательных образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет 80/85 = 94,1 % (95 % ДИ = 86,8–98,1 %).

Общее количество образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет (72+12+1+1+80)/178 = 93,3 % (95 % ДИ = 88,5–96,4 %).

**Таблица** 11. Группа 1: консенсус трех патоморфологов по баллу в IHC-анализе с использованием реагента PATHWAY HER-2/neu (CB11) по сравнению с FISH-анализом

| **Оценка** PATHWAY HER-2/neu (CB11) mouse monoclonal antibody | **Результат** FISH | | |
|---|---|---|---|
| | **Положительный результат** | **Отрицательный результат** | **Всего** |
| 3+ | 32 | 0 | 32 |
| 2+ | 32 | 5 | 37 |
| 0, 1+ | 22 | 53 | 75 |
| Всего | 86 | 58 | 144 |

Группа 1: рабочие характеристики для PATHWAY HER-2/NEU (CB11) IHC и FISH, представление 2 x 2 (результаты оценки 2 и 3 считаются положительными).

- Количество положительных образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет (32+32)/86 = 74,4 % (95 % ДИ = 63,8–83,2 %).
- Количество отрицательных образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет 53/58 = 91,4 % (95 % ДИ = 80,9–97,1 %).

Общее количество образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет (32+32+53)/144 = 81,2 % (95 % ДИ =73,9–87,2 %).

**Таблица** 12. Группа 1: консенсус трех патоморфологов по баллу в IHC-анализе с использованием реагента Clone 4B5 по сравнению с FISH-анализом

| **Балл реагента** Clone 4B5 | **Результат** FISH | | |
|---|---|---|---|
| | **Положительный результат** | **Отрицательный результат** | **Всего** |
| 3+ | 55 | 3 | 58 |
| 2+ | 25 | 8 | 33 |
| 0, 1+ | 6 | 47 | 53 |
| Всего | 86 | 58 | 144 |

Группа 1: результаты IHC-анализа с реагентом Clone 4B5 и FISH-анализа в виде матрицы 2 x 2 (баллы 2 и 3 считаются положительным результатом и объединены в одну группу).

- Количество положительных образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет (55+25)/86 = 93,0 % (95 % ДИ = 87,9–96,3 %).
- Количество отрицательных образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет 47/58 = 81,0 % (95 % ДИ = 73,4–86,0 %).

Общее количество образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет (55+25+47)/144 = 88,2 % (95 % ДИ = 82,1–92,2 %).

**Таблица** 13. Группа 2: консенсус трех патоморфологов по баллу в IHC-анализе с использованием реагента PATHWAY HER-2/neu (CB11) по сравнению с FISH-анализом

| **Оценка** PATHWAY HER-2/neu (CB11) mouse monoclonal antibody | **Результат** FISH | | |
|---|---|---|---|
| | **Положительный результат** | **Отрицательный результат** | **Всего** |
| 3+ | 72 | 1 | 73 |
| 2+ | 13 | 7 | 20 |
| 0, 1+ | 8 | 77 | 85 |
| Всего | 93 | 85 | 178 |

Группа 2: результаты IHC-анализа с реагентом PATHWAY HER-2/neu (CB11) и FISH-анализа в виде матрицы 2 x 2 (баллы 2 и 3 считаются положительным результатом и объединены в одну группу).

- Количество положительных образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет (72+13)/93 = 91,3 % (95 % ДИ = 85,0–96,7 %).
- Количество отрицательных образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет 77/85 = 90,6 % (95 % ДИ = 83,9–96,3 %).

Общее количество образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет (72+13+77)/178 = 91,0 % (95 % ДИ = 86,5–94,9 %).



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

**Таблица** 14. Группа 2: консенсус трех патоморфологов по баллу в IHC-анализе с использованием реагента Clone 4B5 по сравнению с FISH-анализом

| **Балл реагента** Clone 4B5 | **Результат** FISH | | |
|---|---|---|---|
| | **Положительный результат** | **Отрицательный результат** | **Всего** |
| 3+ | 72 | 1 | 73 |
| 2+ | 11 | 7 | 18 |
| 0, 1+ | 10 | 77 | 87 |
| Всего | 93 | 85 | 178 |

Группа 2: результаты IHC-анализа с реагентом Clone 4B5 и FISH-анализа в виде матрицы 2 x 2 (баллы 2 и 3 считаются положительным результатом и объединены в одну группу).

- Количество положительных образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет (72+11)/93 = 89,2 % (95 % ДИ = 82,5–95,1 %).
- Количество отрицательных образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет 77/85 = 90,6 % (95 % ДИ = 84,0–96,4 %).

Общее количество образцов, по которым разные врачи дали одинаковое заключение, составляет (72+11+77)/178 = 90,0 % (95 % ДИ = 85,4–93,6 %).

**Воспроизводимость результатов между патоморфологами в сравнительном исследовании образцов**

Широко известно, что разные специалисты могут интерпретировать результаты иммуногистохимического анализа по-разному. В связи с этим для каждой группы образцов были задействованы по три патоморфолога (всего 6 специалистов). Результат каждого анализа определялся по баллу, который присвоен двумя из трех исследователей. Ниже представлены данные по вариабельности результатов анализа, полученных тремя патоморфологами, в сравнительном исследовании образцов каждой группы.

**Таблица** 15. Группа 1: баллы в анализах с реагентом Clone 4B5, полученные тремя патоморфологами

| **Оценка** HER2 | **Балл реагента** Clone 4B5 | | |
|---|---|---|---|
| | **Исследователь** 1 | **Исследователь** 2 | **Исследователь** 3 |
| 3+ | 72 | 70 | 73 |
| 2+ | 22 | 19 | 18 |
| 0,1+ | 80 | 89 | 87 |
| Всего | 174 | 178 | 178 |

Примечание. Оценка 3 образцов тремя патоморфологами отличалась более чем на 1 балл (составила от 0 до 2+).

Образец 1: один патоморфолог оценил как 2+, два патоморфолога оценили как 0.

Образец 2: один патоморфолог оценил как 0, два патоморфолога оценили как 2+.

Образец 3: первый патоморфолог оценил как 0, второй — как 1+, третий — как 2+.

**Таблица** 16. Группа 1: баллы в IHC-анализах с реагентом PATHWAY HER-2/neu (CB11), полученные тремя патоморфологами

| **Оценка** HER2 | **Оценка** PATHWAY HER-2/neu (CB11) mouse monoclonal antibody | | |
|---|---|---|---|
| | **Исследователь** 1 | **Исследователь** 2 | **Исследователь** 3 |
| 3+ | 72 | 75 | 73 |
| 2+ | 22 | 22 | 18 |
| 0,1+ | 80 | 81 | 87 |
| Всего | 174 | 178 | 178 |

Примечание. Оценка 1 образца тремя патоморфологами отличалась более чем на 1 балл (составила от 1+ до 3+).

Образец 1: первый патоморфолог оценил как 1+, второй — как 2+, третий — как 3+.

**Таблица** 17. Группа 2: баллы в анализах с реагентом Clone 4B5, полученные тремя патоморфологами

| **Оценка** HER2 | **Балл реагента** Clone 4B5 | | |
|---|---|---|---|
| | **Исследователь** 4 | **Исследователь** 5 | **Исследователь** 6 |
| 3 | 59 | 65 | 50 |
| 2 | 30 | 28 | 39 |
| 0,1 | 52 | 51 | 55 |
| Всего | 141 | 144 | 144 |

Примечание. Всего 6 образцов отличались более чем на один уровень шкалы (т. е. 0 и 3+) при оценке тремя патоморфологами.

Образец 1: первый патоморфолог оценил как 0, второй — как 0, третий — как 2+.

Образец 2: первый патоморфолог оценил как 1+, второй — как 1+, третий — как 3+.

Образец 3: первый патоморфолог оценил как 0, второй — как 2+, третий — как 2+.

Образцы 4 и 5: первый патоморфолог оценил как 0, второй — как 2+, третий — как 2+.

Образец 6: первый патоморфолог оценил как 0, второй — как 3+, третий — как 3+.

**Таблица** 18. Группа 2: баллы в IHC-анализах с реагентом PATHWAY HER-2/neu (CB11), полученные тремя патоморфологами

| **Оценка** HER2 | **Оценка** PATHWAY HER-2/neu (CB11) mouse monoclonal antibody | | |
|---|---|---|---|
| | **Исследователь** 4 | **Исследователь** 5 | **Исследователь** 6 |
| 3+ | 31 | 37 | 28 |
| 2+ | 38 | 32 | 47 |
| 0,1+ | 75 | 75 | 69 |
| Всего | 144 | 144 | 144 |

Примечание. Оценка 8 образцов тремя патоморфологами отличалась более чем на 1 балл (составила от 0 до 2+).

Образцы 1–6: первый патоморфолог оценил как 0, второй — как 1+, третий — как 2+.

Образцы 7 и 8: первый патоморфолог оценил как 0, второй — как 2+, третий — как 2+.



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

Ниже в таблице представлены диапазоны процентных величин одинаковых результатов в парах патоморфологов (по три пары для каждой группы)

**Таблица** 19. Диапазоны процентных величин одинаковых результатов в парах из трех патоморфологов в виде матрицы 2 x 2*

| | **Общий процент совпадения** | **Соответствие процента положительных результатов** | **Соответствие процента отрицательных результатов** |
|---|---|---|---|
| **Реагент** Clone 4B5 **в сравнении** с PATHWAY HER-2/neu (CB11) mouse monoclonal antibody | | | |
| Группа 1 | 82,6–86,9 % | 97,3–100,0 % | 68,0–75,4 % |
| Группа 2 | 88,2–95,5 % | 87,6–95,6 % | 86,1–95,4 % |
| Clone 4B5 **в сравнении** с FISH | | | |
| Группа 1 | 86,8–88,2 % | 90,7–94,2 % | 79,3–81,0 % |
| Группа 2 | 87,4–89,9 % | 88,2–90,0 % | 84,5–91,8 % |
| PATHWAY HER-2/neu (CB11) mouse monoclonal antibody **в сравнении** с FISH | | | |
| Группа 1 | 79,9–84,0 % | 73,3–80,2 % | 89,7–89,7 % |
| Группа 2 | 84,8–93,3 % | 86,7–92,5 % | 82,7–94,1 % |

* 0, 1+ — отрицательный результат; 2+ и 3+ — положительный результат.

**Заключение**. Выполненные исследования демонстрируют способность первичных антител в реагенте Clone 4B5 осуществлять специфическую и воспроизводимую окраску мембран нормальных и опухолевых клеток. Исследование по сравнению методов показало, что реактив clone 4B5 первичных антител можно использовать для оценки опухоли у пациентов с раком груди, которым планируется назначить препарат Herceptin.

9. **Результаты анализов**, **выполненных на аппарате** BenchMark ULTRA **с использованием набора для обнаружения** iVIEW DAB Detection Kit **или ultra**View Universal DAB Detection Kit.

   Воспроизводимость результата анализа, выполненного на аппарате BenchMark ULTRA, между лабораториями и между рабочими сменами. В исследованиях межлабораторной воспроизводимости приняли участие три лаборатории трех различных учреждений США. В каждую из лабораторий были переданы следующие материалы для окрашивания на аппарате BenchMark ULTRA по рекомендованному протоколу с использованием диагностического набора ultraView Universal DAB Detection Kit: 48 FFPE предметных стекол с препаратами инвазивного рака груди (по 12 препаратов каждой HER2-категории: 0, 1+, 2+ и 3+) и по 1 паре контрольных препаратов PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides на каждый из 12 циклов окрашивания. В качестве контроля использовались препараты PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides и второй препарат каждого образца, окрашенный Ig-отрицательным реагентом. Патоморфолог оценивал результаты окрашивания препаратов по предоставленной шкале (0, 1+, 2+, 3+), не имея клинических данных о случаях. Результаты были проанализированы в компании Ventana. С помощью стандартных номенклатурных таблиц 2 x 2 рассчитывалось среднее совпадение положительных результатов между лабораториями (APA) по уравнению [2a/(2a+b+c)], и среднее совпадение отрицательных результатов (ANA) по уравнению [2d/(2d+b+c)]. Значение межлабораторного APA, основанное на результате клинической оценки (положительном или отрицательном), составило 90,0 % (108/120), а ANA — 92,9 % (156/168). Для попарного сравнения лабораторий APA рассчитывалось как a/(a+c) и ANA — как d/(b+d). Значения межлабораторного APA составили 93,0 % (40/43), 87,2 % (34/39) и 89,5 % (34/38) для сравнения лабораторий A с B, A с C и B с C соответственно. Значения межлабораторного ANA составили 94,3 % (50/53), 91,2 % (52/57) и 93,1 % (54/58) для сравнения лабораторий A с B, A с C и B с C соответственно.

   Ниже в таблицах формата 3 x 3 представлены результаты балльной оценки препаратов каждым патоморфологом, баллы 2+ и 3+ учитывались раздельно.

**Таблица** 20. Частота совпадений результатов в лабораториях A и B, матрица анализов (3 x 3), выполненных на аппарате BenchMark ULTRA с реагентом Clone 4B5 и набором для обнаружения ultraView Universal DAB Detection Kit

| | **Лаборатория** B | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Лаборатория** A | 3+ | 2+ | 0, 1+ | **Всего** |
| 3+ | 12 | 2 | 0 | 14 |
| 2+ | 0 | 6 | 2 | 8 |
| 0, 1+ | 0 | 1 | 25 | 26 |
| Всего | 12 | 9 | 27 | 48 |
| **Общий процент совпадения** (OPA): n/N (%) | | | 43/48 (89,6) | |

**Таблица** 21. Частота совпадений результатов в лабораториях A и C, матрица анализов (3 x 3), выполненных на аппарате BenchMark ULTRA с реагентом Clone 4B5 и набором для обнаружения ultraView Universal DAB Detection Kit

| | **Лаборатория** C | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Лаборатория** A | 3+ | 2+ | 0, 1+ | **Всего** |
| 3+ | 12 | 1 | 1 | 14 |
| 2+ | 0 | 4 | 4 | 8 |
| 0, 1+ | 0 | 0 | 26 | 26 |
| Всего | 12 | 5 | 31 | 48 |
| **Общий процент совпадения** (OPA): n/N (%) | | | 42/48 (87,5) | |

**Таблица** 22. Частота совпадений результатов в лабораториях B и C, матрица анализов (3 x 3), выполненных на аппарате BenchMark ULTRA с реагентом Clone 4B5 и набором для обнаружения ultraView Universal DAB Detection Kit

| | **Лаборатория** C | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Лаборатория** B | 3+ | 2+ | 0, 1+ | **Всего** |
| 3+ | 12 | 0 | 0 | 12 |
| 2+ | 0 | 5 | 4 | 9 |
| 0, 1+ | 0 | 0 | 27 | 27 |
| Всего | 12 | 5 | 31 | 48 |
| **Общий процент совпадения** (OPA): n/N (%) | | | 44/48 (91,7) | |

10. BenchMark ULTRA — **воспроизводимость результата анализа**, **выполненного на аппарате между рабочими сменами**.

    Воспроизводимость результата между рабочими сменами оценивалась по 12 образцам, подобранных таким образом, чтобы каждому баллу (0, 1+, 2+ и 3+) соответствовало примерно 3 образца. Для оценки воспроизводимости результата между рабочими сменами в лаборатории C было выполнено пять циклов окрашивания на аппарате BenchMark ULTRA в течение не менее 20 дней таким образом, что разные образцы окрашивались с промежутком не менее одного дня. Средние доли одинаковых положительных и отрицательных результатов в исследовании воспроизводимости результата между рабочими сменами на основе клинической оценки после окраски реагентом Clone 4B5 составили по 100 %. Значения общего процента совпадения (OPA) для сравнения между днями, основанные на результате клинической оценки результатов окрашивания, составили 100 % как для сравнения двух дней, так и всех дней.



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

11. **Исследование по сравнению платформ окрашивания** BenchMark ULTRA **и** BenchMark XT.

В сравнительном исследовании платформ окрашивания принимали участие две лаборатории, выполнявшие окрашивание, и три лаборатории, выполнявшие анализ. Все лаборатории находились на территории США. В каждую из двух лабораторий, проводивших окраску, были переданы следующие материалы для окраски на аппаратах BenchMark XT и BenchMark ULTRA по соответствующему рекомендованному протоколу окраски с использованием набора для обнаружения ultraView Universal DAB Detection Kit: 280 FFPE предметных стекол с препаратами инвазивного рака груди (по 70 препаратов каждой HER2-категории: 0, 1+, 2+ и 3+). Эти препараты распределялись между лабораториями случайным образом по 140 образцов в каждую лабораторию. Контроли включали в себя препараты PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides и второй срез каждого образца, окрашенный Ig-отрицательным реагентом. Окрашенные препараты, полученные из обеих лабораторий, были разделены на четыре группы. Каждая группа единовременно передавалась каждому из трех квалифицированных патоморфологов в трех разных лабораториях. Патоморфологи оценивали каждый препарат и давали заключение в виде балльной оценки (т. е. 0, 1+, 2+ или 3+), не имея данных о клинических случаях и платформах окрашивания. Результаты были проанализированы в компании Ventana. Доля одинаковых положительных результатов (PPA) по клинической оценке (положительный/отрицательный результат) и нижняя граница 95 % двустороннего доверительного интервала при окраске на аппаратах BenchMark ULTRA и BenchMark XT с использованием реагента Clone 4B5 у экспертов A, B и C составила 91,6 % (85,9), 91,2 % (85,3) и 94,9 % (89,3) соответственно. Доля одинаковых отрицательных результатов (NPA) по клинической оценке (положительный/отрицательный результат) и нижняя граница 95 % двустороннего доверительного интервала при окраске на аппаратах BenchMark ULTRA и BenchMark XT с использованием реагента Clone 4B5 у экспертов A, B и C составила 91,9 % (85,8), 93,8 % (88,3) и 99,3 % (96,3) соответственно. Общая доля одинаковых результатов (OPA) по клинической оценке (положительный/отрицательный результат) при окраске на аппаратах BenchMark ULTRA и BenchMark XT с использованием реагента Clone 4B5 у экспертов A, B и C составила 91,8 %, 92,5 % и 97,4 % соответственно (рассчитано по матрице 2 x 2). Ниже в таблицах формата 3 x 3 представлены доли одинаковых результатов для разных платформ по балльной оценке (0/1+, 2+, 3+), присвоенной каждым патоморфологом.

**Таблица** 23. Частота совпадений результатов при окраске на аппаратах BenchMark ULTRA и BenchMark XT, матрица анализов 3 x 3, эксперт A

| **Аппарат** BenchMark ULTRA | **Аппарат** BenchMark XT | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Эксперт** A | 3+ | 2+ | 0, 1+ | **Всего** |
| 3+ | 84 | 11 | 1 | 96 |
| 2+ | 8 | 28 | 9 | 45 |
| 0, 1+ | 4 | 8 | 114 | 126 |
| Всего | 96 | 47 | 124 | 267 |
| **Общий процент совпадения**: n/N (%) (95 % **ДИ**) | 226/267 (84,6) (79,8–88,5) | | | |

**Таблица** 24. Частота совпадений результатов при окраске на аппаратах BenchMark ULTRA и BenchMark XT, матрица анализов 3 x 3, эксперт B

| **Аппарат** BenchMark ULTRA | **Аппарат** BenchMark XT | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Эксперт** B | 3+ | 2+ | 0, 1+ | **Всего** |
| 3+ | 64 | 2 | 1 | 67 |
| 2+ | 3 | 56 | 7 | 66 |
| 0, 1+ | 2 | 10 | 122 | 134 |
| Всего | 69 | 68 | 130 | 267 |
| **Общий процент совпадения**: n/N (%) (95 % **ДИ**) | 242/267 (90,6) (86,5-93,6) | | | |

**Таблица** 25. Частота совпадений результатов при окраске на аппаратах BenchMark ULTRA и BenchMark XT, матрица анализов 3 x 3, эксперт C

| **Аппарат** BenchMark ULTRA | **Аппарат** BenchMark XT | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Эксперт** C | 3+ | 2+ | 0, 1+ | **Всего** |
| 3+ | 64 | 1 | 0 | 65 |
| 2+ | 2 | 45 | 1 | 48 |
| 0, 1+ | 0 | 6 | 148 | 154 |
| Всего | 66 | 52 | 149 | 267 |
| **Общий процент совпадения**: n/N (%) (95 % **ДИ**) | 257/267 (96,3) (93,2-98,0) | | | |

12. **Воспроизводимость результатов между патоморфологами в сравнительном исследовании платформ**.

Рассчитаны доли одинаковых положительных и отрицательных результатов с двухсторонними 95 % доверительными интервалами для шести возможных пар патоморфологов для каждой платформы.

Для аппарата BenchMark ULTRA значения PPA при сравнении экспертов A с B, A с C, B с C, B с A, C с A и C с B составили 94,7 % (126/133), 98,2 % (111/113), 98,2 % (111/113), 89,4 % (126/141), 78,7 % (111/141) и 83,5 % (111/133) соответственно. Значения NPA при сравнении экспертов A с B, A с C, B с C, B с A, C с A и C с B составили 88,8 % (119/134), 80,5 % (124/154), 85,7 % (132/154), 94,4 % (119/126), 98,4 % (124/126) и 98,5 % (132/134) соответственно. Общая доля одинаковых результатов (OPA) была наибольшей у пары экспертов A-B (91,8 %); в остальных парах эта доля была ниже и составила для пары B-C — 91,0 %, для пары A-C — 88,8 %.

Для аппарата BenchMark XT значения PPA при сравнении экспертов A с B, A с C, B с C, B с A, C с A и C с B составили 94,9% (130/137), 98,3% (116/118), 98,3% (116/118), 90,9% (130/143), 81,1% (116/143) и 84,7% (116/137) соответственно. Значения NPA при сравнении экспертов A с B, A с C, B с C, B с A, C с A и C с B составили 90,0 % (117/130), 81,9 % (122/149), 85,9 % (128/149), 94,4 % (117/124), 98,4 % (122/124) и 98,5 % (128/130) соответственно. Общая доля одинаковых результатов (OPA) была наибольшей у пары экспертов A-B (92,5%); в остальных парах эта доля была ниже и составила для пары B-C — 91,4 %, для пары A-C — 89,1%.



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

13. **Исследование по сравнению наборов для обнаружения** iVIEW DAB Detection Kit **и ultra**View Universal DAB Detection Kit.

В лаборатории 1 проведено исследование по сравнению наборов для обнаружения iVIEW DAB Detection Kit и ultraView Universal DAB Detection Kit. Исследование проведено на группе из 140 FFPE препаратов инвазивного рака груди (примерно по 35 образцов каждой HER2-категории — 0, 1+, 2+ и 3+). Препараты окрашивались на аппарате BenchMark ULTRA с использованием реагента Clone 4B5. В сравнительном исследовании наборов для обнаружения принимала участие одна лаборатория, выполнявшая окрашивание, и три лаборатории, выполнявшие анализ. Все лаборатории находились на территории США. Доля одинаковых положительных результатов (PPA) по клинической оценке (положительный/отрицательный результат) при использовании наборов для обнаружения iVIEW DAB Detection Kit и ultraView Universal DAB Detection Kit (окраска на аппарате BenchMark ULTRA с помощью реагента Clone 4B5) у экспертов A, B и C составила 95,8 % (68/71), 96,9 % (63/65) и 96,5 % (55/57) соответственно. Доля одинаковых отрицательных результатов (NPA) при использовании разных наборов для обнаружения у экспертов A, B и C составила 90,8 % (59/65), 91,5 % (65/71) и 97,5 % (77/79) соответственно. Общая доля одинаковых результатов (OPA) при использовании разных наборов для обнаружения у экспертов A, B и C составила 93,4 % (127/136), 94,1 % (128/136) и 97,1 % (132/136) соответственно. Ниже в таблицах формата 3 x 3 представлены доли одинаковых результатов по балльной оценке (0/1+, 2+, 3+) при использовании разных наборов для обнаружения. Результаты приведены по каждому патоморфологу.

**Таблица** 26. Частота совпадений результатов при использовании наборов для обнаружения iVIEW DAB Detection Kit и ultraView Universal DAB Detection Kit (окраска на аппарате BenchMark ULTRA с использованием реагента Clone 4B5), матрица анализов 3 x 3, эксперт A

| iVIEW DAB Detection Kit | **ultra**View Universal DAB Detection Kit | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Эксперт** A | 3+ | 2+ | 0, 1+ | **Всего** |
| 3+ | 43 | 5 | 0 | 48 |
| 2+ | 3 | 17 | 6 | 26 |
| 0, 1+ | 0 | 3 | 59 | 62 |
| Всего | 46 | 25 | 65 | 136 |
| **Общий процент совпадения**: n/N (%) (95 % **ДИ**) | | | 119/136 (87,5) (80,9-92,0) | |

**Таблица** 27. Частота совпадений результатов при использовании наборов для обнаружения iVIEW DAB Detection Kit и ultraView Universal DAB Detection Kit (окраска на аппарате BenchMark ULTRA с использованием реагента Clone 4B5), матрица анализов 3 x 3, эксперт B

| iVIEW DAB Detection Kit | **ultra**View Universal DAB Detection Kit | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Эксперт** B | 3+ | 2+ | 0, 1+ | **Всего** |
| 3+ | 32 | 0 | 0 | 32 |
| 2+ | 0 | 31 | 6 | 37 |
| 0, 1+ | 1 | 1 | 65 | 67 |
| Всего | 33 | 32 | 71 | 136 |
| **Общий процент совпадения**: n/N (%) (95 % **ДИ**) | | | 128/136 (94,1) (88,8-97,0) | |

**Таблица** 28. Частота совпадений результатов при использовании наборов для обнаружения iVIEW DAB Detection Kit и ultraView Universal DAB Detection Kit (окраска на аппарате BenchMark ULTRA с использованием реагента Clone 4B5), матрица анализов 3 x 3, эксперт C

| iVIEW DAB Detection Kit | **ultra**View Universal DAB Detection Kit | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Эксперт** C | 3+ | 2+ | 0, 1+ | **Всего** |
| 3+ | 32 | 0 | 0 | 32 |
| 2+ | 0 | 23 | 2 | 25 |
| 0, 1+ | 0 | 2 | 77 | 79 |
| Всего | 32 | 25 | 79 | 136 |
| **Общий процент совпадения**: n/N (%) (95 % **ДИ**) | | | 132/136 (97,1) (92,7-98,9) | |

14. **Воспроизводимость результата между патоморфологами в исследовании по сравнению наборов для обнаружения**.

Значения совпадения отрицательных и положительных результатов и двухстороннего 95 % доверительного интервала рассчитывались для шести возможных парных сравнений между экспертами для каждого набора.

При использовании набора для обнаружения iVIEW DAB Detection Kit доля одинаковых положительных результатов (PPA) в парах экспертов A-B, A-C, B-C, B-A, C-A и C-B составила 100,0 % (69/69), 98,2 % (56/57), 96,5 % (55/57), 93,2 % (69/74), 75,7 % (56/74) и 79,7 % (55/69) соответственно. Значения NPA при сравнении экспертов A с B, A с C, B с C, B с A, C с A и C с B составили 92,5 % (62/67), 77,2 % (61/79), 82,3 % (65/79), 100,0 % (62/62), 98,4 % (61/62) и 97,0 % (65/67) соответственно. Самое высокое значение OPA было получено при сравнении экспертов A с B (96,3 %), а самое низкое — экспертов A с C (86,0 %) и B с C (88,2 %).

При использовании набора для обнаружения ultraView Universal DAB Detection Kit, доля одинаковых положительных результатов (PPA) в парах экспертов A-B, A-C, B-C, B-A, C-A и C-B составила 96,9 % (63/65), 98,2 % (56/57), 98,2 % (56/57), 88,7 % (63/71), 78,9 % (56/71) и 86,2 % (56/65) соответственно. Значения NPA при сравнении экспертов A с B, A с C, B с C, B с A, C с A и C с B составили 88,7 % (63/71), 81,0 % (64/79), 88,6 % (70/79), 96,9 % (63/65), 98,5 % (64/65) и 98,6 % (70/71), соответственно. Значения общего совпадения для каждой пары экспертов были схожи: 92,6 % (126/136), 88,2 % (120/136) и 92,6 % (126/136) для экспертов A с B, A с C и B с C соответственно.

### Рабочие характеристики при анализе препаратов рака желудка

1. Воспроизводимость результата между циклами окраски в аппарате BenchMark XT проверялась в пяти циклах, выполненных в течение 5 непоследовательных дней. Исследование пяти препаратов из трех образцов тканей желудка со степенью экспрессии белка HER2 0, 1+, 2+ и 3+ показало 100 % совпадение результатов по клинической оценке (положительный/отрицательный результат) для каждого образца.
2. Воспроизводимость результата внутри цикла окраски на аппарате BenchMark XT оценивалась по 28 препаратам, приготовленным из трех образцов тканей желудка со степенью экспрессии белка HER2 0, 1+, 2+ и 3+. Результаты оценки всех препаратов по категориям «положительный/отрицательный результат» были одинаковыми для каждого образца.

   Воспроизводимость результата внутри платформы оценивалась на трех аппаратах BenchMark XT. Исследование 30 препаратов из двух многотканевых блоков, содержащих три образца тканей желудка со степенью экспрессии белка HER2 0, 1+, 2+ и 3+, показало полное совпадение результатов по клинической оценке (положительный/отрицательный результат) для каждого образца.

   Воспроизводимость результата внутри платформы оценивалась на трех аппаратах BenchMark ULTRA. Результаты оценки всех 15 препаратов из многотканевого блока по категориям «положительный/отрицательный результат» были одинаковыми для каждого образца.



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

Воспроизводимость результата между платформами оценивалась на трех аппаратах BenchMark XT и трех аппаратах BenchMark ULTRA. Результаты оценки всех 30 препаратов из многотканевого блока по категориям «положительный/отрицательный результат» были одинаковыми для каждого образца.

3. **Сравнение наборов для обнаружения** iVIEW DAB Detection Kit **и** **ultra**View Universal DAB Detection Kit **при анализе препаратов рака желудка**.

   В исследовании по сравнению наборов для обнаружения iVIEW DAB Detection Kit и ultraView Universal DAB Detection Kit на двух аппаратах (BenchMark XT и BenchMark ULTRA) использовался реагент Clone 4B5. Исследование проведено на 210 образцах тканей. Оценка проводилась по категориям «положительный/отрицательный результат».

   Пригодность препаратов по морфологии и окрашиванию фона составила 100 % по каждому набору для обнаружения и каждому аппарату. Ниже в таблицах представлены результаты прямого сравнения количества положительных и отрицательных результатов по каждому набору для обнаружения и каждому аппарату.

**Таблица** 29. Клинические результаты анализов, выполненных с использованием наборов для обнаружения ultraView Universal DAB Detection Kit и iVIEW DAB Detection Kitна иммуногистостейнере BenchMark XT

| **ultra**View Universal DAB Detection Kit | iVIEW DAB Detection Kit | | |
|---|---|---|---|
| | **Положительный результат** | **Отрицательный результат** | **Всего** |
| Положительный результат | 21 | 0 | 21 |
| Отрицательный результат | 0 | 189 | 189 |
| Всего | 21 | 189 | 210 |
| | n/N | % | |
| Соответствие процента положительных результатов | 21/21 | 100 | |
| Соответствие процента отрицательных результатов | 189/189 | 100 | |
| Общий процент совпадения | 210/210 | 100 | |

**Таблица** 30. Клинические результаты анализов, выполненных с использованием набора для обнаружения ultraView Universal DAB Detection Kit на платформах окрашивания BenchMark XT и BenchMark ULTRA.

| BenchMark XT **с набором для обнаружения** **ultra**View Universal DAB Detection Kit | BenchMark ULTRA **с набором для обнаружения** **ultra**View Universal DAB Detection Kit | | |
|---|---|---|---|
| | **Положительный результат** | **Отрицательный результат** | **Всего** |
| Положительный результат | 20 | 1 | 21 |
| Отрицательный результат | 0 | 189 | 189 |
| Всего | 20 | 190 | 210 |
| | n/N | % (95 % **ДИ**) | |

| BenchMark XT **с набором для обнаружения** **ultra**View Universal DAB Detection Kit | BenchMark ULTRA **с набором для обнаружения** **ultra**View Universal DAB Detection Kit | | |
|---|---|---|---|
| | **Положительный результат** | **Отрицательный результат** | **Всего** |
| Соответствие процента положительных результатов | 20/20 | 100 (83,9-100) | |
| Соответствие процента отрицательных результатов | 189/190 | 99,5 (97,1-99,9) | |
| Общий процент совпадения | 209/210 | 99,5 (97,4-99,9) | |

4. **Сравнение реактива** Clone 4B5 **с набором** HercepTest **для анализа препаратов рака желудка**:

   Было проведено слепое исследование по сравнению результатов окрашивания препаратов при использовании реагента Clone 4B5 на аппарате BenchMark XT и на тестовой системе Dako HercepTest. Проведен анализ примерно 239 образцов раков желудка. Использованы также данные анализа 159 образцов в лаборатории TARGOS в рамках исследования ToGA, в котором изучалась связь HER2-статуса и результатов лечения препаратом Herceptin. В лаборатории препараты окрашивались реагентом Clone 4B5 и реагентом HercepTest. Патоморфолог оценивал результат по шкале 0/1+, 2+ и 3+. Баллы 2+ и 3+ считались положительным результатом; баллы 0 и 1+ — отрицательным.

   В таблицах 29 и 30 представлена частота совпадения результатов при использовании реагента Clone 4B5 и реагента HercepTest в разрезе источников материала для анализа. В таблице 29 приведены сравнения по категориям «положительный/отрицательный результат»; в таблице 30 — по трехбалльной шкале IHC-анализа 0/1+, 2+ и 3+. Общая доля одинаковых результатов для всех образцов по данным таблиц 28 и 29 составляет 91,0 и 95,3 % соответственно.

**Таблица** 31. Доли одинаковых результатов и 95 % ДИ при использовании реагента Clone 4B5 (IHC) и реагента HercepTest в разрезе источников материала для анализа. Результаты в обеих IHC-методиках оценивались как положительный или отрицательный результат (0/1+ в сравнении с 2+/3+)

| n | **Общий процент совпадений результатов** (95 % **ДИ**) | n | **Процент совпадений положительных результатов** (95 % **ДИ**) | n | **Процент совпадений отрицательных результатов** (95 % **ДИ**) |
|---|---|---|---|---|---|
| 362/398 | 91,0 (87,7-93,4) | 46/56 | 82,1 (70,2-90,0) | 316/342 | 92,4 (89,1-94,8) |

**Таблица** 32. Общая доля одинаковых результатов и 95 % ДИ при использовании реагента Clone 4B5 (IHC) и реагента HercepTest в разрезе источников материала для анализа. Результаты в обеих IHC-методиках оценивались по шкале 0/1+, 2+, 3+

| **Источник материала для анализа** | n | **Общий процент совпадений результатов** (95 % **ДИ**) |
|---|---|---|
| TMA и ToGA | 355/398 | 89,2 (85,8-91,9) |



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

5. **Воспроизводимость результата между лабораториями при использовании реагента** Clone 4B5.

Проведено исследование с участием трех лабораторий. Образцы отбирались на основе балльной оценки, разработанной для IHC-анализа с реагентом Clone 4B5, таким образом, чтобы в выборку попало приблизительно равное количество положительных (3+) и отрицательных (0, 1+) образцов. Кроме того, использовались до четырех образцов рака желудка с баллом 2+.

В каждой лаборатории из трех выполнялось по четыре цикла окрашивания на аппаратах BenchMark XT и BenchMark ULTRA. Образцы группировались для каждого цикла случайным образом с помощью процедуры стратифицированной рандомизации, в результате которой в каждый цикл попадали образцы рака желудка каждой категории HER2-статуса. Циклы окраски на каждом аппарате в каждой лаборатории проводились с загрузкой одинакового набора образцов. В каждой лаборатории на аппарате BenchMark ULTRA выполнялось параллельное окрашивание препаратов каждого образца реагентом Clone 4B5 и реагентом для отрицательного контроля CONFIRM Negative Control Rabbit Ig. Вторая пара препаратов этого же образца аналогичным образом окрашивалась на аппарате BenchMark XT. Окрашенные препараты в каждой лаборатории оценивались одним патоморфологом, не знающим результат IHC-анализа заранее.

Общая доля одинаковых результатов для всех препаратов, окрашенных на каждом аппарате (BenchMark ULTRA и BenchMark XT), при сравнении между собой каждой из трех лабораторий составила 100 %. В каждой из трех лабораторий общая доля одинаковых результатов при сравнении аппаратов BenchMark ULTRA и BenchMark XT составила 100 %. Пригодность препаратов по морфологии и окрашиванию фона составила 100 % для обеих платформ в лабораториях A и C и > 95 % для обеих платформ в лаборатории B. Данные см. ниже в таблицах.

**Таблица** 33. Общая доля одинаковых результатов в разных лабораториях по всем исследованным образцам

| **Аппарат** BenchMark ULTRA | **Общая доля одинаковых результатов** |
|---|---|
| Сравнение лабораторий A и B: n/N (%) (95 % ДИ) | 30/30 (100 %) (88,6–100) |
| Сравнение лабораторий A и C: n/N (%) (95 % ДИ) | 30/30 (100 %) (88,6–100) |
| Сравнение лабораторий B и C: n/N (%) (95 % ДИ) | 30/30 (100 %) (88,6–100) |
| **Аппарат** BenchMark XT | **Общая доля одинаковых результатов** |
| Сравнение лабораторий A и B: n/N (%) (95 % ДИ) | 31/31 (100 %) (89,0–100,0) |
| Сравнение лабораторий A и C: n/N (%) (95 % ДИ) | 31/31 (100 %) (89,0–100,0) |
| Сравнение лабораторий B и C: n/N (%) (95 % ДИ) | 31/31 (100 %) (89,0–100,0) |

**Таблица** 34. Общая доля одинаковых результатов на разных платформах по всем исследованным образцам

| **Сравнение аппаратов** BenchMark ULTRA **и** BenchMark XT | **Общая доля одинаковых результатов** |
|---|---|
| Лаборатория A: n/N (%) (95 % ДИ) | 40/40 (100 %) (91,2–100) |
| Лаборатория B: n/N (%) (95 % ДИ) | 34/34 (100 %) (89,8–100) |
| Лаборатория C: n/N (%) (95 % ДИ) | 32/32 (100 %) (89,3–100) |

**Таблица** 35. Пригодность препаратов по морфологии и окрашиванию фона по всем образцам

| **Аппарат** BenchMark ULTRA | **Лаборатория** A | **Лаборатория** B | **Лаборатория** C |
|---|---|---|---|
| Доля препаратов, пригодных по морфологии | 44/44 (100 %) | 43/44 (97,7 %) | 44/44 (100 %) |
| Доля препаратов, пригодных по окрашиванию фона | 44/44 (100 %) | 42/44 (95,5%) | 44/44 (100 %) |
| **Аппарат** BenchMark XT | **Лаборатория** A | **Лаборатория** B | **Лаборатория** C |
| Доля препаратов, пригодных по морфологии | 44/44 (100 %) | 43/44 (97,7 %) | 44/44 (100 %) |
| Доля препаратов, пригодных по окрашиванию фона | 44/44 (100 %) | 43/44 (97,7 %) | 44/44 (100 %) |

6. **Исследование по сравнению платформ окрашивания** BenchMark **и** BenchMark GX **с платформой** BenchMark XT.

Препараты трех микромассивов тканей (TMA), состоящих из образцов рака желудка FFPE (примерно по 50 образцов на каждый микромассив) окрашивались на аппаратах BenchMark XT, BenchMark и BenchMark GX по протоколам, рекомендованным для наборов для обнаружения ultraView Universal DAB Detection Kit и iVIEW DAB Detection Kit. В качестве контроля использовались препараты PATHWAY HER-2 4 in 1 Control Slides и второй препарат микромассивов тканей, окрашенный реагентом иммуноглобулина для отрицательного контроля. Окрашенные препараты оценивались одним патоморфологом.

Отмечены следующие общие доли одинаковых результатов по категориям «положительный/отрицательный результат» и следующие нижние границы двухсторонних 95 % доверительных интервалов при окраске реагентом Clone 4B5: аппарат BenchMark в сравнении с аппаратом BenchMark XT при использовании набора для обнаружения ultraView Universal DAB Detection Kit — 98,0 % (94,2–99,3), аппарат BenchMark GX в сравнении с аппаратом BenchMark XT при использовании набора для обнаружения ultraView Universal DAB Detection Kit — 97,4 % (93,6–99,0), аппарат BenchMark в сравнении с аппаратом BenchMark XT при использовании набора для обнаружения iVIEW DAB Detection Kit — 96,6 % (92,7–98,4), аппарат BenchMark GX в сравнении с аппаратом BenchMark XT при использовании набора для обнаружения iVIEW DAB Detection Kit — 95,9 % (91,8–98,0).

Отмечены следующие доли одинаковых положительных результатов по категориям «положительный/отрицательный результат» и следующие нижние границы двухсторонних 95 % доверительных интервалов при окраске реагентом Clone 4B5: аппарат BenchMark в сравнении с аппаратом BenchMark XT при использовании набора для обнаружения ultraView Universal DAB Detection Kit — 91,7% (64,4-98,5), аппарат BenchMark GX в сравнении с аппаратом BenchMark XT при использовании набора для обнаружения ultraView Universal DAB Detection Kit — 78,6% (52,4-92,4), аппарат BenchMark в сравнении с аппаратом BenchMark XT при использовании набора для обнаружения iVIEW DAB Detection Kit — 80,0% (54,8-93,0), аппарат BenchMark GX в сравнении с аппаратом BenchMark XT при использовании набора для обнаружения iVIEW DAB Detection Kit — 73,3% (48,0-89,1).

Отмечены следующие доли одинаковых отрицательных результатов по категориям «положительный/отрицательный результат» и следующие нижние границы двухсторонних 95 % доверительных интервалов при окраске реагентом Clone 4B5: аппарат BenchMark в сравнении с аппаратом BenchMark XT при использовании набора для обнаружения ultraView Universal DAB



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

Detection Kit — 98,5% (94,8-99,6), аппарат BenchMark GX в сравнении с аппаратом BenchMark XT при использовании набора для обнаружения ultraView Universal DAB Detection Kit — 99,3% (96,1-99,9), аппарат BenchMark в сравнении с аппаратом BenchMark XT при использовании набора для обнаружения iVIEW DAB Detection Kit — 98,1% (94,6-99,4), аппарат BenchMark GX в сравнении с аппаратом BenchMark XT при использовании набора для обнаружения iVIEW DAB Detection Kit — 98,1% (94,5-99,3). Ниже в таблицах формата 2 x 2 представлены доли одинаковых результатов по категориям «положительный/отрицательный результат» при использовании разных аппаратов.

**Таблица** 36. Частота совпадений результатов при окраске препаратов на аппаратах BenchMark и BenchMark XT с использованием набора для обнаружения ultraView Universal DAB Detection Kit, матрица анализов 2 x 2

| Clone 4B5 **с использованием набора ultra**View Universal DAB Detection Kit | | | |
|---|---|---|---|
| | **Аппарат** BenchMark XT | | |
| **Аппарат** BenchMark | **Положительный результат** | **Отрицательный результат** | **Всего** |
| Положительный результат | 11 | 2 | 13 |
| Отрицательный результат | 1 | 133 | 134 |
| Всего | 12 | 135 | 147 |
| | n/N | % (95 % **ДИ**) | |
| Общий процент совпадения | 144/147 | 98,0% (94,2-99,3) | |
| Соответствие процента положительных результатов | 11/12 | 91,7% (64,6-98,5) | |
| Соответствие процента отрицательных результатов | 133/135 | 98,5% (94,8-99,6) | |

**Таблица** 37. Частота совпадений результатов при окраске препаратов на аппаратах BenchMark GX и BenchMark XT с использованием набора для обнаружения ultraView Universal DAB Detection Kit, матрица анализов 2 x 2

| Clone 4B5 **с использованием набора ultra**View Universal DAB Detection Kit | | | |
|---|---|---|---|
| | **Аппарат** BenchMark XT | | |
| **Аппарат** BenchMark GX | **Положительный результат** | **Отрицательный результат** | **Всего** |
| Положительный результат | 11 | 1 | 12 |
| Отрицательный результат | 3 | 140 | 143 |
| Всего | 14 | 141 | 155 |
| | n/N | % (95 % **ДИ**) | |
| Общий процент совпадения | 151/155 | 97,4% (93,6-99,0) | |
| Соответствие процента положительных результатов | 11/14 | 78,6% (52,4-92,4) | |
| Соответствие процента отрицательных результатов | 140/141 | 99,3% (96,1-99,9) | |

**Таблица** 38. Частота совпадений результатов при окраске препаратов на аппаратах BenchMark и BenchMark XT с использованием набора для обнаружения iVIEW DAB Detection Kit, матрица анализов 2 x 2

| Clone 4B5 **с использованием набора** iVIEW DAB Detection Kit | | | |
|---|---|---|---|
| | **Аппарат** BenchMark XT | | |
| **Аппарат** BenchMark | **Положительный результат** | **Отрицательный результат** | **Всего** |
| Положительный результат | 12 | 3 | 15 |
| Отрицательный результат | 3 | 156 | 159 |
| Всего | 15 | 159 | 174 |
| | n/N | % (95 % **ДИ**) | |
| Общий процент совпадения | 168/174 | 96,6% (92,7-98,4) | |
| Соответствие процента положительных результатов | 12/15 | 80,0% (54,8-93,0) | |
| Соответствие процента отрицательных результатов | 156/159 | 98,1% (94,6-99,4) | |

**Таблица** 39. Частота совпадений результатов при окраске препаратов на аппаратах BenchMark GX и BenchMark XT с использованием набора для обнаружения iVIEW DAB Detection Kit, матрица анализов 2 x 2

| Clone 4B5 **с использованием набора** iVIEW DAB Detection Kit | | | |
|---|---|---|---|
| | **Аппарат** BenchMark XT | | |
| **Аппарат** BenchMark GX | **Положительный результат** | **Отрицательный результат** | **Всего** |
| Положительный результат | 11 | 3 | 14 |
| Отрицательный результат | 4 | 154 | 158 |
| Всего | 15 | 157 | 172 |
| | n/N | % (95 % **ДИ**) | |
| Общий процент совпадения | 165/172 | 95,9% (91,8-98,0) | |
| Соответствие процента положительных результатов | 11/15 | 73,3% (48,0-89,1) | |
| Соответствие процента отрицательных результатов | 154/157 | 98,1% (94,5-99,3) | |

Заключение. Выполненные исследования демонстрируют способность VENTANA HER2 (4B5) antibody осуществлять специфическую воспроизводимую окраску тканей рака груди и желудка. Исследование воспроизводимости результатов при использовании разных наборов для обнаружения и при проведении анализа в разных лабораториях показало, что VENTANA HER2 (4B5) antibody можно использовать для оценки опухоли у пациентов с раком груди или желудка, которым планируется назначить препарат Herceptin.



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

## Рабочие характеристики: PERJETA и KADCYLA

HER2 Breast — Исследование по сравнению методов для теста включения исследований препаратов PERJETA и KADCYLA при раке груди

Эквивалентность тестов включения для групп в рамках исследований препаратов PERJETA и KADCYLA была определена с помощью окрашивания опытных образцов тестом VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody. 2753 проанализированных образца для испытания PERJETA и 99 проанализированных образцов для испытания KADCYLA были окрашены антителом VENTANA anti-HER2/neu (4B5) antibody. Были определены процент совпадения положительных (PPA) и отрицательных результатов (NPA) и общая доля одинаковых результатов (OPA). 95 % ДИ (двусторонний 95 % доверительный интервал) был рассчитан с использованием метода оценки.

**Таблица** 40. Совпадение реагента Clone 4B5 и тестов Dako по HER2-статусу для всех исследуемых объектов HER2 IHC-исследуемые объекты имеют положительный или отрицательный статус HER2, что определено как тестом Clone 4B5, так и IHC-тестом включения.

| | | Dako HER2-**статус** [a] [b] | | |
|---|---|---|---|---|
| **Исследование** | **Балл реагента** Clone 4B5 [b] | **Положительный результат** | **Отрицательный результат** | **Всего** |
| PERJETA и KADCYLA | 3+ | 2380 | 15 | 2395 |
| | 2+ | 140 | 122 | 262 |
| | 0/1+ | 38 | 135 | 173 |
| | Всего | 2558 | 272 | 2830 |
| | Процент совпадений положительных результатов (PPA) n/N (%) (95 % ДИ) | 2380/2558 (93,0) (92,0–94,0) | | |
| | Процент совпадений отрицательных результатов (NPA) n/N (%) (95 % ДИ) | 257/272 (94,5) (91,1–96,6) | | |
| | Общий процент совпадений результатов (OPA) n/N (%) (95 % ДИ) | 2637/2830 (93,2) (92,2–94,1) | | |

[a] Положительно = положительный результат IHC-анализа и (или) амплификация методом ISH. Отрицательно = отрицательный результат IHC-анализа и отсутствие амплификации методом ISH или без амплификации методом ISH и неположительный результат IHC-анализа.

[b] IHC-анализ: положительно = 3+; отрицательно = 0, 1+ или 2+.

**Таблица** 41. Совпадение реагента Clone 4B5 и тестов Dako по статусу IHC для всех IHC-исследуемых объектов IHC-исследуемые объекты имеют положительный или отрицательный статус HER2, что определено как реагентом Clone 4B5, так и IHC-тестом включения.

| | | Dako HercepTest: **статус** [a] | | |
|---|---|---|---|---|
| **Исследование** | **Статус** Clone 4B5 [a] | **Положительный результат** | **Отрицательный результат** | **Всего** |
| PERJETA и KADCYLA | Положительный результат | 2330 | 65 | 2395 |
| | Отрицательный результат | 21 | 414 | 435 |
| | Всего | 2351 | 479 | 2830 |
| | Процент совпадений положительных результатов (PPA) n/N (%) (95 % ДИ) | 2330/2351 (99,1) (98,6-99,4) | | |
| | Процент совпадений отрицательных результатов (NPA) n/N (%) (95 % ДИ) | 414/479 (86,4) (83,1-89,2) | | |
| | Общий процент совпадений результатов (OPA) n/N (%) (95 % ДИ) | 2744/2830 (97,0) (96,3-97,5) | | |
| PERJETA | Положительный результат | 2267 | 63 | 2330 |
| | Отрицательный результат | 10 | 399 | 409 |
| | Всего | 2277 | 462 | 2739 |
| | Процент совпадений положительных результатов (PPA) n/N (%) (95 % ДИ) | 2267/2277 (99,6) (99,2-99,8) | | |
| | Процент совпадений отрицательных результатов (NPA) n/N (%) (95 % ДИ) | 399/462 (86,4) (82,9-89,2) | | |
| | Общий процент совпадений результатов (OPA) n/N (%) (95 % ДИ) | 2666/2739 (97,3) (96,7-97,9) | | |
| KADCYLA | Положительный результат | 63 | 2 | 65 |
| | Отрицательный результат | 11 | 15 | 26 |
| | Всего | 74 | 17 | 91 |
| | Процент совпадений положительных результатов (PPA) n/N (%) (95 % ДИ) | 63/74 (85,1) (75,3-91,5) | | |
| | Процент совпадений отрицательных результатов (NPA) n/N (%) (95 % ДИ) | 15/17 (88,2) (65,7-96,7) | | |
| | Общий процент совпадений результатов (OPA) n/N (%) (95 % ДИ) | 78/91 (85,7) (77,1-91,5) | | |

[a] Положительно = 3+; отрицательно = 0, 1+ или 2+.



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

**Таблица** 42. Совпадение реагента Clone 4B5 и тестов Dako по баллу IHC для всех IHC-исследуемых объектов IHC-исследуемые объекты имеют положительный или отрицательный статус HER2, что определено как тестом Clone 4B5, так и IHC-тестом включения.

| | | Dako HercepTest: **оценка** | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Исследование** | **Балл реагента** Clone 4B5 | 3+ | 2+ | 0/1+ | **Всего** |
| PERJETA и KADCYLA | 3+ | 2330 | 64 | 1 | 2395 |
| | 2+ | 12 | 235 | 15 | 262 |
| | 0/1+ | 9 | 26 | 138 | 173 |
| | Всего | 2351 | 325 | 154 | 2830 |
| | Общий процент совпадений результатов (OPA) n/N (%) (95 % ДИ) | 2703/2830 (95,5) (94,7-96,2) | | | |
| PERJETA | 3+ | 2267 | 62 | 1 | 2330 |
| | 2+ | 9 | 226 | 13 | 248 |
| | 0/1+ | 1 | 24 | 136 | 161 |
| | Всего | 2277 | 312 | 150 | 2739 |
| | Общий процент совпадений результатов (OPA) n/N (%) (95 % ДИ) | 2629/2739 (96,0) (95,2-96,7) | | | |
| KADCYLA | 3+ | 63 | 2 | 0 | 65 |
| | 2+ | 3 | 9 | 2 | 14 |
| | 0/1+ | 8 | 2 | 2 | 12 |
| | Всего | 74 | 13 | 4 | 91 |
| | Общий процент совпадений результатов (OPA) n/N (%) (95 % ДИ) | 74/91 (81,3) (72,1-88,0) | | | |

**Таблица** 43. Пригодность по окрашиванию Clone 4B5. IHC-исследованные объекты. IHC-окрашивание считается пригодным, если можно определить достоверный балл IHC-анализа (0, 1+, 2+ или 3+). Основания для непригодности окрашивания включают в себя неприемлемые отрицательные контрольные образцы, потерю ткани, незначительную опухоль, неудовлетворительное окрашивание фона и непригодность по морфологии

| **Параметр** | PERJETA | KADCYLA | PERJETA и KADCYLA |
|---|---|---|---|
| Количество первоначальных IHC-тестов | 2753 | 99 | 2852 |
| Первоначальная пригодность по окрашиванию n/N (%) (95 % ДИ) | 2708/2753 (98,4) (97,8, 98,8) | 92/99 (92,9) (86,1, 96,5) | 2800/2852 (98,2) (97,6, 98,6) |
| Количество повторных IHC-тестов | 40 | 0 | 40 |
| Итоговая пригодность по окрашиванию n/N (%) (95 % ДИ) | 2746/2753 (99,7) (99,5, 99,9) | 92/99 (92,9) (86,1, 96,5) | 2838/2852 (99,5) (99,2, 99,7) |

### Точность

Исследования прецизионности для VENTANA HER2 (4B5) antibody проводились с целью определения:

- Прецизионности антитела между партиями.
- Прецизионности цикла и суточной прецизионности на аппарате BenchMark XT IHC/ISH.
- Прецизионности между аппаратами — на аппаратах BenchMark GX, BenchMark XT и BenchMark ULTRA IHC/ISH.
- Прецизионности между платформами — на аппаратах BenchMark GX, BenchMark XT и BenchMark ULTRA IHC/ISH.

Все исследования соответствовали критериям приемлемости.

## ПРОБЛЕМЫ И ИХ УСТРАНЕНИЕ

1. Если окрашивание положительного контроля слабее ожидаемого, следует проверить другие положительные контроли, окрашенные во время того же цикла на приборе, чтобы определить, является ли причиной первичное антитело или один из вторичных реагентов.
2. Если положительный контроль дает отрицательный результат, следует проверить, что этикетка на микропрепарате имеет надлежащий штрихкод. Если этикетка наклеена на микропрепарат надлежащим образом, следует проверить другие положительные контроли, окрашенные во время того же цикла на приборе, чтобы определить, является ли причиной первичное антитело или один из вторичных реагентов. Причиной может быть ненадлежащий отбор, фиксация или депарафинирование тканей. При отборе, хранении и фиксации следует соблюдать надлежащую процедуру.
3. Причиной отсутствия окрашивания может быть неполное удаление парафина. В таком случае следует повторить процедуру депарафинизации.
4. Если специфическое иммунологическое окрашивание слишком интенсивно, следует повторить цикл окраски с меньшим временем инкубации до достижения требуемой интенсивности.
5. Если срезы ткани смываются с предметного стекла, необходимо убедиться, что стекла положительно заряжены.
6. Если окрашивание цитоплазмы и ядер наблюдается в клетках нормальной слизистой оболочки вблизи с клетками рака желудка, и такое окрашивание затрудняет интерпретацию окрашивания мембран, можно выполнить другой анализ — ISH.
7. Способы устранения проблем см. в разделе «Step By Step Procedure» (Пошаговая процедура) в руководстве оператора к аппарату. Соответствующую информацию также можно получить у представителя службы поддержки в своем регионе.

## ССЫЛКИ


1. Akiyama T, et al. The product of the human c-erbB-2 Gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. Science. 1986;232: 1644-1646.
2. Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh C, King RC. Overexpression of EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. EMBO. 1987; 6: 605-610.
3. Dickson RB, and Lippman ME. Genes, Oncogenes, and Hormones. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1992.
4. Keatings, L. et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. Histopathology. 1990;17: 234-247.
5. Herceptin (Trastuzamab) [Package Insert]. EMEA (European Medicines Agency). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf. Published 01/03/2010. Updated 04/02/2011. Accessed October 2010.
6. Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, Bianchi G, Cortes J, McNally VA, Ross GA, Fumoleau P, Gianni L. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. J Clin Oncol. 2010 Mar 1;28(7):1138-44.





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

7. Swain SM, Kim SB, Cortés J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, Ciruelos E, Ferrero JM, Schneeweiss A, Knott A, Clark E, Ross G, Benyunes MC, Baselga J. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. Lancet Oncol. 2013 May;14(6):461-71.
8. Hurvitz SA, Dirix L, Kocsis J, Bianchi GV, Lu J, Vinholes J, Guardino E, Song C, Tong B, Ng V, Chu YW, Perez EA. Phase II randomized study of trastuzumab emtansine versus trastuzumab plus docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. J Clin Oncol. 2013 Mar 20;31(9):1157-63.
9. http://www.kadcyla.com/hcp
10. http://www.perjeta.com/hcp
11. Roche PC. Immunohistochemical stains for breast cancer. Mayo Clin Proc. 1994;69: 57-58.
12. Charpin C, et al. c-erbB-2 oncoprotein detected by automated quantitative immunocytochemistry in breast carcinomas correlates with patients' overall and disease-free survival. Br J Cancer. 1997;75: 1667-1673.
13. Corbett IP, et al. NCL-CB11: a new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein, effective for use on formalin fixed, paraffin-embedded tissue. J Pathol. 1990;161:15-25.
14. Nicholson RI, et al. Relationship between EGF-R, c-erbB-2 protein expression and Ki67 immunostaining in breast cancer hormone sensitivity. Eur J Cancer. 1993;29A:1018-1023.
15. DePotter CR, et al. The expression of the neu oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues. Histopathology. 1989;15:351-362.
16. Department of Health, Education and Welfare, National Institute of Occupational Safety and Health, Rockville, MD. “Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides.” DHHS (NIOSH) Publ No. 78-127, Current 13. August 16, 1976.
17. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2017.
18. CLSI. Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline. CLSI document MM4-A- (ISBN 1-56238-396-5). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 1999.
19. Hoffmann M, et al. Histopathology. 2008:52;797-805.
20. Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, Chenard MP, Penault-Llorca F, Nagelmeier I, Schlake W, Höfler H, Kreipe HH. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. Virchows Arch. 2010;457(3):299-307.
21. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem. 1991;66(4):194-199.
22. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Pathol. 1980;73(5):626-32.
23. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767.
24. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
25. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hiland E, Sawrenko C, and Phillip D, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization, Mod Pathol. 2001;14:1079-86.
26. Kay EW, Walsh CJ, Cassidy M, Curran B, Leader M. C-erbB-2 immunostaining: problems with interpretation. J Clin Pathol. 1994;47:816-22.
27. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Rüschoff J, Tomasic G, van de Vijver M. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. Mod Pathol. 2003;16:173-182.

## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, ultraView, PATHWAY и логотип VENTANA являются товарными знаками компании Roche. Все остальные товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

© 2018, Ventana Medical Systems, Inc.

## КОНТАКТЫ

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim Germany

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.

www.ventana.com

EC REP

CE



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

# HybClear Solution

REF 780-4572

06300324001

IVD

## ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

HybClear Solution компании Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana) делает возможной визуализацию первичных антител с использованием наборов для визуализации VENTANA IHC в сочетании с визуализацией DNP-меченого объекта с использованием технологии визуализации VENTANA ISH DNP и (или) DIG-меченного объекта с использованием технологии визуализации VENTANA ISH DIG на одном срезе зафиксированной в формалине, залитой парафином человеческой ткани с помощью устройств для окрашивания гистологических препаратовVENTANA BenchMark Series (BenchMark GX, BenchMark XT, и BenchMark ULTRA).

Данный продукт предназначен для диагностического использования *in vitro*.

## ПРАВИЛА ПРИМЕНЕНИЯ

HybClear Solution предназначен для использования с антителами, зондами, вспомогательными реагентами компании VENTANA и автоматическими устройствами для окрашивания гистологических препаратов компании VENTANA для одновременного окрашивания методами IHC и ISH. Во время процесса гибридизации *in situ* HybClear Solution обеспечивает среду, пригодную для гибридизации *in situ* в присутствии хромогена IHC.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

### Реактивы в комплекте поставки

Один дозатор HybClear Solution объемом 25 мл содержит пре-гибридизационный буферный раствор на основе формамида, содержащий <55% формамида и >5 мг/мл растворимого соединения ароматического ряда.

### Восстановление раствора, смешивание, разведение и титрование

Не требуется никакого разведения, смешивания, разбавления или титрования. Дальнейшее разведение может привести к утрате способности к специфичному окрашиванию. Подобные действия с реактивами могут проводиться только после валидации пользователем.

### Необходимые материалы, не входящие в комплект

Реактивы, например первичные антитела, зонды, наборы для визуализации и вспомогательные компоненты производства компании VENTANA; приобретаются дополнительно.

### Хранение и обращение

Хранить при температуре 2–8°C. Не замораживать. При хранении реактива в условиях, отличных от условий, указанных в настоящей инструкции, пользователь обязан валидировать их.

Для того чтобы обеспечить надлежащую сохранность реактива и стабильность продукта, после каждого использования дозатор необходимо сразу закрывать крышкой и ставить в холодильник в вертикальном положении.

На бутыли с реагентом указана дата окончания срока годности. При надлежащем хранении реагент сохраняет стабильность до даты, указанной на этикетке. Не используйте реагент после окончания срока годности.

Каких-либо однозначных признаков утраты активности данного реактива не существует, поэтому одновременно с окрашиванием исследуемых образцов необходимо производить окраску препаратов для положительного и отрицательного контроля. О непредвиденных результатах применения данного раствора следует немедленно известить ближайшее представительство компании Ventana.

## СПЕЦИАЛЬНЫЕ УКАЗАНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Соблюдайте все обычные предосторожности при работе с реагентами. Избегайте попадания реактивов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. Используйте защитную одежду и перчатки.
2. **Внимание! Продукт содержит формамид!** Формамид токсичен при вдыхании и умеренно токсичен при приеме внутрь. Он оказывает раздражающее действие на кожу, глаза, слизистые оболочки и абсорбируется кожей. Он может оказать негативное воздействие на плод при беременности. Обращаться с осторожностью! При обращении с предположительными канцерогенами или токсичными материалами необходимо использовать одноразовые перчатки и надевать защитную одежду.
3. Не допускайте микробного загрязнения реагента, так как оно может привести к получению недостоверных результатов.
4. По вопросам рекомендованного метода утилизации обращайтесь в соответствующие местные или государственные органы.
5. Более подробная информация содержится в сертификате безопасности материала, а также в руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Проведение неподходящих процедур обработки препарата, включая дегидратацию и использование окислительных покровных стекол подвергают риску стабильность интенсивности окраски с помощью IHC и сигналов касания зондом ISH. Для правильного проведения процедур обработки препарата и использования правильных вспомогательных продуктов см. вкладыши в упаковках соответствующих наборов для визуализации.

Примечание: Для процедур с использованием набора для визуализации *ultra*View Red ISH DIG Detection Kit существует хромоген Fast Red, растворимый в спирте и ацетоне. Не следует применять для дегидратации и очистки срезов спиртовые или ацетоновые ванны, равно как и длительную промывку ксилолом.

Число испытаний (от 62 до 125) определяется сочетанием DIG- и DNP-меченых объектов, которые пользователь определяет в протоколе.

Для получения рекомендаций относительно контроля см. «Процедуры контроля качества» соответствующего набора для визуализации.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики должны утверждаться для каждого антитела и зонда. Ответственность за валидацию использования HybClear Solution совместно с этими продуктами на одном срезе ложится на пользователя.

На окрашенных препаратах могут появляться кристаллы. Если кристаллы отнимают или снижают способность пользователя оценивать окрашенный препарат, результат должен рассматриваться как неподдающийся оценке. В таком случае процедуру окрашивания следует повторить. Если проблема повторяется, свяжитесь с местным представителем службы технической поддержки.

## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

BENCHMARK, VENTANA, *ultra*View и логотип VENTANA являются товарными знаками компании Roche.

Все другие товарные знаки являются собственностью их владельцев.

Ventana Medical Systems, Inc предоставляет Покупателю лицензию только на однократное использование в соответствии с патентами США № 6045759, 6945128 и 7378058, а также любыми их зарубежными аналогами.

© 2012 Ventana Medical Systems, Inc. и Roche Diagnostics International, Ltd.

## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.

www.ventana.com

CE



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

# CINtec® *PLUS* Cytology Kit

REF 605-100

06889565001

IVD Σ 100

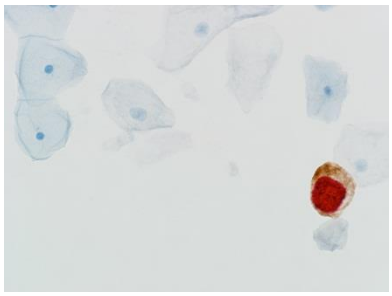


**Рисунок 1. Цервикальная эпителиальная p16$^{INK4a}$ (коричневое цитоплазматическое окрашивание) и Ki-67 (красное окрашивание ядер) положительная клетка**

## НАЗНАЧЕНИЕ

CINtec® *PLUS* Cytology Kit представляет собой иммуноцитохимический анализ, направленный на одновременное качественное определение белков p16$^{INK4a}$ и Ki-67 в цервикальных цитологических препаратах. Он предназначен для использования в качестве средства, позволяющего выявить женщин с цервикальными интраэпителиальными поражениями высокой степени выраженности в популяции скринингового исследования, а также в подгруппах пациентов с цитологическим результатом PAP-теста в категории ASC-US (атипичные клетки плоского эпителия неясного значения) или LSIL (плоскоклеточное интраэпителиальное поражение низкой степени) или пациентов с положительными результатами ВПЧ-теста с высокой степенью риска.

Интерпретация результатов теста может проводиться только сертифицированным специалистом во взаимосвязи с данными истории болезни пациента и проведенных дополнительных диагностических тестов.

Данный продукт предназначен для диагностики *in vitro* (IVD).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

В эукариотических клетках контроль развития цикла клеточного деления осуществляется с помощью комплексной модели контролируемой экспрессии и посттрансляционных модификаций белков, регулирующих клеточный цикл. Белок p16$^{INK4a}$ играет важную роль в данном механизме регуляции цикла эукариотических клеток. Он является частью pRb-опосредованного контроля белком ретинобластомы перехода в фазу G1/S и инициирует задержку клеточного цикла в процессах клеточной дифференциации. Таким образом, p16$^{INK4a}$ оказывает антипролиферативный эффект при обычном развитии клеточного цикла. В окончательно дифференцированных эпителиальных клетках p16$^{INK4a}$ экспрессия подавляется до уровней, как правило, не выявляемых иммуноцитохимическими методами [1].

Ki-67представляет собой связанный с пролиферацией белок, который обнаруживается исключительно в ядре пролиферирующих клеток. Детальные анализы клеточного цикла показали, что антиген Ki-67 присутствует в обнаруживаемых уровнях на всех фазах пролиферации клеток, а также при митотическом делении, в то время как неактивные или дремлющие клетки в фазе G0 не экспрессируют антиген [2].

В связи с тем, что клетки с повышенной экспрессией p16$^{INK4a}$ могут активно пролиферировать только при ослаблении механизма контроля клеточного цикла, экспрессия маркера пролиферации обоих p16$^{INK4a}$ в одной клеткеKi-67 при нормальных физиологических условиях взаимоисключается. Таким образом, сопутствующая экспрессия p16$^{INK4a}$ и Ki-67 в отдельных клетках может использоваться как индикатор нарушения регуляции контроля клеточного цикла в таких клетках.

При цервикальной неоплазии отмечается значительное повышение экспрессии p16$^{INK4a}$ в результате функциональной инактивации pRB-опосредованного онкобелком E7 типов вируса папилломы человека (HR-HPV) высокой степени риска [3;4]. Так как E7 требуется для установления и поддержания злокачественного фенотипа при HPV-ассоциированных предраковых и раковых патологических изменениях, повышенная экспрессия p16$^{INK4a}$ напрямую связана с онкогенной активностью различных типов HR-HPV, и поэтому предлагается считать ее суррогатным маркером трансформации инфекций HPV [1;5].

В ходе многочисленных исследований был проведен анализ и показана клиническая применимость p16$^{INK4a}$ иммуноокрашивания в цервикальной гистологии [1;3;5;7;8;4;9;10] и цервикальной цитологии [5;11;12]. В различных исследованиях показано, что связанная интерпретация образцов на стеклах, окрашенных с целью определения p16$^{INK4a}$, значительно увеличивает согласованность заключений различных исследователей, а также диагностическую точность при определении CIN2 и патологических изменений высокой степени выраженности в образцах цервикальных тканей для цитологических исследований [6;10;12]. В цервикальной цитологии показано, что иммуноокрашивание с целью определения p16$^{INK4a}$ является важным инструментом эффективной сортировки цитологических случаев, выделенных в категории ASC-US или LSIL, с уровнями чувствительности для определения патологических изменений CIN2 или более тяжелой степени, аналогично тесту HPV, но при этом со значительно большей точностью [12]. Более того, обнаружение p16$^{INK4a}$ в цитологических образцах считается значимым добавочным маркером для сортировки женщин с положительными результатами тестов на HR-HPV при проведении скринингового исследования рака шейки матки [11;13].

Фактически при всех цервикальных интраэпителиальных патологических изменениях высокой степени выраженности (таких как CIN2, CIN3 или выше) наблюдается повышенная экспрессия p16$^{INK4a}$ [3;6;8]. Так как значительная часть клеток эпителия при патологических изменениях CIN также обнаруживают пролиферативную активность, определение цервикальных эпителиальных клеток, одновременно экспрессирующих p16$^{INK4a}$ и Ki-67, может использоваться как индикатор статуса трансформации клеток. Следовательно, подход, основанный на оценке цервикальных образцов для цитологических исследований с учетом наличия отдельных цервикальных эпителиальных клеток, проявляющих положительный результат на двойное окрашивание для выявления p16$^{INK4a}$ и Ki-67, обеспечивает как высокую чувствительность, так и точность при определении предраковых состояний и раковых заболеваний [14;15;16;17;18;19;20;21].

## ПРИНЦИП ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

CINtec *PLUS* Cytology Kit включает комплект реагентов для одновременного иммуноцитохимического выявления белков p16$^{INK4a}$ и Ki-67 в цитологических образцах, полученных из шейки матки. Белки обнаруживаются с помощью готовой к применению смеси первичных моноклональных антител, содержащей мышиные моноклональные антитела к белку человека p16$^{INK4a}$ (клон E6H4™) и первичные рекомбинантные кроличьи антитела к белку человека Ki-67 (клон 274-11 AC3). На основании предварительной обработки клеток, ингибирования активности эндогенной пероксидазы и инкубации с помощью первичной смеси антител в тесте применяются две готовые к применению системы обнаружения, оптимизированные для использования на цервикальных образцах для цитологических исследований:

- козье анти-мышиное вторичное антитело, ковалентно связанное с HQ гаптенами (собственный гаптен) и anti-HQ гаптеном , конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) третичное антитело, оптимизированное для обнаружения клона моноклонального мышиного антитела E6H4;
- козье анти-кроличье вторичное антитело, ковалентно связанное с NP гаптенами (собственный гаптен) и anti-NP гаптеном, конъюгированное с щелочной фосфатазой (AP) третичное антитело, оптимизированное для обнаружения клона рекомбинантного кроличьего антитела 274-11 AC3.

Хромогенные реакции основаны на HRP-опосредованной конверсии 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорида (DAB) и AP-опосредованной конверсии Fast Red с фосфатом нафтола, что приводит к образованию коричневого осадка в месте обнаружения антигена p16$^{INK4a}$ и красного осадка в месте обнаружения антигена Ki-67 соответственно.

После автоматического контрастного окрашивания и синего окрашивания проводится двухэтапная процедура заливки. Вначале стекло покрывают водорастворимой заливочной средой. Затем стекло накрывают покровным стеклом с постоянной заливочной средой. Результаты окрашивания оцениваются методом световой микроскопии.



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

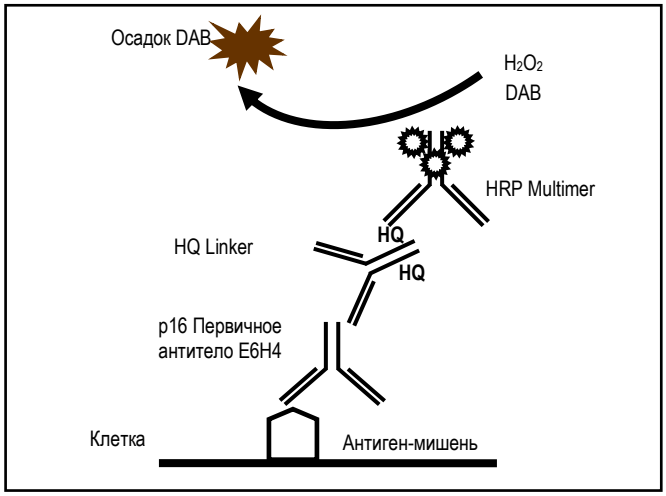



**Рисунок 2. Обнаружение белка человека p16$^{INK4a}$**

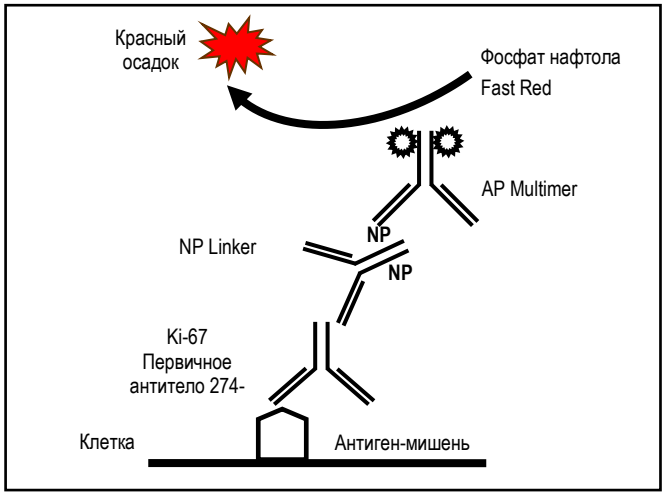



**Рисунок 3. Обнаружение белка человека Ki-67**

## РЕАГЕНТЫ В КОМПЛЕКТЕ ПОСТАВКИ

CINtec *PLUS* Cytology Kit содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 100 анализов.

| | |
|---|---|
| Один дозатор 10 мл | CINtec *PLUS* Primary Antibody Cocktail (p16/Ki-67) содержит смесь клона E6H4 моноклонального мышиного антитела к белку человека p16$^{INK4a}$ и клона 274-11 AC3 первичного рекомбинантного кроличьего антитела к белку человека Ki-67 (общее содержание антитела < 5 мкг/мл) в буфере с содержанием белка с консервантом ProClin® 300. |
| Один дозатор 10 мл | CINtec *PLUS* Red anti-Rabbit NP Linker содержит NP-меченный козий антикроличий иммуноглобулин IgG (< 10 мкг/мл; NP — собственный гаптен, ковалентно связанный с козьим антителом) в буфере, содержащем белок с консервантом ProClin® 300. |
| Один дозатор 10 мл | CINtec *PLUS* Red AP Multimer содержит мышиное моноклональное anti-NP-меченное, содержащее AP третичное антитело в буфере (< 20 мкг/мл), содержащем белок с консервантом ProClin® 300. |
| Один дозатор 10 мл | CINtec *PLUS* Red Naphthol Phosphate содержит фосфат нафтола (< 1 %) с консервантом ProClin® 300. |
| Один дозатор 10 мл | CINtec *PLUS* Fast Red содержит Fast Red (< 1 %) в ацетатном буфере с консервантом ProClin® 300. |
| Один дозатор 10 мл | CINtec *PLUS* DAB Peroxidase Inhibitor содержит раствор перекиси водорода (< 5 %). |
| Один дозатор 10 мл | CINtec *PLUS* DAB anti-Mouse HQ Linker содержит HQ-меченный козий антимышиный иммуноглобулин IgG (< 40 мкг/мл; HQ — собственный гаптен, ковалентно связанный с козьим антителом) в буфере, содержащем белок с консервантом ProClin® 300. |
| Один дозатор 10 мл | CINtec *PLUS* DAB HRP Multimer содержит мышиное моноклональное anti-HQ-меченное, содержащее HRP третичное антитело в буфере (< 10 мкг/мл), содержащем белок с консервантом ProClin® 300. |
| Один дозатор 10 мл | CINtec *PLUS* DAB содержит 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид (< 1 %) в соответствующем стабилизирующем растворе с соответствующим консервантом. |
| Один дозатор 10 мл | CINtec *PLUS* DAB $H_2O_2$ содержит перекись водорода (< 1 %) в фосфатном буферном растворе. |

## ВОССТАНОВЛЕНИЕ РАСТВОРА, СМЕШИВАНИЕ, РАЗВЕДЕНИЕ И ТИТРОВАНИЕ

Комплект CINtec *PLUS* Cytology Kit оптимизирован для использования на стейнерах VENTANA BenchMark GX, XT и ULTRA. Восстановление, смешивание, разбавление и титрование входящих в комплект реагентов не требуется.

Отклонения от рекомендованных процедур по фиксации и дальнейшей обработке цервикальных образцов для цитологических исследований могут привести к значительной вариабельности результатов, что обуславливает необходимость проведения регулярного внутреннего контроля.

Подробные сведения о процедуре контроля см. в разделе «Контроль качества».

## НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

Для окрашивания требуются следующие реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки CINtec *PLUS* Cytology Kit.

В некоторых странах могут быть доступны не все перечисленные в листке-вкладыше продукты. Обратитесь к региональному представителю службы поддержки.

1. Соответствующие контрольные образцы (дополнительный материал, см. раздел «Контроль качества»)
2. Контр-окрашивание Hematoxylin Counterstain
3. Реагент Bluing Reagent
4. Reaction Buffer Concentrate (10X)
5. Cell Conditioning Solutions (CC1/ ULTRA CC1)
6. Cell Conditioning Solutions (CC2/ ULTRA CC2), необходим для работы прибора, но не применяется
7. EZ Prep Concentrate (10X), необходим для работы прибора, но не применяется
8. Концентрат SSC (10X), необходим для работы прибора, но не применяется
9. Жидкое покровное стекло Liquid Coverslip (LCS/ ULTRA LCS)
10. Чистый этанол денатурированный (чистота ≥ 95 %)
11. VENTANA BenchMark GX, XT или стейнер ULTRA
12. Рекомендуется использование предметных стекол SuperFrost® PLUS (Thermo Fisher Scientific) для стандартных мазков
13. Предметные стекла ThinPrep® Arcless или ThinPrep® FOR SPECIAL PROCESSING (Заказ Hologic № 70126-002)
14. Предметные стекла BD SurePath™ PreCoat (включены в комплект SurePath GYN)
15. CC/Mount™ водорастворимая заливочная среда (диагностическая система BioSystems Номер: K 002; Sigma-Aldrich Номер: C9368)
16. Дополнительно: Сушилка с поддержанием температуры 60 °C ± 5 °C
17. Ксилол (гистологической степени очистки)
18. деионизированная или дистиллированная вода;
19. Покровные стекла и заливочная среда на основе ксилола или покровная пластиковая пленка, подходящая для покрытия цитологических препаратов
20. Оптический микроскоп
21. Мягкое моющее средство



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

## ХРАНЕНИЕ

Хранить при температуре 2 – 8°C. Не замораживать. Данный комплект реагентов может использоваться сразу после извлечения из холодильника.

Чтобы обеспечить надлежащую сохранность и стабильность реагентов, после каждого использования дозаторы необходимо сразу закрывать крышкой и ставить в холодильник в вертикальном положении.

CINtec *PLUS* Cytology Kit имеет срок годности. При условии надлежащего хранения реагенты сохраняют свои свойства до даты, указанной на этикетке. Не используйте продукт после истечения срока годности для указанного способа хранения. Поскольку четкие признаки, свидетельствующие о нестабильности данного продукта, отсутствуют, одновременно с исследованием неизвестных образцов следует проводить положительный контроль. При появлении признаков нестабильности реагента следует незамедлительно связаться с ближайшим сервисным центром компании.

## ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики *in vitro* (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. Не используйте продукт, если упаковка каких-либо его компонентов нарушена. Если целостность упаковки нарушена или какие-либо компоненты повреждены, убедительная просьба незамедлительно сообщить в сервисный центр компании.
4. Реагенты обладают оптимальной концентрацией. Их дальнейшее разведение может привести к ухудшению окрашивания антигена. Пользователь должен обосновывать подобные изменения.
5. Вещество ProClin® 300 используется в качестве консерванта. Оно вызывает раздражение и при контакте с кожей может стать причиной сенсибилизации. Примите меры предосторожности при работе с реагентами. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу или слизистые оболочки. Используйте защитную одежду и перчатки. Список дозаторов, содержащих этот консервант, см. в разделе «Входящие в комплект поставки реагенты».
6. Материалы человеческого или животного происхождения следует считать биологически опасными материалами и утилизировать, соблюдая все необходимые меры предосторожности.
7. Обращайтесь с реагентами с осторожностью. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу или слизистые оболочки. Избегайте вдыхания реагентов. При обращении с предполагаемыми канцерогенами или токсичными материалами используйте одноразовые перчатки и защитную одежду.
   При попадании реагентов на чувствительные участки промойте их достаточным количеством воды.
8. Не допускайте микробной контаминации реагентов, поскольку это может привести к получению недостоверных результатов.
9. Относительно рекомендованного способа утилизации препарата проконсультируйтесь с местными и/или государственными органами власти.
10. Более подробная информация содержится в сертификате безопасности материала, а также в руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.
11. При утилизации и обращении с цитологическими образцами, включая все образцы до и после фиксации, а также все материалы, подверженные их воздействию, соблюдайте меры безопасности при работе с потенциально инфекционным материалом, а также применимые нормативы по утилизации отходов.

## ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА ОБРАЗЦА

С цитологическими образцами следует обращаться осторожно, чтобы сохранить образцы для иммуноцитохимических исследований. Все образцы должны подвергаться стандартным методам обработки клеток.

Во избежание затемнения элементов, таких как кровь и слизь, а также с целью получения образца, соответствующего стандартам Bethesda, врачи должны соблюдать рекомендованные техники отбора [22;23].

Следующие методы подготовки стекол подходят для применения с комплектом CINtec *PLUS* Cytology Kit:

- Стекла ThinPrep® (Hologic Inc.) подготовлены на ThinPrep® 2000 или 5000 Processor (Hologic Inc.) при помощи предметных стекол ThinPrep® Arcless или ThinPrep® FOR SPECIAL PROCESSING (Заказ Hologic № 70126-002) в соответствии с рекомендациями производителя;
- Стекла BD SurePath™ (BD Diagnostics Tripath) подготовлены в соответствии с рекомендациями производителя;
- Стекла, подготовленные вручную (стандартные стекла для мазков).

Одновременно с исследованием образцов пациента рекомендуется проводить соответствующий контроль (подробная информация представлена в разделе «Контроль качества»).

### Подготовка образца ThinPrep®

Цитологический образец в растворе PreservCyt® , предназначенный для исследования иммуноцитохимическим окрашиванием с помощью CINtec *PLUS* Cytology Kit, должен храниться при температуре от 4 до 30 °C. Образец следует использовать для исследования в течение 6 недель после отбора.

Предметные стекла ThinPrep® Arcless или ThinPrep® FOR SPECIAL PROCESSING (Заказ Hologic № 70126-002) требуются для иммуноцитохимического окрашивания с CINtec *PLUS* Cytology Kit на стейнерах VENTANA Benchmark GX, XT и ULTRA.

**Подготовка образцов ThinPrep® с помощью ThinPrep® 2000 Processor**

Стекла ThinPrep® (Hologic Inc.) подготовлены на устройстве обработки ThinPrep® 2000 Processor (Hologic Inc.) в соответствии с инструкциями производителя. После завершения цикла работы устройства обработки ThinPrep® 2000 подготовленные стекла помещаются в пробирку с фиксатором, содержащую чистый раствор этанола ≥ 95 %. Осторожно выньте пробирку из держателя фиксирующего раствора устройства обработки ThinPrep® 2000 и перенесите подготовленное стекло из пробирки в сосуд для стекол, содержащий чистый раствор этанола ≥ 95 %. Инкубируйте стекло в этаноле в течение минимум 15 минут (максимум 60 минут). Замените раствор этанола в пробирке с фиксатором и в сосуде для стекол после подготовки 20 стекол. По истечении времени инкубации выньте стекло из сосуда с этанолом и оставьте просыхать в горизонтальном положении на плоской поверхности в течение минимум 60 минут. Высохшие стекла можно хранить при комнатной температуре в месте, защищенном от попадания солнечных лучей. Они должны быть окрашены CINtec *PLUS* Cytology Kit в течение 3 дней после подготовки.

**Подготовка образцов ThinPrep® с помощью ThinPrep® 5000 Processor**

Стекла ThinPrep® (Hologic Inc.) подготовлены на устройстве обработки ThinPrep® 5000 Processor (Hologic Inc.) в соответствии с инструкциями производителя. После завершения цикла работы ThinPrep® 5000 Processor подготовленные стекла помещаются в штатив для стекол, погруженный в чистый раствор этанола ≥ 95 %, содержащий фиксирующий раствор. Осторожно выньте емкость с фиксирующим раствором из устройства обработки ThinPrep® 5000 Processor и инкубируйте стекла в течение минимум 15 минут (максимум 60 минут). Заменяйте раствор этанола в пробирке с фиксатором и в сосуде для стекол после каждого использования. По истечении времени инкубации выньте стекла из сосуда с этанолом и оставьте просыхать в горизонтальном положении на плоской поверхности в течение минимум 60 минут. Высохшие стекла можно хранить при комнатной температуре в месте, защищенном от попадания солнечных лучей. Они должны быть окрашены CINtec *PLUS* Cytology Kit в течение 3 дней после подготовки.

Перед началом иммуноцитохимического окрашивания CINtec *PLUS* Cytology Kit удалите этикетку с оригинального стекла при помощи ThinPrep® 5000 Processor и нанесите этикетку, созданную стейнером VENTANA BenchMark GX, XT или BenchMark ULTRA.

### Подготовка образца BD SurePath™

Допускается хранение в консервирующем растворе цитологического образца SurePath™, предназначенного для иммуноцитохимического окрашивания с помощью CINtec *PLUS* Cytology Kit, в течение 4 недель при комнатной температуре (от 15 до 30 °C) или в течение 6 месяцев в холодильнике при температуре от 2 до 10 °C.

**Подготовка образца BD SurePath™ непосредственно после обработки Pap стекла**

Сразу после создания обогащенной клеточной массы для подготовки стекла к Pap окрашиванию, она может использоваться для подготовки второго стекла для окрашивания CINtec *PLUS* Cytology Kit. Следуйте рекомендациям производителя относительно использования «Приготовления предметных стекол» [параметр 2] образцов GYN на приборе PrepStain™. Объем ресуспендирования должен быть изменен до 0 мл в параметре меню «Изменить образец/Параметры окрашивания».

**Подготовка образца BD SurePath™ из консервированной клеточной массы**

Допускается консервирование обогащенных клеточных масс путем добавления приблизительно 2 мл консервирующего раствора SurePath™, после чего на пробирки с образцами надевают колпачки для хранения (подробное описание см. в инструкциях производителя). С даты сбора образцов клеточные массы, подвергшиеся повторному



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

суспендированию в консервирующем растворе, могут храниться до 4 недель при комнатной температуре (от 15 до 30 °C) или в течение 6 месяцев в холодильнике при температуре от 2 до 10 °C. При подготовке стекла для CINtec *PLUS* Cytology Kit сначала следует выдержать образец при комнатной температуре 60 минут. Начните второй этап центрифугирования процесса обогащения GYN и выполните оставшиеся этапы предварительной подготовки, как указано в инструкциях производителя для повторной обработки консервированных клеточных масс. Следуйте рекомендациям производителя относительно использования «Приготовления предметных стекол» [параметр 2] образцов GYN на приборе PrepStain™.

Для всех перечисленных выше вариантов подготовки следует снять штатив для стекол из прибора PrepStain™ после завершения этапа переноса образца. Переверните штатив для слива жидкости. Влейте пипеткой 2 мл чистого раствора этанола ≥ 95 % в каждую осадочную камеру и сразу же слейте. Второй раз промойте 2 мл чистого раствора этанола ≥ 95 % и инкубируйте в течение 10 минут. Слейте жидкость, перевернув штатив. Снимите осадочные камеры со стекол и оставьте стекла высыхать в горизонтальном положении на плоской поверхности в течение минимум 60 минут. Высохшие стекла можно хранить при комнатной температуре в месте, защищенном от попадания солнечных лучей. Они должны быть окрашены CINtec *PLUS* Cytology Kit в течение 3 дней после подготовки.

### Подготовка стандартных мазков

Стандартные мазки фиксируются специальным фиксирующим реагентом для цитологических исследований в виде спрея, содержащим полиэтиленгликоль (например, Safetex™ Cytology Fixative, Andwin Scientific), сразу после сбора образцов. Стекла с зафиксированным мазком можно хранить при комнатной температуре в месте, защищенном от попадания солнечных лучей. Они должны быть окрашены комплектом CINtec *PLUS* Cytology Kit в течение 7 дней после подготовки.

Проведение дальнейшей предварительной подготовки не выбрано перед загрузкой стекол в иммуностейнеры VENTANA BenchMark GX, XT и ULTRA.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Комплект CINtec *PLUS* Cytology Kit разработан для использования на стейнерах VENTANA BenchMark GX, XT и ULTRA со вспомогательными реагентами и дополнительным оборудованием VENTANA. Для получения информации о рекомендуемых протоколах окрашивания см. таблицы 1, 2 и 3.

Комплект CINtec *PLUS* Cytology Kit был оптимизирован в соответствии с параметрами, указанными в таблицах 1, 2 и 3; несмотря на это, пользователь должен проверять результаты, полученные с помощью данного комплекта.

Параметры автоматических протоколов могут быть отображены на дисплее, напечатаны и отредактированы согласно инструкциям, представленным в руководствах пользователя для каждого прибора.

**Таблица 1.** Рекомендуемый протокол окрашивания реагентом для стекол ThinPrep®, SurePath™ и стандартных стекол для мазков на стейнере VENTANA BenchMark GX при помощи Hematoxylin (Номер 760-2021) и реагента Bluing Reagent (Номер 760-2037).

| Процедура окрашивания | GX CINtec *PLUS* Cytology | | |
|---|---|---|---|
| Выбираемые варианты | Тип образца | | |
| | ThinPrep | SurePath | Стандартный |
| ThinPrep | Требуется | Не выбрано | Не выбрано |
| SurePath | Не выбрано | Требуется | Не выбрано |
| Другое | Не выбрано | Не выбрано | Требуется |
| Вариант предварительной обработки клеток | Вариант не может быть выбран | Вариант не может быть выбран | 16 мин. |
| Время инкубации антитела | 16 мин. | 20 мин. | 16 мин. |
| Время инкубации HQ Linker | 12 мин. | 16 мин. | 12 мин. |
| Время инкубации HRP Multimer Inc | 6 мин. | 8 мин. | 8 мин. |
| Время инкубации NP Linker | 8 мин. | 16 мин. | 8 мин. |
| Время инкубации AP Multimer | 8 мин. | 8 мин. | 8 мин. |
| Контрастное окрашивание | Hematoxylin 4 мин. | Hematoxylin 4 мин. | Hematoxylin 4 мин. |
| Контрастное окрашивание | Bluing 4 мин. | Bluing 4 мин. | Bluing 4 мин. |

**Таблица 2.** Рекомендуемый протокол окрашивания реагентом для стекол ThinPrep®, SurePath™ и стандартных стекол для мазков на стейнере VENTANA BenchMark XT при помощи Hematoxylin (Номер 760-2021) и реагента Bluing Реагент (Номер 760-2037).

| Процедура окрашивания | XT CINtec *PLUS* Cytology | | |
|---|---|---|---|
| Выбираемые варианты | Тип образца | | |
| | ThinPrep | SurePath | Стандартный |
| ThinPrep | Требуется | Не выбрано | Не выбрано |
| SurePath | Не выбрано | Требуется | Не выбрано |
| Другое | Не выбрано | Не выбрано | Требуется |
| Вариант предварительной обработки клеток | Вариант не может быть выбран | Вариант не может быть выбран | 16 мин. |
| Время инкубации антитела | 16 мин. | 20 мин. | 16 мин. |
| Время инкубации HQ Linker | 12 мин. | 16 мин. | 12 мин. |
| Время инкубации HRP Multimer Inc | 8 мин. | 8 мин. | 8 мин. |
| Время инкубации NP Linker | 8 мин. | 16 мин. | 8 мин. |
| Время инкубации AP Multimer | 8 мин. | 8 мин. | 8 мин. |
| Контрастное окрашивание | Hematoxylin 4 мин. | Hematoxylin 4 мин. | Hematoxylin 4 мин. |
| Контрастное окрашивание | Bluing 4 мин. | Bluing 4 мин. | Bluing 4 мин. |



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

**Таблица 3.** Рекомендуемый протокол окрашивания реагентом для стекол ThinPrep®, SurePath™ и стандартных стекол для мазков на стейнере VENTANA BenchMark ULTRA при помощи Hematoxylin (Номер 760-2021) и реагента Bluing Reagent (Номер 760-2037).

| Процедура окрашивания | U CINtec *PLUS* Cytology | | |
|---|---|---|---|
| Выбираемые варианты | Тип образца | | |
| | ThinPrep | SurePath | Стандартный |
| ThinPrep | Требуется | Не выбрано | Не выбрано |
| SurePath | Не выбрано | Требуется | Не выбрано |
| Другое | Не выбрано | Не выбрано | Требуется |
| Вариант предварительной обработки клеток | Вариант не может быть выбран | Вариант не может быть выбран | 16 мин. |
| Время инкубации антитела | 16 мин. | 16 мин. | 16 мин. |
| Время инкубации HQ Linker | 12 мин. | 16 мин. | 12 мин. |
| HRP Multimer Inc Время | 8 мин. | 8 мин. | 8 мин. |
| Время инкубации NP Linker | 8 мин. | 16 мин. | 8 мин. |
| Время инкубации AP Multimer | 8 мин. | 8 мин. | 8 мин. |
| Контрастное окрашивание | Hematoxylin 4 мин. | Hematoxylin 4 мин. | Hematoxylin 4 мин. |
| Контрастное окрашивание | Bluing 4 мин. | Bluing 4 мин. | Bluing 4 мин. |

### Работа со стейнером BenchMark GX, XT и ULTRA

1. Нанесите на предметное стекло этикетку со штрих-кодом в соответствии с выполняемым протоколом.
2. Загрузите на лоток для реагентов приборов CINtec *PLUS* Cytology Kit и соответствующие вспомогательные реагенты. Установите лоток с реагентами в стейнер.
3. Проверьте наличие растворов и пустого контейнера для отходов.
4. Загрузите предметные стекла в стейнер.
5. Начните цикл окрашивания.
6. После завершения процедуры снимите предметные стекла со стейнера.

## ПОСЛЕДУЮЩАЯ ОБРАБОТКА: ЗАЛИВКА И ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПОД ПОКРОВНОЕ СТЕКЛО

Для поддержания оптимальной чувствительности и во избежание выцветания хромогенов требуется проведение двухэтапной процедуры заливки.

Достаньте предметные стекла из стейнерах VENTANA BenchMark GX, XT и ULTRA, аккуратно встряхните и промывайте их водопроводной, деионизированной или дистиллированной водой с мягким моющим средством до тех пор, пока Liquid Coverslip не будет полностью удален со стекол.

ПРИМЕЧАНИЕ. Примите меры, чтобы напор воды не попадал прямо на предметные стекла. Используйте минимальный напор воды.

Заливка стекол производится в два этапа согласно протоколу. Необходимо провести нижеприведенные действия в следующем порядке.

1. Заливка водорастворимой заливочной средой.
   - Инкубируйте стекла в дистиллированной или деионизированной воде в течение минимум 1 минуты;
   - Стекла, не накрытые покровными стеклами, должны оставаться в дистиллированной или деионизированной воде CC/Mount™ при заливке других стекол водорастворимой заливочной средой;
   - Достаньте одно стекло из дистиллированной или деионизированной воды и осторожно протрите заднюю часть стекла бумажным полотенцем, чтобы удалить излишки воды. Не сливайте и не вытирайте воду с передней части стекла (сторона нанесения образца).
   - Держите предметное стекло под небольшим наклоном и нанесите 4-6 капель водорастворимой заливочной среды CC/Mount™ (Diagnostic BioSystems Номер: K 002; Sigma-Aldrich Номер: C9368) на стекло ThinPrep® или SurePath™ и 8 капель на стандартное стекло для мазков. Избегайте образования воздушных пузырей. Во избежание образования пузырей первую каплю можно нанести на бумажное полотенце перед нанесением CC/Mount™ на область подготовки образца предметного стекла;
   - Аккуратно наклоните и поверните предметное стекло, чтобы тонкий слой заливочной среды полностью покрыл область подготовки образца (не накладывайте покровное стекло или пленку); визуально проверьте распределение заливочной среды по стеклу;
   - Сотрите излишки водорастворимой заливочной среды CC/Mount™ с задней части и краев стекла. Используйте бумажное полотенце, если необходимо;
   - Для сушки положите стекла в горизонтальное положение.
     a) Инкубируйте стекла ® или SurePath™ при температуре 37—60 °C в течение 1 часа или оставьте их на ночь при комнатной температуре.
     b) Инкубируйте стандартные стекла для мазков при температуре 37 °C в течение 4 часов или при 60 °C в течение 1 часа или оставьте их на ночь при комнатной температуре.
2. Наложение покровного стекла или пленки.
   - После высыхания водорастворимой заливочной среды CC/Mount™ оставьте стекла до принятия комнатной температуры, если необходимо. Инкубируйте стекла в ксилоле в течение минимум 1 минуты (максимум 20 минут). Затем накройте предметные стекла покровными стеклами с применением заливочной среды на основе ксилола или покровной пленкой на основе ксилола.

     ПРИМЕЧАНИЕ. Стекла не должны подвергаться дегидратации серией спиртов повышающейся концентрации перед покрытием стеклом или пленкой.
   - Заливочная среда на основе ксилола должна высыхать при комнатной температуре.

ПРИМЕЧАНИЕ. Для снижения выцветания защищайте стекла от попадания солнечных лучей и храните при комнатной температуре.

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Отклонения от рекомендованных процедур по фиксации и дальнейшей обработке цервикальных образцов для цитологических исследований могут привести к значительной вариабельности результатов. Признаки дефектов продукции, вызванные неправильным обращением или нестабильностью, не являются явными. В связи с этим, одновременно с анализом исследуемых образцов следует проводить соответствующий контроль.

### Положительный контроль

Образцы, подготовленные таким же образом, как и образец(ы) пациента, должны использоваться в качестве положительных контрольных образцов. Положительные контрольные образцы указывают на правильную подготовку образцов и соответствующие методики окрашивания. В каждый цикл окрашивания должен входить один положительный контрольный образец.

Заведомо положительные контрольные образцы следует использовать только для проверки правильности самой процедуры окрашивания обработанных образцов и качества реагентов, но не для постановки конкретного диагноза на основании исследуемых образцов. Если контрольные образцы не дают соответствующего положительного окрашивания, результаты окрашивания данной партии исследуемых образцов следует считать недействительными.

### Отрицательный контроль

Множество различных типов клеток в обычных цервикальных образцах для цитологических исследований и клеток, в которых не были обнаружены антигены $p16^{INK4a}$ и Ki-67 (например, поверхностные клетки), могут служить как внутренний отрицательный контроль для оценки фонового окрашивания.

### Верификация теста

Пользователь должен проверить эффективность CINtec *PLUS* Cytology Kit на положительных и отрицательных образцах с известными характеристиками эффективности перед первоначальным проведением диагностической процедуры.



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

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ОКРАШИВАНИЯ И КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ОЖИДАЕМЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате окрашивания комплектом CINtec *PLUS* Cytology Kit образуются два различно окрашенных продукта реакции: коричневый осадок в местах скопления антигена $p16^{INK4a}$ и красный осадок в местах расположения антигена Ki-67. Коричневое окрашивание клеток (цитоплазмы и/или ядра) указывают на повышенную экспрессию $p16^{INK4a}$. Красное окрашивание клеток (ядра) указывает на экспрессию Ki-67. Клетки, содержащие оба антигена, имеют коричневую окраску цитоплазмы с красными выделяющимися ядрами. Квалифицированный патоморфолог/лаборант цитологической лаборатории, имеющий опыт иммуноцитохимических исследований и прошедший обучение по интерпретации окрашенных стекол CINtec *PLUS* Cytology Kit, должен проводить оценку контрольных образцов (если применимо) перед интерпретацией результатов.

Интерпретация результатов теста может проводиться только сертифицированным специалистом во взаимосвязи с данными истории болезни пациента и проведенных дополнительных диагностических тестов.

В целях интерпретации стекол с цервикальными образцами для цитологических исследований, окрашенными с помощью CINtec *PLUS* Cytology Kit, необходимо проводить оценку образцов на стеклах с учетом наличия цервикальных эпителиальных клеток, демонстрирующих окрашивание цитоплазмы в коричневый цвет и ядра в красный цвет, что указывает на одновременную экспрессию $p16^{INK4a}$ и Ki-67. Более того, как и при отчете о результатах Pap-теста по цитологии, образцы должны пройти оценку по критериям пригодности согласно стандартам Bethesda 2001 (или TBS) [23] при предоставлении результатов теста CINtec *PLUS* Cytology.

**Положительный результат теста**

Положительным результатом теста CINtec *PLUS* Cytology считается наличие одной или большего количества клеток с одновременным присутствием особого коричневого иммуноокрашивания цитоплазмы и особого красного иммуноокрашивания ядра в пределах одной клетки.

**Отрицательный результат теста**

Отрицательным результатом теста CINtec *PLUS* Cytology считается отсутствие цервикальных клеток эпителия, имеющих одновременное коричневое иммуноокрашивание цитоплазмы и красное иммуноокрашивание ядра.

Наличие цервикальных клеток эпителия, проявляющих иммунореактивность только в отношении одного, а не двух маркеров (например, только коричневое окрашивание с указанием на $p16^{INK4a}$ или только красное окрашивание, свидетельствующее о Ki-67), не считается положительным результатом теста CINtec *PLUS* Cytology Kit.

## ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Только для профессионального использования. Для проведения иммуноцитохимических исследований требуется специальное обучение.
2. Оценка предметных стекол, окрашенных с помощью CINtec *PLUS* Cytology Kit, должна осуществляться только сертифицированным специалистом, прошедшим специальный курс обучения по интерпретации результатов теста.
3. Клиническая интерпретация любого положительного или отрицательного окрашивания должна проводиться в контексте клинической картины и других цитологических критериев.
4. Интерпретация результатов окрашивания CINtec *PLUS* Cytology Kit зависит от интенсивности и качества контрастного окрашивания гематоксилином. Отклонения от рекомендаций по применению реагентов и времени инкубации должны быть согласованы с заказчиком, так как чрезмерное или недостаточное контрастное окрашивание может помешать верной интерпретации результатов.
5. Стандартные стекла для мазков, предназначенные для окрашивания с помощью CINtec *PLUS* Cytology Kit подготавливают с применением предметных стекол SuperFrost® PLUS (Thermo Fisher Scientific) и фиксирующего реагента для цитологических исследований в виде спрея, содержащего полиэтиленгликоль, Safetex™ Cytology Fixative (Andwin Scientific). Любые отклонения от данной процедуры должны быть согласованы с заказчиком.
6. Использование ThinPrep® 3000 Processor не рекомендуется при подготовке образцов ThinPrep®, так как процедура фиксации спреем, проводимая прибором, может привести к значительным потерям клеток при окрашивании подготовленных образцов CINtec *PLUS* Cytology Kit.
7. Предметные стекла ThinPrep® Arcless или ThinPrep® FOR SPECIAL PROCESSING (Заказ Hologic № 70126-002) требуются для подготовки образцов ThinPrep® для иммуноцитохимического окрашивания CINtec *PLUS* Cytology Kit на стейнере VENTANA BenchMark GX, XT и ULTRA. Использование предметных стекол ThinPrep® с отпечатанными отметками может привести к получению неоднородных результатов теста.
8. Антитела/реагенты, поставленные производителем, имеют оптимальную концентрацию для использования согласно указанным инструкциям в иммуноцитохимических исследованиях на подготовленных на водной основе стеклах для цитологических исследований (LBC) или на стандартных стеклах для мазков. Любое отклонение от рекомендуемой процедуры тестирования может привести к получению недостоверных результатов; необходимо использовать и регистрировать документально соответствующие контрольные образцы. Пользователь несет полную ответственность при отклонении от рекомендованных процедур анализа ответственность за интерпретацию препаратов пациента.

## ВЫЯВЛЕНИЕ И УСТРАНЕНИЕ НЕПОЛАДОК

1. Если из дозатора реагента жидкость не поступает в нужном количестве, проверьте заливочную камеру и лунку на наличие частиц, например волокон или осадка. Если подача жидкости дозатором не осуществляется, не используйте дозатор и обратитесь к региональному представителю службы поддержки. Также можно повторно заправить дозатор. Его следует направить в контейнер для отходов, снять колпачок наконечника и нажать на верхнюю часть дозатора.
2. Если степень окрашивания образца положительного контроля слабее, чем ожидалось, проверьте, соответствует ли выбранный протокол конкретному типу образца, например, цитологические препараты SurePath™ требуют более длительной предварительной обработки клетки, чем ThinPrep® или препараты для стандартных мазков. Кроме этого, проверьте цилиндры дозатора и убедитесь в том, что в них нет инородных частиц.
3. Если положительный контроль дает отрицательный результат, необходимо убедиться, что этикетка на предметном стекле имеет правильный штрих-код. Если маркировка на стекле верная, проверьте цилиндры дозатора и убедитесь в том, что в них нет инородных частиц.
4. При усилении фона сократите время инкубации в протоколах окрашивания. Также убедитесь в том, что основной раствор Reaction Buffer имеет правильные пропорции.
5. При ослаблении окрашивания увеличьте время инкубации в протоколах окрашивания. Время инкубации и предварительной обработки клеток также может регулироваться для стекол со стандартными мазками.
6. Красный осадок, указывающий на экспрессию белка Ki-67, растворяется в спирте. При слабом окрашивании Ki-67 или при его отсутствии убедитесь в том, что спиртосодержащий гематоксилин не использовался и применялась рекомендуемая процедура последующей обработки согласно разделу «Последующая обработка: заливка и заключение под покровное стекло».
7. Если образец вымывается со стекла, необходимо убедиться, что образец был подготовлен согласно разделу «Подготовка образца к проведению анализа». Также убедитесь, что был использован рекомендуемый тип предметного стекла.
8. Способы устранения проблем см. в разделе «Процедура окрашивания» руководства пользователя аппарата. Соответствующую информацию также можно получить у представителя службы поддержки в вашем регионе.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики CINtec *PLUS* Cytology Kit оцениваются при помощи аналитической специфичности, воспроизводимости и конкордантности исследований в соответствии с информацией, описанной в следующем разделе.

### Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность CINtec *PLUS* Cytology Kit оценивалась при помощи ингибирования клонов первичных антител E6H4 и 274-11 AC3 с соответствующими эпитоп-специфическими пептидами. Стекла, подготовленные на водной основе, для цитологических исследований (LBC) от сверхэкспрессии клеточной линии обоих антигенов использовались для оценки влияния ингибирования специфическими пептидами на характеристики окрашивания обоих антител. Связывание антител с их эпитоп-специфическими пептидами привело к ингибированию антител, которые были обнаружены при сокращении степени окрашивания в сравнение с непептидным контролем. Кроме того, ни один из антител не был ингибирован другим эпитоп-



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

специфическим пептидом антитела, указывая на то, что неспецифические пептиды не будут ингибировать данные антитела.

### Воспроизводимость

Исследования воспроизводимости для CINtec *PLUS* Cytology Kit выполнялись для определения следующих параметров:

- воспроизводимость между партиями CINtec *PLUS* Cytology Kit;
- воспроизводимость результатов внутри цикла и результатов окрашивания на стейнерах VENTANA BenchMark GX, XT и ULTRA;
- воспроизводимости в пределах одной платформы на стейнерах VENTANA BenchMark GX, XT и ULTRA;
- воспроизводимости в пределах одной платформы между стейнерами VENTANA BenchMark GX, XT и ULTRA.

Все проведенные исследования соответствовали предварительно заданным критериям приемлемости.

### Исследования конкордантности

Характеристики CINtec *PLUS* Cytology Kit для использования на стейнерах VENTANA BenchMark GX, XT и LTRA оценивались в сравнении с комплектом Roche mtm CINtec *PLUS* Kit (устройство-образец, Roche mtm laboratories AG, Mannheim), которые ранее демонстрировали высокую чувствительность и специфичность при наличии предраковых и раковых заболеваний в цервикальных образцах для цитологических исследований с учетом наличия отдельных цервикальных эпителиальных клеток, проявляющих положительный результат на двойное окрашивание для $p16^{INK4a}$ и Ki-67 [14;15;16;17;18;19;20;21].

Исследования конкордантности были выполнены при помощи образцов пациентов, полученных в назначенных популяциях с результатами Pap-теста по цитологии категорий NILM (отрицательная реакция на рак или злокачественные новообразования), ASC-US, LSIL и HSIL по каждому из индивидуальных методов цервикальных цитологических препаратов: ThinPrep® (Hologic Inc.) и BD SurePath™ (BD Diagnostics Tripath) и стандартные стекла для мазков. Для проб LBC было подготовлено по два стекла для каждого пациента. При взятии стандартных мазков использовалось по два стекла для каждого пациента. Образец, взятый у пациента во время приема был разделен по двум предметным стеклам («техника разделения образцов»). Одно из стекол тестировалось с помощью CINtec *PLUS* Cytology Kit в иммуностейнере VENTANA BenchMark, а второе было окрашено с помощью контрольного прибора.

Алгоритм чтения для проб LBC:

Информация с каждого предметного стекла считывалась двумя квалифицированными расшифровщиками. Если они оглашали сходные результаты, этот результат засчитывался конечным для данного предметного стекла. Если они расходились во мнениях, третий расшифровщик проводил контрольное считывание результатов, и конечный результат засчитывался по принципу большинства.

Алгоритм чтения для стандартных стекол для мазков

Информация с каждого предметного стекла считывалась двумя квалифицированными расшифровщиками. Если оба расшифровщика расценивали результат как положительный, то конечный результат считался положительным. Если они не сходились во мнениях, предметное стекло изучалось тремя расшифровщиками, и в качестве конечного результата принималось их общее решение. Если оба расшифровщика расценивали результат как отрицательный, то для подтверждения этого предметное стекло изучал третий расшифровщик. Если третий расшифровщик расценивал результат, как отрицательный, то конечный результат считался отрицательным. Если третий расшифровщик расценивал результат, как положительный, то предметное стекло изучалось тремя расшифровщиками повторно, и их общее решение принималось в качестве конечного результата.

Заключение по результатам испытания определяется в качестве процента совпадения положительных результатов (PPA) и процента совпадения отрицательных результатов (NPA) между CINtec *PLUS* Cytology Kit для использования на стейнере VENTANA BenchMark.

**Таблица 4.** Заключение по результатам испытания между комплектом CINtec *PLUS* Cytology Kit и устройством-образцом на цервикальных цитологических препаратах ThinPrep®.

| | | Устройство-образец (N) | |
|---|---|---|---|
| | | + | - |
| Комплект CINtec *PLUS* Cytology Kit (n) | + | 140 | 25 |
| | - | 17 | 147 |
| | Всего | 157 | 172 |

PPA (n/N) (95 % доверительный интервал) = 140/157 x 100 % = 89,2 % (83,3-93,1 %)

NPA (n/N) (95 % доверительный интервал) = 147/172 x 100 % = 85,5 % (79,4-90,0 %)

**Таблица 5.** Согласованность результатов тестирования между CINtec *PLUS* Cytology Kit и устройством-образцом в подготовке предметных стекол для онкоцитологических исследований SurePath™

| | | Устройство-образец (N) | |
|---|---|---|---|
| | | + | - |
| Комплект CINtec *PLUS* Cytology Kit (n) | + | 56 | 3 |
| | - | 9 | 108 |
| | Всего | 65 | 111 |

PPA (n/N) (95 % доверительный интервал) = 56/65 x 100 % = 86,2 % (75,7-92,5 %)

NPA (n/N) (95 % доверительный интервал) = 108/111 x 100 % = 97,3 % (92,4-99,1 %)

**Таблица 6.** Согласованность результатов тестирования между комплектом CINtec *PLUS* Cytology Kit и сертифицированным прибором в подготовке предметных стекол для взятия стандартных мазков при проведении онкоцитологических исследований

| | | Устройство-образец (N) | |
|---|---|---|---|
| | | + | - |
| Комплект CINtec *PLUS* Cytology Kit (n) | + | 98 | 17 |
| | - | 20 | 72 |
| | Всего | 118 | 89 |

PPA (n/N) (95 % доверительный интервал) = 98/118 x 100 % = 83,1% (75,3-88,8 %)

NPA (n/N) (95 % доверительный интервал) = 72/89 x 100 % = 80,9% (71,5-87,7%)



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

## ССЫЛКИ


1. Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. Dis Markers. 2007;23:315-30.
2. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol. 2000;182:311-22.
3. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. Overexpression of p16$^{INK4a}$ as a specific marker for dysplasia and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. Int J Cancer 2001;92:276-84.
4. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. Am J Pathol. 1998;153:1741-8.
5. Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008;17:2536-45.
6. Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, et al. Conjunctive p16$^{INK4a}$ testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. Am J Clin Pathol. 2010;133:395-406.
7. Del Pino M, Garcia S, Fusté V, et al. Value of p16$^{INK4a}$ as a marker of progression/ regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. Am J Obstet Gynecol. 2009; 201(5):488.
8. Ordi J, Garcia S, del Pino M, et al. p16$^{INK4a}$ immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. Int J Gynecol Pathol. 2008;28:90-7.
9. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, et al. Validation of p16$^{INK4a}$ as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004;13:1355-60.
10. Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, et al. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. Am J Surg Pathol. 2010;8:1077-87.
11. Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, et al. Use of p16$^{INK4a}$ over-expression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. Lancet Oncol. 2008;9:937-45.
12. Denton K, Bergeron C, Klement P, et al. The sensitivity and specificity of p16$^{INK4a}$ Cytology versus HPV Testing for Detecting High-Grade Cervical Disease in the Triage of ASC-US and LSIL Pap Cytology Results. Am J Clin Pathol. 2010;134:12-21.
13. Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, et al. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-$^{INK4a}$ results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. Lancet Oncol. 2013;14(2):168-76.
14. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, et al., PALMS study group (2013). Screening for Cervical Cancer Precursors with p16/Ki-67 Dual-stained Cytology: Results of the PALMS Study. J Natl Cancer Inst. 2013;105(20):1550-7.
15. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, et al. p16/Ki-67 Dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology: Results from the European Equivocal or Mildly Abnormal Pap Cytology Study (EEMAPS). Cancer Cytopathol. 2011;119(3):158-66.
16. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, et al. Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. Gynecol Oncol. 2011;121(3):505-09.
17. Ravarino A, Nemolato S, Macciocu E, et al. CINtec *PLUS* immunocytochemistry as a tool for the cytologic diagnosis of glandular lesions of the cervix uteri. Am J Clin Pathol. 2012;138(5):652-56.
18. Singh M, Mockler D, Akalin A, et al. Immunocytochemical colocalization of p16($^{INK4a}$) and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/adenocarcinoma. Cancer Cytopathol. 2012;120(1):26-34.
19. Waldstrøm M, Christensen RK, Ornskov D. Evaluation of p16$^{INK4a}$/Ki-67 dual stain in comparison with an mRNA human papillomavirus test on liquid-based cytology samples with low-grade squamous intraepithelial lesion. Cancer Cytopathol. 2013;121(3):136-45.
20. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. Clin Cancer Res. 2012;18(15):4154-62.
21. Killeen JL, Dye T, Grace C, et al. Improved Abnormal Pap Smear Triage Using Cervical Cancer Biomarkers. J Low Genit Tract Dis. 2013 Jun 11. [Epub ahead of print]
22. Birdsong G., Husain M., Faison T, et al. Cervicovaginal Cytology Based on the Papanicolaou Technique; Approved Guideline- Third Edition. CLSI document GP15-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
23. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda system. Terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA. 2002;287:2114-9.


## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

BENCHMARK, CINtec, VENTANA и логотип VENTANA являются товарными знаками компании Roche.

Все другие товарные знаки являются собственностью их владельцев.

© 2013 Ventana Medical Systems, Inc.

## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.

www.ventana.com

CE



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

# VENTANA PD-L1 (SP263) Assay

REF 741-4905

07419821001

IVD Σ 50

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Метод анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay предназначен для качественного обнаружения белка лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1) в фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканевых срезах немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) и уротелиальной карциномы (UC), окрашенных при помощи набора OptiView DAB IHC Detection Kit на аппарате BenchMark IHC/ISH.

### NSCLC:

Экспрессия PD-L1 в мембране опухолевых клеток (TC), определяемая при помощи метода анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay в клетках NSCLC, используется как вспомогательное средство при выявлении пациентов, которым может быть прописано лечение препаратом IMFINZI™ (дурвалумаб).

Экспрессия PD-L1 в мембране опухолевых клеток (TC), определяемая при помощи метода анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay в клетках NSCLC, используется как вспомогательное средство при выявлении пациентов, которым может быть прописано лечение препаратом KEYTRUDA® (пембролизумаб).

Экспрессия PD-L1 в мембране опухолевых клеток (TC), определяемая при помощи метода анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay в клетках NSCLC, может быть связана с улучшенной выживаемостью на фоне лечения препаратом OPDIVO® (ниволумаб).

### Уротелиальная карцинома:

Высокий уровень экспрессии PD-L1, определенный при помощи метода анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay, был связан с повышенной частотой объективного отклика (ORR) в рамках несравнительного исследования препарата IMFINZI™ (дурвалумаб). Статус PD-L1 определяется по доле опухолевых клеток с мембранным окрашиванием любой интенсивности выше фонового окрашивания или по доле ассоциированных с опухолью иммунокомпетентных клеток с окрашиванием (IC+) любой интенсивности выше фонового окрашивания. На основе доли площади опухоли, занятой любыми ассоциированными с опухолью иммунокомпетентными клетками (присутствующие иммунокомпетентные клетки, ICP), определяется значение IC+, которое соответствует относительной площади ICP, демонстрирующих PD-L1-положительное окрашивание иммунокомпетентных клеток.

Результаты должны интерпретироваться квалифицированным патоморфологом с учетом данных гистологического исследования, соответствующих клинических данных и сравнения с контрольными образцами.

Этот продукт предназначен для диагностики *in vitro* (IVD).

Метод анализа предназначен для определения пациентов, которым терапия может принести пользу, как это показано в таблице Таблица 1. См. клинические рекомендации, относящиеся к экспрессии PD-L1 в соответствующей маркировке препарата.

**Таблица** 1. Метод терапии и связанные показания.

| Показание | Терапия | **Экспрессия** PD-L1 — **линия терапии** |
|---|---|---|
| NSCLC | IMFINZI™ | ≥ 1 % TC — Послехимиолучевая терапия (ПХТ) |
| | KEYTRUDA® | ≥ 50 % TC — первая линия |
| | | ≥ 1 % TC — вторая линия |
| | OPDIVO® | ≥ 1 %, ≥ 5 % и ≥ 10 % TC — вторая линия |
| UC | IMFINZI™ | Уровень экспрессии PD-L1 считается высоким при любом из следующих условий:<br>• мембранное окрашивание ≥ 25 % TC, или<br>• ICP > 1 % и IC+ ≥ 25 %; или,<br>• ICP = 1 % и IC+ = 100 %.<br>— вторая линия |

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

Метод VENTANA PD-L1 (SP263) Assay представляет собой иммуногистохимический анализ с использованием первичного кроличьего моноклонального антитела anti-PD-L1 (VENTANA PD-L1 (SP263) antibody) для распознавания лиганда-1 белка программируемой гибели клеток (PD-L1), также известного как B7-гомолог 1 (B7-H1) или CD274.

PD-L1 является трансмембранным белком, который регулирует иммунные реакции по принципу отрицательной обратной связи путем связывания со своими двумя ингибиторными рецепторами — рецептором программируемой клеточной смерти 1 (PD-1) и рецептором B7-1 (CD80).[1] PD-1 представляет собой ингибиторный рецептор, который экспрессируется на Т-лимфоцитах после активации Т-лимфоцитов, стабильно присутствующей при состояниях постоянной стимуляции, таких как хроническая инфекция или рак.[2] Связывание PD-L1 с PD-1 подавляет пролиферацию Т-лимфоцитов, продукцию цитокинов и цитолитическую активность, что приводит к функциональной инактивации или истощению Т-клеток.[2] CD80 — молекула, экспрессируемая на антиген-презентирующих клетках и активированных Т-лимфоцитах. Связывание PD-L1 с CD80 на Т-лимфоцитах и антиген-презентирующих клетках может способствовать снижению числа иммунных ответов, в том числе подавлять активацию Т-лимфоцитов и выработку цитокинов.[3] Экспрессия PD-L1 наблюдалась в иммунных клетках и опухолевых клетках.[4,5] Было выявлено, что аберрантная экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках препятствует функционированию противоопухолевого иммунитета, приводя к ускользанию от иммунологического надзора.[2,5] Таким образом, прерывание сигнального пути PD-L1/PD-1 представляет собой перспективную стратегию укрепления опухолеспецифичного Т-клеточного иммунитета, подавляемого экспрессией PD-L1 в опухолевом микроокружении.

PD-L1 экспрессируется самыми разными видами рака, включая рак легких, меланому, рак уротелия, рак яичников и колоректальный рак. Было выявлено, что распространенность экспрессии PD-L1 колеблется от 12 % до 100 % в зависимости от типа опухоли, клона анти-PD-L1 и порогового значения положительности.[6]

## ПРИНЦИП ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

В методе анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay используется первичное кроличье моноклональное антитело, которое связывается с PD-L1 в срезах тканей, ранее залитых в парафин. Специфическое антитело можно визуализировать с использованием набора OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700 / 06396500001). Дополнительную информацию см. на листке-вкладыше соответствующего набора OptiView DAB IHC Detection Kit.

## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

VENTANA PD-L1 (SP263) Assay содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 50 тестов.

Один дозатор VENTANA PD-L1 (SP263) Assay объемом 5 mL содержит приблизительно 8,05 мкг кроличьего моноклонального антитела.

Антитело разбавлено раствором 0,05 M Tris-HCL с 1 % белка-носителя и 0,10 % консерванта ProClin 300.

Общая концентрация белка в реактиве составляет приблизительно 10 мг/mL. Концентрация специфических антител составляет около 1,61 мкг/mL. Неспецифической реактивности антител у данного продукта не обнаружено.

VENTANA PD-L1 (SP263) Assay является рекомбинантным кроличьим моноклональным антителом, полученным из супернатанта клеточной культуры.

На листке-вкладыше соответствующего набора для обнаружения VENTANA можно найти более подробное описание принципов действия; материалов и методов; сбора образцов тканей и подготовки к анализу; процесса контроля качества; принципов поиска и устранения проблем; результатов; общих ограничений.

## НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

В комплект поставки не входят красящие реагенты, например наборы для обнаружения VENTANA, а также вспомогательные компоненты, в том числе микропрепараты для отрицательного и положительного контроля.

Продукты, перечисленные в листке-вкладыше, могут быть недоступны в некоторых странах. Проконсультируйтесь с местным представителем службы поддержки.



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

Для окрашивания могут потребоваться следующие реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки:

1. Рекомендованный тканевый контроль.
2. Предметные стекла для микроскопа (с положительным зарядом).
3. Этикетки со штрихкодом.
4. Ксилол (гистологической степени очистки).
5. Этанол или спиртосодержащий реагент (гистологической степени очистки).
   - 100 % раствор: неразбавленный этанол или спиртосодержащий реагент.
   - 95 % раствор: смешать 95 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 5 частями деионизированной воды.
   - 80 % раствор: смешать 80 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 20 частями деионизированной воды.
6. Деионизированная или дистиллированная вода.
7. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (№ по каталогу 790-4795 / 06683380001)
8. OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700 / 06396500001)
9. EZ Prep Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-102 / 05279771001)
10. Reaction Buffer Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-300 / 05353955001)
11. ULTRA LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-210 / 05424534001)
12. LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-010 / 05264839001)
13. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (№ по каталогу 950-224 / 05424569001)
14. Cell Conditioning Solution (CC1) (№ по каталогу 950-124 / 05279801001)
15. Hematoxylin II (№ по каталогу 790-2208 / 05277965001)
16. Bluing Reagent (№ по каталогу 760-2037 / 05266769001)
17. Постоянная гистологическая среда для заливки образцов (Permount Fisher № по каталогу SP15-500 или эквивалентный продукт).
18. Покровное стекло (для помещения образцов ткани под стекло, например, VWR № по каталогу 48393-060)
19. Автоматический аппарат для заключения под покровное стекло (например, Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
20. Световой микроскоп.
21. Гигроскопические салфетки.

## ХРАНЕНИЕ

После получения препарата и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживать.

Для обеспечения надлежащей сохранности реагента и стабильности антител после каждого использования необходимо закрывать флакон-дозатор крышкой и сразу ставить его в холодильник в вертикальном положении.

На каждом флаконе-дозаторе с раствором антител указан срок годности. При соблюдении условий хранения реагент остается стабильным до даты, указанной на этикетке. Не использовать реагент после истечения срока годности.

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Данное первичное антитело можно применять для окрашивания подготовленных стандартным образом, фиксированных формалином и залитых в парафин тканей при условии использования диагностического набора OptiView DAB IHC Detection Kit, а также аппаратов BenchMark IHC/ISH. На основании исследования тканей плаценты и миндалин, экспрессирующих PD-L1, в качестве фиксатора тканей рекомендуется 10 %-й нейтральный забуференный формалин (NBF) в течение от минимум 6 до 72 часов. При времени фиксации не менее 6 часов приемлемыми фиксаторами для использования с VENTANA PD-L1 (SP263) Assay являются цинк-формалин и Z-5. Прочие фиксаторы, включая 95-процентный спирт, AFA и фиксатор PREFER, непригодны для использования с методом VENTANA PD-L1 (SP263) Assay. Используемое количество фиксатора составляет от 15 до 20 объемов ткани. Фиксация может выполняться при комнатной температуре (15–25 °C).[7] Дальнейшее обсуждение воздействия подготовки образца на окрашивание PD-L1 с помощью VENTANA PD-L1 (SP263) Assay приведено в Руководстве по интерпретации (номер по каталогу 1015317EN для NSCLC и номер по каталогу 1015882EN для UC).

Необходимо получить срезы толщиной 4–5 мкм и нанести их на положительно заряженные предметные стекла. Предметные стекла должны быть окрашены в течение максимальной продолжительности хранения (Таблица 2). Антигенные свойства тканевых срезов могут уменьшаться со временем и ухудшаться после срезания с парафинового блока.

**Таблица** 2. Стабильность тканевых срезов

| Тип ткани | Максимальный срок хранения (при 2–8 °C или 15–30 °C) |
|---|---|
| NSCLC | 12 месяцев |
| Уротелиальная карцинома | 6 месяцев |
| Плацента | 9 месяцев |

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики *in vitro* (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. В данном реагенте в качестве консерванта используется раствор ProClin 300. Он относится к раздражающим средствам и при контакте с кожей может стать причиной сенсибилизации. При работе с реагентом соблюдайте обоснованные меры предосторожности. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. Используйте защитную одежду и перчатки.
4. Обладающие положительным электрическим зарядом предметные стекла могут быть подвержены неблагоприятным воздействиям со стороны окружающей среды, вследствие чего окрашивание любыми иммуногистохимическими методами приведет к неудовлетворительным результатам, например вследствие недостаточного количества первичного антитела или контрастного окрашивания в тканях. Запросите у своего представителя компании Roche копию документа «Impacts of Environmental Stresses on IHC Positively Charged Slides» для того, чтобы лучше понять принцип использования предметных стекол такого типа.
5. Материалы животного и человеческого происхождения должны рассматриваться как биологически опасные и утилизироваться с надлежащими предосторожностями.
6. Избегайте контакта реагентов с глазами и слизистыми оболочками. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды.
7. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.
8. Проконсультируйтесь с местными и (или) государственными органами в отношении рекомендованного способа утилизации.
9. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.
10. В некоторых странах лечение препаратом KEYTRUDA®, OPDIVO® или IMFINZI™, может быть недоступно.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Антитело VENTANA PD-L1 (SP263) Assay предназначено для использования с аппаратами BenchMark IHC/ISH в сочетании с диагностическими наборами VENTANA и вспомогательными материалами. Рекомендованные протоколы окрашивания (Таблица 3).

Данное антитело оптимизировано для инкубации в течение конкретных периодов времени, однако пользователю необходимо провести валидацию результатов, полученных с использованием данного реагента.

Параметры автоматических процедур могут быть отображены на экране, напечатаны и отредактированы согласно процедуре, описанной в руководстве пользователя, прилагаемом к соответствующему аппарату. Подробная информация о процедурах иммуногистохимического окрашивания содержится на листке-вкладыше соответствующего набора для обнаружения VENTANA.



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

**Таблица** 3. Рекомендованные протоколы окрашивания для VENTANA PD-L1 (SP263) Assay с помощью OptiView DAB IHC Detection Kit на аппаратах BenchMark IHC/ISH.

| **Тип процедуры** | ULTRA VENTANA PD-L1 (SP263) Assay<br>XT VENTANA PD-L1 (SP263) Assay<br>GX VENTANA PD-L1 (SP263) Assay |
|---|---|
| **Этапы протокола** | **Ввод параметров** |
| **Прогрев** | Дополнительно |
| **Антитело (первичное)** | VENTANA PD-L1 (SP263) Selected<br>или<br>Negative Control Требуется |
| **Контрастное окрашивание** | Hematoxylin II, 4–8 минут |

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

### Отрицательный контроль реагента

Для облегчения интерпретации результатов необходимо использовать соответствующий микропрепарат для реагента для отрицательного контроля с каждым образцом. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig является соответствующим антителом для реагента для отрицательного контроля в данном анализе и используется вместо первичного антитела для оценки неспецифического окрашивания. Процедура окрашивания препарата с отрицательным контролем реагентов должна быть идентична окрашиванию с первичным антителом. Использование другого реагента для отрицательного контроля или неиспользование рекомендованного реагента отрицательного контроля может привести к неверной интерпретации окрашенного для анализа препарата.

### Тканевый контроль

Препарат контрольной ткани должен включаться в каждый цикл окрашивания. Оптимальная лабораторная практика — помещение среза для положительного контроля на одно стекло с образцом исследуемой ткани. Это позволяет распознать случаи, когда реагенты нанесены на предметное стекло неправильно. Контрольный образец ткани следует зафиксировать как можно скорее и обработать способом, идентичным способу обработки ткани пациента. С помощью такой ткани можно контролировать все этапы анализа, начиная от подготовки ткани и заканчивая окрашиванием. Тканевый срез, зафиксированный или обработанный отличным от тканей пациента образом, можно использовать в качестве контроля для реагентов и окрашивания, но не для фиксации или подготовки ткани.

Квалифицированная нормальная человеческая плацентарная ткань может быть использована в качестве тканевого контроля в методе анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay. Плацентарная ткань содержит элементы с положительным и отрицательным окрашиванием по белку PD-L1, поэтому она подходит для использования в качестве тканевого контроля. Процедура надлежащего окрашивания компонентов плацентарной ткани (Таблица 4) описана в Руководстве по интерпретации (номер по каталогу 1015317EN для NSCLC и номер по каталогу 1015882EN для UC).

Кроме того, ткани NSCLC или UC, демонстрирующие гетерогенную интенсивность окрашивания с общей умеренной экспрессией PD-L1, также могут быть использованы в качестве тканевого контроля для анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay.

Если в ходе изучения контрольного микропрепарата не выявлены признаки надлежащего окрашивания или наблюдается изменение интерпретации, все результаты анализа исследуемых образцов следует считать недействительными. В этом случае требуется выполнить повторное окрашивание.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОКРАШИВАНИЯ/ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

В автоматическом иммуногистостейнере VENTANA в результате реакций образуется коричневый продукт DAB, который оседает в местах расположения антигена, выявленного с помощью реактива VENTANA PD-L1 (SP263) Assay. Окрашенные микропрепараты интерпретируются квалифицированным патоморфологом с использованием средств световой микроскопии. Перед интерпретацией полученных результатов квалифицированный патоморфолог, имеющий опыт применения иммуногистохимических методик, должен оценить тканевые контроли и приемлемость качества окраски микропрепарата.

Специфические характеристики и изображения см. в VENTANA PD-L1 (SP263) Assay Interpretation Guide for NSCLC (номер по каталогу 1015317EN) и UC (1015882EN).

### Плацента в качестве контрольной ткани

Плацентарная ткань, окрашенная с помощью метода VENTANA PD-L1 (SP263) Assay, демонстрирует однородное окрашивание мембраны клеток от умеренного до выраженного и окрашивание цитоплазмы клеток линии трофобласта от слабого до выраженного. Стромальная ткань и сосудистая сеть плаценты могут быть использованы для оценки любого фонового (Таблица 4) окрашивания.

**Таблица** 4. Критерии оценки тканевого контроля плаценты для анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay.

| **Интерпретация** | **Описание окрашивания** |
|---|---|
| Приемлемо | Однородное окрашивание мембраны клеток линии трофобласта от умеренного до выраженного; отсутствие окрашивания плацентарной стромы и сосудистой сети. |
| Недопустимый результат | Однородное окрашивание мембраны клеток линии трофобласта от отсутствия до слабого окрашивания и (или) специфическое окрашивание плацентарной стромы и сосудистой ткани. |

### Отрицательный контроль реагента

Неспецифическое окрашивание, если оно есть, может иметь диффузный характер и может быть оценено с использованием микропрепарата для отрицательного контроля реагента, окрашенного методом Rabbit Monoclonal Negative Control Ig. Для интерпретации результатов окрашивания следует использовать интактные клетки, так как клетки с признаками некроза или дегенерации часто демонстрируют неспецифическое окрашивание. Если наблюдается чрезмерное фоновое окрашивание, результаты для исследуемого образца считаются недостоверными.

### Ткань пациента

Характер окрашивания с использованием реагента VENTANA PD-L1 (SP263) Assay в опухолевых клетках — мембранный и (или) цитоплазматический. Клетки иммунной системы демонстрируют окрашивание линейно-мембранного, диффузно-цитоплазматического и/или точечного характера. Считается, что цитоплазматическое окрашивание опухолевых клеток, если оно есть, не является положительным фактором для целей оценки.

Опухолевые клетки (TC) оцениваются в процентах опухолевых клеток с окрашиванием мембраны по PD-L1 любой интенсивности выше фонового окрашивания, как указано в соответствующем отрицательном контроле.

Иммунокомпетентные клетки (IC) оцениваются в процентах ассоциированных с опухолью иммунокомпетентных клеток (IC+) с окрашиванием любой интенсивности выше фонового окрашивания, как указано в соответствующем отрицательном контроле.

Оценка ткани пациента должна проводиться в соответствии с алгоритмом оценивания результатов применения метода VENTANA PD-L1 (SP263) Assay специфичным для определенного показания.

### Алгоритм оценки — NSCLC

Ткань NSCLC необходимо оценивать в соответствии с алгоритмом оценивания результатов метода VENTANA PD-L1 (SP263) Assay для NSCLC (Таблица 5) и критериями оценки неспецифического фонового окрашивания (Таблица 6). Дополнительные инструкции и характерные изображения представлены в Руководстве по интерпретации (номер по каталогу 1015317EN).

**Таблица** 5. Алгоритм оценки VENTANA PD-L1 (SP263) Assay ткани NSCLC.

| **Интерпретация** PD-L1 | **Описание окрашивания** |
|---|---|
| ≥ 1 % | 1 % и больше опухолевых клеток с положительным окрашиванием мембраны по PD-L1 любой интенсивности, превышающей интенсивность фонового окрашивания, как указано в соответствующем отрицательном контроле. |



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

| Интерпретация PD-L1 | Описание окрашивания |
|---|---|
| < 1 % | Меньше 1 % опухолевых клеток с положительным окрашиванием мембраны по PD-L1 любой интенсивности, превышающей интенсивность фонового окрашивания, как указано в соответствующем отрицательном контроле. |
| ≥ 5 % | 5 % или больше опухолевых клеток с положительным окрашиванием мембраны по PD-L1 любой интенсивности, превышающей интенсивность фонового окрашивания, как указано в соответствующем отрицательном контроле. |
| < 5% | Меньше 5 % опухолевых клеток с положительным окрашиванием мембраны по PD-L1 любой интенсивности, превышающей интенсивность фонового окрашивания, как указано в соответствующем отрицательном контроле. |
| ≥ 10 % | 10 % или больше опухолевых клеток с положительным окрашиванием мембраны по PD-L1 любой интенсивности, превышающей интенсивность фонового окрашивания, как указано в соответствующем отрицательном контроле. |
| < 10% | Меньше 10 % опухолевых клеток с положительным окрашиванием мембраны по PD-L1 любой интенсивности, превышающей интенсивность фонового окрашивания, как указано в соответствующем отрицательном контроле. |
| ≥ 50 % | 50 % или больше опухолевых клеток с положительным окрашиванием мембраны по PD-L1 любой интенсивности, превышающей интенсивность фонового окрашивания, как указано в соответствующем отрицательном контроле. |
| < 50 % | Меньше 50 % опухолевых клеток с положительным окрашиванием мембраны по PD-L1 любой интенсивности, превышающей интенсивность фонового окрашивания, как указано в соответствующем отрицательном контроле. |

**Таблица** 6. Критерии оценки неспецифического фонового окрашивания для метода анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay.

| Интерпретация | Описание окрашивания |
|---|---|
| Приемлемо | Неспецифическое окрашивание, которое не требует однозначной интерпретации специфического окрашивания. |
| Недопустимый результат | Неспецифическое окрашивание, которое требует однозначной интерпретации специфического окрашивания. |

### Алгоритм оценивания для уротелиальной карциномы

Ткань UC необходимо оценивать в соответствии с алгоритмом оценивания результатов анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay для уротелиальной карциномы (Таблица 7) и критериями оценки неспецифического фонового окрашивания (Таблица 6). Дополнительные инструкции и характерные изображения представлены в Руководстве по интерпретации (номер по каталогу 1015882EN).

**Таблица** 7. Алгоритм оценки результатов VENTANA PD-L1 (SP263) Assay для уротелиальной карциномы.

| Интерпретация PD-L1 | Описание окрашивания |
|---|---|
| Статус PD-L1 определяется по доле опухолевых клеток с мембранным окрашиванием любой интенсивности выше фонового окрашивания или по доле ассоциированных с опухолью иммунокомпетентных клеток с окрашиванием (IC+) любой интенсивности выше фонового окрашивания. На основе доли площади опухоли, занятой любыми ассоциированными с опухолью иммунокомпетентными клетками (присутствующие иммунокомпетентные клетки, ICP), определяется значение IC+, которое соответствует относительной площади ICP демонстрирующих PD-L1 положительное окрашивание иммунокомпетентных клеток. | |
| Верхнее значение | Уровень экспрессии PD-L1 считается высоким при любом из следующих условий:<br>• мембранное окрашивание ≥ 25 % опухолевых клеток, или<br>• ICP > 1 % и IC+ ≥ 25 %; или,<br>• ICP = 1 % и IC+ = 100 %. |
| Низкое значение или отрицательный результат | Уровень экспрессии PD-L1 считается низким или отрицательным, если:<br>• окрашивание не удовлетворяет ни одному из критериев высокого уровня экспрессии PD-L1. |

## СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Метод анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay был разработан для аппаратов BenchMark IHC/ISH с диагностическим набором OptiView DAB IHC Detection Kit и не предназначен для использования с другими диагностическими наборами и аппаратами.
2. Образцы, взятые у пациентов, следует окрашивать с применением реагента Rabbit Monoclonal Negative Control Ig. Другие реагенты для отрицательного контроля непригодны для использования в данном анализе.
3. Этот анализ не проходил валидацию для использования с цитологическими образцами или декальцинированными образцами кости.
4. Тестирование анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay при холодовой ишемии с использованием модели тканей ксенотрансплантата с нулевого до 24-го часа не выявило каких-либо условий, которые неблагоприятно сказались бы на результате анализа.
5. Этот анализ может регистрироваться не на каждом инструменте. Для получения дополнительной информации обратитесь к местному представителю компании Roche.

## СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ ДЛЯ УРОТЕЛИАЛЬНОЙ КАРЦИНОМЫ

1. Клинические зависимости между анализом VENTANA PD-L1 (SP263) Assay и частотой объективных откликов были подвергнуты оценке в несравнительном исследовании с применением препарата IMFINZI™ (дурвалумаб), в ходе которого все пациенты получали лечение дурвалумабом. На основе зависимостей, наблюдаемых между уровнем экспрессии PD-L1 и ORR, можно составить прогноз о естественном течении заболевания или о вероятности отклика опухоли на лечение.
2. У крайне малого количества клинических образцов ICP= 1 %, а интенсивность окрашивания 100 % площади ICP была выше фонового окрашивания. Среди подвергнутых анализу образцов не оказалось таких, которые удовлетворяли бы этому критерию. Поэтому аналитическая или клиническая база для оценки иммунокомпетентных клеток при ICP = 1 % является скудной.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ — ОБЩИЕ

### Чувствительность и специфичность — Общие сведения

Массивы, содержащие разного рода нормальные ткани, были окрашены при помощи метода анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay и оценены на предмет мембранного окрашивания PD-L1 (Таблица 8). Дополнительное окрашивание, например цитоплазматическое или иммунное, также указано (Таблица 8).



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

**Таблица** 8. Чувствительность/Специфичность окрашивания реагентом VENTANA PD-L1 (SP263) Assay определялась путем окрашивания зафиксированных формалином и залитых в парафин нормальных тканей.

| Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев | Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|---|---|
| Надпочечник | 0/3* | Мезотелий | 0/3† |
| Мочевой пузырь | 0/3 | Миелоидная ткань (костный мозг) | 0/4*,† |
| Молочная железа | 0/3 | Нерв (тонкий) | 0/3 |
| Мозжечок | 0/3 | Яичник | 0/3 |
| Головной мозг | 0/3 | Поджелудочная железа | 0/3* |
| Шейка матки | 0/3 | Паращитовидная железа | 0/4 |
| Толстый кишечник | 0/3† | Простата | 0/3 |
| Эндометрий | 0/3 | Слюнная железа | 0/3† |
| Пищевод | 1/3*,† | Скелетная мускулатура | 0/3 |
| Сердце | 0/3 | Кожа | 0/4‡ |
| Гипофиз | 0/3*,† | Селезенка | 0/3† |
| Кишечник, тонкий | 0/3† | Желудок | 0/3*,† |
| Почка | 0/3† | Яичко | 0/3 |
| Гортань | 0/3† | Вилочковая железа | 0/3† |
| Печень | 0/3 | Щитовидная железа | 0/3*,† |
| Легкое | 0/3† | Миндалины | 3/3† |
| Лимфоузел | 0/3† | | |

Дополнительное наблюдавшееся окрашивание: * Цитоплазматическое окрашивание. † Окрашивание иммунных клеток ‡ Меланоцитарное окрашивание.

Для данного исследования оказалось невозможно оценить процент IC, окрашенных с большей интенсивностью, чем фоновое окрашивание, поскольку область опухоли, для которой можно было бы оценить иммунокомпетентные клетки, инфильтрирующие ткань опухоли, отсутствует.

Кроме того, оценка набора опухолевых тканей на окрашивание опухолевых и иммунокомпетентных клеток посредством VENTANA PD-L1 (SP263) Assay выполнена согласно описанию в Таблица 9.

**Таблица** 9. Чувствительность/специфичность метода VENTANA PD-L1 (SP263) Assay определяли путем исследования ряда фиксированных формалином и залитых в парафин препаратов опухолевых тканей на предмет мембранного окрашивания опухолевых и иммунокомпетентных клеток.

| Источник | Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев | |
|---|---|---|---|
| | | Опухолевые клетки | Иммунокомпетентные клетки |
| Головной мозг | Глиобластома | 0/1 | 1/1 |
| Головной мозг | Атипичная менингиома | 0/1 | 0/1 |
| Головной мозг | Злокачественная эпендимома | 0/1 | 1/1 |
| Головной мозг | Олигодендроглиома | 0/1 | 0/1 |
| Яичник | Серозная аденокарцинома | 0/1 | 1/1 |
| Яичник | Аденокарцинома | 1/1 | 0/1 |
| Поджелудочная железа | Опухоль островков поджелудочной железы | 0/1 | 0/1 |
| Поджелудочная железа | Аденокарцинома | 0/1 | 1/1 |
| Яичко | Семинома | 0/1 | 0/1 |
| Яичко | Эмбриональная карцинома | 0/1 | 0/1 |
| Щитовидная железа | Медуллярная карцинома | 0/1 | 0/1 |
| Щитовидная железа | Папиллярная карцинома | 1/1 | 0/1 |
| Молочная железа | Интрадуктальная карцинома | 0/1 | 1/1 |
| Молочная железа | Инвазивная протоковая карцинома | 0/2 | 0/2 |
| Селезенка | Диффузная В-клеточная лимфома | 0/1 | 1/1 |
| Легкое | Недифференцированная мелкоклеточная карцинома | 1/1 | 1/1 |
| Легкое | Плоскоклеточная карцинома | 1/1 | 1/1 |
| Легкое | Аденокарцинома | 0/1 | 0/1 |
| Пищевод | Нейроэндокринная карцинома | 0/1 | 0/1 |
| Пищевод | Аденокарцинома | 0/1 | 0/1 |
| Желудок | Перстневидноклеточная карцинома | 0/1 | 0/1 |
| Тонкий кишечник | Аденокарцинома | 0/1 | 0/1 |



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

| Источник | Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев | |
|---|---|---|---|
| | | Опухолевые клетки | Иммунокомпетентные клетки |
| Тонкий кишечник | Стромальная саркома | 0/1 | 0/1 |
| Толстый кишечник | Аденокарцинома | 0/1 | 1/1 |
| Толстый кишечник | Интерстициальная опухоль | 0/1 | 0/1 |
| Прямая кишка | Аденокарцинома | 0/1 | 0/1 |
| Прямая кишка | Умеренно дифференцированная злокачественная интерстициальная опухоль | 0/1 | 0/1 |
| Печень | Гепатоцеллюлярная карцинома | 0/1 | 0/1 |
| Печень | Гепатобластома | 0/1 | 0/1 |
| Почка | Светлоклеточная карцинома | 0/1 | 0/1 |
| Простата | Аденокарцинома | 0/2 | 0/2 |
| Матка | Лейомиома | 0/1 | 0/1 |
| Матка | Аденокарцинома | 0/1 | 0/1 |
| Матка | Светлоклеточная карцинома эндометрия | 1/1 | 0/1 |
| Шейка матки | Плоскоклеточная карцинома | 0/2 | 2/2 |
| Поперечно-полосатая мышца | Эмбриональная рабдомиосаркома | 0/1 | 0/1 |
| Прямая кишка | Злокачественная меланома | 0/1 | 0/1 |
| Кожа | Базальноклеточная карцинома | 0/1 | 0/1 |
| Кожа | Плоскоклеточная карцинома | 0/1 | 0/1 |
| Спина | Нейрофиброма | 0/1 | 1/1 |
| Забрюшинное пространство | Нейробластома | 0/1 | 0/1 |
| Брюшная полость | Злокачественная мезотелиома | 0/1 | 0/1 |
| Средостение | Диффузная В-клеточная лимфома | 1/1 | 1/1 |
| Лимфоузел | Лимфома Ходжкина (Hodgkin) | 1/1 | 1/1 |
| Лимфоузел | Диффузная В-клеточная лимфома | 1/1 | 1/1 |
| Тазовая полость | Анапластическая крупноклеточная лимфома | 1/1 | 1/1 |
| Мочевой пузырь | Лейомиосаркома низкой степени злокачественности | 0/1 | 0/1 |
| Кость | Остеосаркома | 0/1 | 1/1 |
| Забрюшинное пространство | Веретеноклеточная рабдомиосаркома | 0/1 | 0/1 |
| Гладкая мускулатура | Умеренно злокачественная лейомиосаркома | 0/1 | 0/1 |
| Мочевой пузырь | Переходноклеточная карцинома | 1/1 | 1/1 |

### Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность. Ткани плаценты в качестве контроля

Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность метода анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay, примененного к тканям плаценты человека, оценивались при помощи аппарата BenchMark ULTRA в сочетании с набором OptiView DAB IHC Detection Kit.

Для определения внутрисуточной повторяемости было использовано 8 уникальных образцов ткани плаценты; из каждого такого образца было приготовлено по 5 одинаковых микропрепаратов, которые окрашивали по методу VENTANA PD-L1 (SP263) Assay с использованием одного аппарата BenchMark ULTRA в течение дня.

Для определения межсуточной прецизионности было использовано 8 уникальных образцов ткани плаценты; из каждого такого образца было приготовлено по 2 одинаковых микропрепарата, которые окрашивали по методу VENTANA PD-L1 (SP263) Assay с использованием одного аппарата BenchMark ULTRA в течение 5 дней (не подряд) на протяжении по меньшей мере двадцати дней.

Для определения прецизионности между разными аппаратами каждый из 12 уникальных образцов плаценты окрашивали по методу VENTANA PD-L1 (SP263) Assay с использованием трех аппаратов BenchMark ULTRA.

Все предметные стекла были оценены в соответствии с алгоритмом оценивания результатов метода VENTANA PD-L1 (SP263) Assay, примененного к контрольной ткани плаценты (приведен в Таблица 4).

Общий процент совпадения для внутрисуточной и межсуточной воспроизводимости и воспроизводимости между разными аппаратами составил 100 %, 100 % и 98,8 % соответственно.

### Воспроизводимость между партиями. Ткани плаценты в качестве контроля

Оценка воспроизводимости VENTANA PD-L1 (SP263) Assay между партиями для контрольной ткани была проведена на 12 уникальных образцах ткани плаценты человека с использованием трех партий VENTANA PD-L1 (SP263) antibody. Общий процент совпадения для воспроизводимости между партиями антител составил 98,8 %.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ — NSCLC

### Чувствительность — NSCLC

Чувствительность метода VENTANA PD-L1 (SP263) Assay была протестирована путем использования производственных партий VENTANA PD-L1 (SP263) Assay



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

промышленного изготовления на 733 уникальных образцах NSCLC, подготовленных в виде микропрепаратов FFPE. Оценка экспрессии PD-L1 продемонстрировала положительное окрашивание опухолевых клеток в диапазоне от 0 до 100 %.

### Повторяемость и промежуточная прецизионность - NSCLC

Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность метода анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay оценивались при помощи аппарата BenchMark ULTRA в сочетании с набором OptiView DAB IHC Detection Kit путем окрашивания 24 уникальных образцов NSCLC человека.

Для определения внутрисуточной повторяемости по 5 однородных микропрепаратов из каждого образца ткани NSCLC окрашивали с использованием одного День аппарата BenchMark ULTRA.

Для определения межсуточной прецизионности по 2 однородных микропрепарата из каждого образца ткани NSCLC окрашивали при помощи анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay с использованием одного аппарата BenchMark ULTRA в течение 5 дней вразбивку на протяжении как минимум двадцати дней.

Для определения прецизионности между разными аппаратами каждый образец ткани NSCLC окрашивали при помощи метода анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay с использованием трех аппаратов BenchMark ULTRA. Все предметные стекла были замаскированы, рандомизированы и оценены с использованием алгоритма оценивания для результатов метода VENTANA PD-L1 (SP263) Assay (Таблица 5).

Резюме полученных результатов приведено в Таблица 10.

**Таблица** 10. Исследование повторяемости и внутрилабораторной прецизионности метода анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay на отдельных образцах NSCLC.

| **Уровень экспрессии** PD-L1 | **Экспрессия ≥ 1 %** | **Экспрессия ≥ 5 %** | **Экспрессия ≥ 10 %** | **Экспрессия ≥ 50 %** |
|---|---|---|---|---|
| **Повторяемость/ прецизионность** | **Общий процент совпадения** (95 % CI) | **Общий процент совпадения** (95 % CI) | **Общий процент совпадения** (95 % CI) | **Общий процент совпадения** (95 % CI) |
| Внутрисуточная повторяемость (в пределах одного дня) | 100,0 % (96,9–100,0)* | 99,2 % (95,4–99,9)* | 98,3 % (94,1–99,5)* | 100,0 % (96,9–100,0)* |
| Межсуточная прецизионность (5 непоследовательных дней) | 100,0 % (98,4–100,0)* | 97,9 % (95,2–99,1)* | 98,8 % (96,4–99,6)* | 100,0 % (98,4–100)* |
| Прецизионность результатов между разными аппаратами (для 3 приборов) | 100 % (99,4–100,0)* | 96,5 % (94,7–97,6)* | 95,2 % (93,3–96,6)* | 97,2 % (94,6–99,2)** |

* Значения 2-стороннего 95-процентного доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

** Значения 2-стороннего 95-процентного доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода бутстреп-процентилей на основе 2000 бутстреп-выборок.

### Повторяемость между партиями — NSCLC

Воспроизводимость между партиями в методе анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay определялась путем тестирования трех партий антител для анализа по методу VENTANA PD-L1 (SP263) Assay на 24 уникальных образцах NSCLC в аппаратах BenchMark ULTRA с использованием набора OptiView DAB IHC Detection Kit. Все образцы окрашивали при помощи каждой из трех партий VENTANA PD-L1 (SP263) antibody. Перед оценкой экспрессии PD-L1 все предметные стекла были замаскированы и рандомизированы в соответствии с алгоритмом оценивания результатов метода VENTANA PD-L1 (SP263) Assay (Таблица 5). Результаты представлены в виде таких показателей (Таблица 11), как общий процент совпадения, процент совпадения положительных результатов и процент совпадения отрицательных результатов для каждого уровня экспрессии.

**Таблица** 11. Уровень согласованности воспроизводимости между партиями среди образцов ткани NSCLC.

| **Повторяемость между партиями** | **Процент совпадения положительных результатов** (95 % CI) | **Процент совпадения отрицательных результатов** (95 % CI) | **Общий процент совпадения** (95 % CI) |
|---|---|---|---|
| Среднее для всех трех сравнений между партиями Экспрессия ≥ 1 % | 100 % (99,0–100,0)* | 100 % (98,6–100,0)* | 100 % (99,4–100,0)* |
| Среднее для всех трех сравнений между партиями Экспрессия ≥ 5 % | 94,4 % (91,4–96,5)* | 98,5 % (96,4–99,3)* | 96,5 % (94,7–97,6)* |
| Среднее для всех трех сравнений между партиями Экспрессия ≥ 10 % | 97,5 % (94,7–98,9)* | 93,8 % (91,0–95,8)* | 95,2 % (93,3–96,6)* |
| Среднее для всех трех сравнений между партиями Экспрессия ≥ 50 % | 96,9 % (91,9–99,7)** | 97,5 % (94,9–99,5)** | 97,2 % (94,4–99,1)** |

* Значения 2-стороннего 95-процентного доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

** Значения 2-стороннего 95-процентного доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода бутстреп-процентилей на основе 2000 бутстреп-выборок.

### Исследование прецизионности между экспертами и по каждому эксперту — NSCLC

Для сравнения прецизионности оценок одного и разных экспертов три патоморфолога оценивали 114 уникальных образцов. Перед оценкой окрашивания PD-L1 IHC образцы были замаскированы и рандомизированы в соответствии с алгоритмом оценивания анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay (Таблица 5). Результаты, приведенные ниже (Таблица 12), отображают показатели прецизионности между экспертами и для одного эксперта, полученные в данной группе клинического исследования для уникальных случаев.

**Таблица** 12. Сводные данные исследования прецизионности между экспертами и по каждому эксперту

| **Прецизионность эксперта** | **Среднее положительное совпадение** (95 % CI)* | **Среднее отрицательное совпадение** (95 % CI)* | **Общий процент совпадения** (95 % CI)* |
|---|---|---|---|
| Средняя прецизионность между экспертами для всех трех экспертов Экспрессия ≥ 1 % | 94,3 % (90,5–97,4) | 92,6 % (87,8–96,5) | 93,5 % (89,9–97,1) |
| Средняя прецизионность между экспертами для всех трех экспертов Экспрессия ≥ 5 % | 94,7 % (90,7–97,8) | 94,7 % (90,6–97,7) | 94,7 % (91,1–97,7) |



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

| Прецизионность эксперта | Среднее положительное совпадение (95 % CI)* | Среднее отрицательное совпадение (95 % CI)* | Общий процент совпадения (95 % CI)* |
|---|---|---|---|
| Средняя прецизионность между экспертами для всех трех экспертов Экспрессия ≥ 10 % | 93,0 % (88,4–96,6) | 94,0 % (90,0–97,1) | 93,5 % (89,5–97,0) |
| Средняя прецизионность между экспертами для всех трех экспертов Экспрессия ≥ 50 % | 94,6 % (90,6–97,8) | 95,0 % (91,1–97,9) | 94,8 % (91,2–97,8) |
| Средняя прецизионность по каждому эксперту для всех трех экспертов Экспрессия ≥ 1 % | 96,7 % (94,7–98,3) | 95,6 % (92,9–97,8) | 96,2 % (94,1–98,0) |
| Средняя прецизионность по каждому эксперту для всех трех экспертов Экспрессия ≥ 5 % | 95,8 % (92,7-98,2) | 96,0 % (93,2-98,3) | 95,9 % (93,3-98,2) |
| Средняя прецизионность по каждому эксперту для всех трех экспертов Экспрессия ≥ 10 % | 97,7 % (95,9-99,2) | 98,1 % (96,4-99,4) | 97,9 % (96,2-99,4) |
| Средняя прецизионность по каждому эксперту для всех трех экспертов Экспрессия ≥ 50 % | 97,2 % (95,2-98,8) | 97,3 % (95,2-98,9) | 97,2 % (95,4-98,8) |

* Значения 2-стороннего 95-процентного доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода бутстреп-процентилей на основе 2000 бутстреп-выборок.

### Межлабораторное исследование воспроизводимости результата — NSCLC

Было проведено межлабораторное исследование воспроизводимости результата для метода анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay с целью демонстрации воспроизводимости анализа при определении экспрессии PD-L1 в образцах NSCLC с использованием 28 образцов ткани в течение 5 дней вразбивку за 20-дневный период в трех сторонних лабораториях. Образцы были замаскированы, рандомизированы и оценены в общей сложности 6 экспертами (по 2 эксперта в каждой лаборатории). Таблица 13 с результатами.

**Таблица** 13. Межлабораторная воспроизводимость: Уровни согласованности для VENTANA PD-L1 (SP263) Assay.

| Межлабораторная воспроизводимость | Процент совпадения положительных результатов (95 % CI) | Процент совпадения отрицательных результатов (95 % CI) | Общий процент совпадения (95 % CI) |
|---|---|---|---|
| Во всех образцах Экспрессия ≥ 1 % | 89,9 % (87,0–92,3)* | 85,8 % (81,6–89,2)* | 88,3 % (85,9–90,3)* |
| Во всех образцах Экспрессия ≥ 5 % | 89,2 % (85,9–91,9)* | 93,7 % (90,9–95,7)* | 91,4 % (89,3–93,2)* |
| Во всех образцах Экспрессия ≥ 50 % | 95,4 % (92,6–97,2)* | 94,0 % (91,6–95,8)* | 94,6 % (92,8–95,9)* |
| Во всех образцах Экспрессия ≥ 50 % | 94,3 % (89,3–98,3)** | 90,1 % (82,6–96,1)** | 92,2 % (87,8–96,0)** |

* Значения 2-стороннего 95-процентного доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

** Значения 2-стороннего 95-процентного доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода бутстреп-процентилей на основе 2000 бутстреп-выборок.

### Исследование сравнения методов — NSCLC

Для получения разрешения на использование маркировки CE компания Ventana заказала компании AstraZeneca провести сравнительное исследование методик, в котором сравнивались данные доступных в настоящее время анализов PD-L1, PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (используемого в клинических исследованиях KEYTRUDA), PD-L1 IHC 28-8 pharmDx (используемого в клинических исследованиях OPDIVO) и VENTANA PD-L1 (SP263) Assay[8].

При проведении сравнительного исследования методик было использовано приблизительно 500 коммерчески приобретенных биоптатов NSCLC без идентифицирующей информации и не связанных с информацией о пациенте, которые сравнивались на предмет результатов окрашивания при помощи метода анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay на приборе BenchMark ULTRA с PD-L1 IHC 22C3 pharmDx и PD-L1 IHC 28-8 pharmDx на Autostainer Link 48. В исследование входили образцы NSCLC, представляющие собой динамический ряд экспрессии PD-L1. Все образцы были окрашены в одной центральной лаборатории с использованием каждой методики. Окрашенные предметные стекла были оценены с присвоением уровня экспрессии PD-L1 патоморфологом, обученным проведению анализов на наличие PD-L1 по методикам компаний VENTANA и Dako. В исследовании участвовал один патоморфолог.

Основной конечной точкой была точечная оценка достижения показателя 85 % или выше для процента совпадения положительных результатов (PPA), процента совпадения отрицательных результатов (NPA) и общего процента совпадения (OPA) с использованием метода анализа Dako для сравнения. Таблица 14 и Таблица 15 с результатами.

**Таблица** 14. Сравнение методик: Уровни согласованности для VENTANA PD-L1 (SP263) Assay по сравнению с PD-L1 IHC 22C3 pharmDx.

| Экспрессия анализа ≥ 1 % | PD-L1 IHC 22C3 pharmDx | | |
|---|---|---|---|
| VENTANA PD-L1 (SP263) Assay | Положительный результат | Отрицательный результат | Всего |
| Положительный результат | 256 | 21 | 277 |
| Отрицательный результат | 24 | 199 | 223 |
| Всего | 280 | 220 | 500 |
| | n/N | % (95 % CI) | |
| Соответствие процента положительных результатов | 256/280 | 91,4 (87,6–94,2) | |
| Соответствие процента отрицательных результатов | 199/220 | 90,5 (85,8–93,7) | |
| Общий процент совпадения | 455/500 | 91,0 (88,2–93,2) | |



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

| **Экспрессия анализа ≥ 50 %** | PD-L1 IHC 22C3 pharmDx | | |
|---|---|---|---|
| VENTANA PD-L1 (SP263) Assay | Положительный результат | Отрицательный результат | Всего |
| Положительный результат | 111 | 22 | 133 |
| Отрицательный результат | 10 | 357 | 367 |
| Всего | 121 | 379 | 500 |
| | n/N | % (95 % CI) | |
| Соответствие процента положительных результатов | 111/121 | 91,7 (85,5–95,4) | |
| Соответствие процента отрицательных результатов | 357/379 | 94,2 (91,4-96,1) | |
| Общий процент совпадения | 468/500 | 93,6 (91,1–95,4) | |

**Таблица** 15. Сравнение методик: Уровни согласованности для VENTANA PD-L1 (SP263) Assay по сравнению с PD-L1 IHC 28-8 pharmDx.

| **Экспрессия анализа ≥ 1 %** | PD-L1 IHC 28-8 pharmDx | | |
|---|---|---|---|
| VENTANA PD-L1 (SP263) Assay | Положительный результат | Отрицательный результат | Всего |
| Положительный результат | 264 | 13 | 277 |
| Отрицательный результат | 29 | 194 | 223 |
| Всего | 293 | 207 | 500 |
| | n/N | % (95 % CI) | |
| Соответствие процента положительных результатов | 264/293 | 90,1 (86,1–93,0) | |
| Соответствие процента отрицательных результатов | 194/207 | 93,7 (89,6–96,3) | |
| Общий процент совпадения | 458/500 | 91,6 (88,8–93,7) | |
| **Экспрессия анализа ≥ 5 %** | PD-L1 IHC 28-8 pharmDx | | |
| VENTANA PD-L1 (SP263) Assay | Положительный результат | Отрицательный результат | Всего |
| Положительный результат | 225 | 9 | 234 |
| Отрицательный результат | 21 | 245 | 266 |
| Всего | 246 | 254 | 500 |
| | n/N | % (95 % CI) | |
| Соответствие процента положительных результатов | 225/246 | 91,5 (87,3-94,3) | |
| Соответствие процента отрицательных результатов | 245/254 | 96,5 (93,4-98,1) | |
| Общий процент совпадения | 470/500 | 94,0 (91,6-95,8) | |

| **Экспрессия анализа ≥ 10 %** | PD-L1 IHC 28-8 pharmDx | | |
|---|---|---|---|
| VENTANA PD-L1 (SP263) Assay | Положительный результат | Отрицательный результат | Всего |
| Положительный результат | 192 | 17 | 209 |
| Отрицательный результат | 19 | 272 | 291 |
| Всего | 211 | 289 | 500 |
| | n/N | % (95 % CI) | |
| Соответствие процента положительных результатов | 192/211 | 91,0 (86,4–94,2) | |
| Соответствие процента отрицательных результатов | 272/289 | 94,1 (90,8–96,3) | |
| Общий процент совпадения | 464/500 | 92,8 (90,2–94,8) | |

## ИССЛЕДОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ РЕЗУЛЬТАТОВ — NSCLC IMFINZI

Эффективность IMFINZI оценивали в PACIFIC Study, рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом многоцентровом исследовании у 713 пациентов с локально развитым, неоперабельным NSCLC. Пациенты прошли, по меньшей мере, 2 цикла окончательной химиотерапии на основе платины с лучевой терапией в течение 1–42 дней до начала исследования и имели функциональный статус по ECOG 0 или 1. Девяносто два процента пациентов получили общую дозу 54–66 Гр излучения. В исследование были исключены пациенты, которые прогрессировали после химиолучевой терапии, пациенты с предыдущим воздействием любого антитела против PD-1 или PD-L1, пациенты с активным или ранее зарегистрированным аутоиммунным заболеванием в течение 2 лет после начала исследования; с иммунодефицитом в анамнезе; с тяжелыми иммунно опосредованными нежелательными реакциями в анамнезе; медицинские состояния, требующие системной иммуносупрессии, за исключением физиологической дозы системных кортикостероидов; активным туберкулезом или гепатитом B или C или ВИЧ-инфекцией, или пациенты, принимающие живую аттенуированную вакцину в течение 30 дней до или после начала IMFINZI. Пациентов случайным образом распределили (в пропорции 2:1) для приема 10 мг/кг IMFINZI(n = 476) или 10 мг/кг плацебо (n = 237) через внутривенную инфузию каждые 2 недели в течение 12 месяцев или до неприемлемой токсичности или подтвержденного прогрессирования заболевания. Рандомизация была стратифицирована по полу, возрасту (<65 лет по сравнению с 65 годами) и курению (курильщики и некурящие). Пациентам с контролем за заболеваниями через 12 месяцев была дана возможность повторно пройти лечение при прогрессировании заболевания. Оценка опухоли выполнялась каждые 8 недель в течение первых 12 месяцев, затем — каждые 12 недель. Пациенты были зарегистрированы независимо от уровня экспрессии опухоли PD-L1. Там, где это возможно, архивные образцы опухолевой ткани, полученные до химиолучевой терапии, ретроспективно тестировались на экспрессию PD-L1 на опухолевые клетки (TC) с использованием VENTANA PD-L1 (SP263) Assay. Из 713 рандомизированных пациентов, у 63 % пациентов были представлены образцы ткани достаточного качества и количества для определения экспрессии PD-L1, а 37 % были неизвестны.

Характеристики демографии и исходных заболеваний были хорошо сбалансированы между исследуемыми группами. Исходная демография общей исследуемой группы была следующей: мужчины (70 %), возраст ≥65 лет (45 %), возраст ≥ 75 лет (8 %), белые (69 %), азиаты (27 %), другое (4 %), курильщик (16 %), курильщик в прошлом (75 %), некурящий (9 %), функциональный статус ECOG 0 (49 %), функциональный статус ECOG 1 (51 %). Характеристики заболевания были следующими: Стадия IIIA (53 %), стадия IIIB (45 %), гистологические подгруппы: плоскоклеточная (46 %), неплоскоклеточная (54 %). Из 451 пациентов с экспрессией PD-L1 67 % составили TC ≥1 %, а 33 % составляли TC <1 %.

Двумя основными конечными точками исследования были выживаемость без прогрессирования (PFS) и общая выживаемость (OS) IMFINZI по сравнению с плацебо. Вторичные конечные точки эффективности включали PFS через 12 месяцев (PFS 12) и 18 месяцев (PFS 18) после рандомизации и Время от рандомизации до второго прогрессирования (PFS2). PFS была оценена в ходе централизованной проверки независимым экспертом, не имеющим данных об исследовании (BICR) в соответствии с RECIST 1.1.



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

Исследование продемонстрировало статистически значимое улучшение в PFS в группе лечения IMFINZI по сравнению с группой плацебо [отношение рисков (HR) = 0,52 (95 % CI: 0,42, 0,65), p <0,0001]. Исследование продемонстрировало статистически значимое улучшение OS в группе, получавшей лечение IMFINZI, по сравнению с группой плацебо [HR = 0,68 (95 % CI: 0,53, 0,87), p = 0,00251]. Улучшения PFS и OS в пользу пациентов, принимавших IMFINZI, по сравнению с пациентами, принимавшими плацебо, последовательно наблюдались во всех предварительно определенных подгруппах, включая этническую принадлежность, возраст, пол, историю курения, статус мутации EGFR и гистологию.

Для оценки эффективности экспрессии опухоли PD-L1 ≥ 1 %, <1 % и для пациентов, чей статус PD-L1 не может быть установлен (PD-L1 неизвестен), проводился дополнительный последующий аналитический анализ подгрупп. Результаты PFS и OS резюмированы на рисунках 1, 2, 3 и 4.

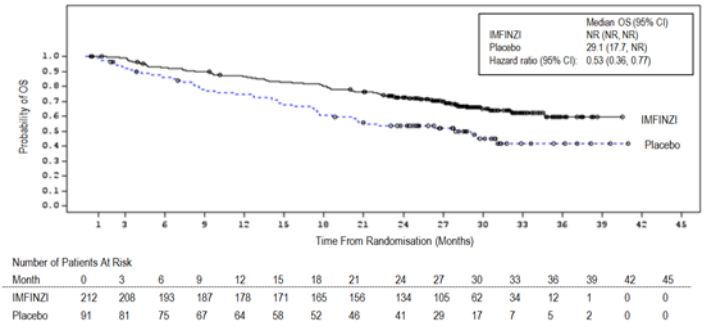



**Рисунок** 1. Кривая Kaplan-Meier OS для PD-L1 TC ≥ 1 %.

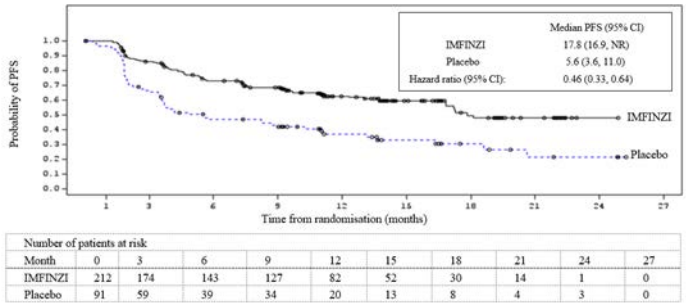



**Рисунок** 2. Кривая Kaplan-Meier PFS для PD-L1 TC ≥ 1 %

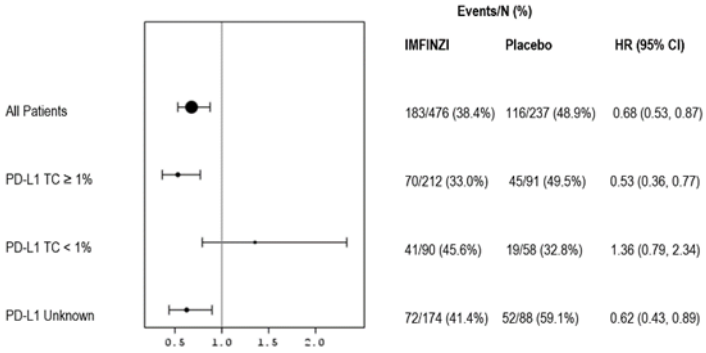



**Рисунок** 3. График «форест-плот» для OS на основе экспрессии PD-L1.

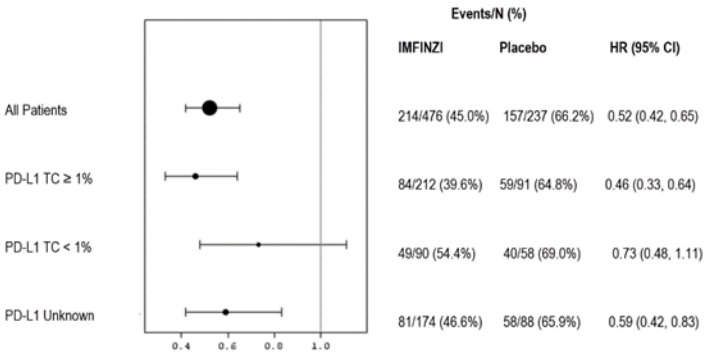



**Рисунок** 4. График «форест-плот» для PFS на основе экспрессии PD-L1.

## KEYTRUDA

### KEYNOTE-**024: Контролируемое исследование у пациентов с NSCLC, не получавших лечения ранее**

Безопасность и эффективность пембролизумаба были изучены в ходе многоцентрового контролируемого исследования KEYNOTE-024, посвященного лечению пациентов, ранее не получавших лечения от метастатической немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC). На основании результатов PD-L1 IHC 22C3 pharmDx[9] у пациентов была установлена экспрессия PD-L1 (балл пропорции опухоли (TPS) ≥ 50 %). Пациенты были случайным образом распределены в две группы (1:1): одна группа получала пембролизумаб в дозе 200 мг каждые 3 недели (n=154), а другая получала химиотерапию платиносодержащими препаратами, которые выбирал исследователь (n=151; химиотерапия включала пеметрексед + карбоплатин, пеметрексед + цисплатин, гемцитабин + цисплатин, гемцитабин + карбоплатин или паклитаксел + карбоплатин. Пациенты с неплоскоклеточным вариантом NSCLC могли получать поддерживающее лечение пеметрекседом). Пациенты принимали пембролизумаб до достижения неприемлемого уровня токсичности либо прогрессирования заболевания. Лечение могло продолжаться и после прогрессирования заболевания, если состояние пациента было стабильным с клинической точки зрения и исследователь считал, что препарат улучшал клинические показатели пациента. В исследование не включались пациенты с геномными опухолевыми аберрациями рецептора эпителиального фактора роста (EGFR) или ALK; аутоиммунными заболеваниями, требовавшими системной терапии в течение 2 лет лечения; клиническими состояниями, требующими иммуносупрессии, или получившие более 30 Гр облучения грудной клетки в течение предшествующих 26 недель. Оценка состояния опухоли проводилась каждые 9 недель. Пациенты, получающие химиотерапию, у которых произошло прогрессирование заболевания (что было проверено и подтверждено независимыми специалистами), могли перейти в другую группу и начать получать пембролизумаб.

Исходные характеристики у 305 пациентов в исследовании KEYNOTE-024 были следующими: медианный возраст 65 лет (54 % в возрасте 65 и старше); 61 % мужчин; 82 % европеоидной расы и 15 % монголоидной расы; функциональный статус по ECOG 0 и 1 у 35 % и 65 % соответственно. Характеристики заболевания были следующими: плоскоклеточный (18 %) и неплоскоклеточный вариант (82 %); M1 (99 %) и метастазы в головной мозг (9 %).

Первичным критерием эффективности была выживаемость без прогрессирования заболевания (PFS), определенная в ходе централизованной проверки независимым экспертом, не имеющим данных об исследовании (BICR), при помощи критериев оценки ответа солидных опухолей на терапию версии 1.1 (RECIST 1.1). Дополнительными критериями эффективности были общая выживаемость (OS) и частота объективных откликов (ORR), определенные в ходе BICR при помощи RECIST 1.1. Сводка ключевых критериев эффективности для всех рандомизированных пациентов согласно назначенному лечению (ITT) (Таблица 16). Кривая Kaplan-Meier для общей выживаемости (Рисунок 5).



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

**Таблица** 16. Результаты оценки эффективности в исследовании KEYNOTE-024.

| **Конечная точка** | KEYTRUDA 200 **мг каждые** 3 **недели** n=154 | **Химиотерапия** n=151 |
|---|---|---|
| PFS* | | |
| Число (%) пациентов с событием | 73 (47 %) | 116 (77 %) |
| Отношение рисков† (95 % CI) | 0,50 (0,37, 0,68) | — |
| p-значение ‡ | <0,001 | — |
| Медиана, в месяцах (95 % CI) | 10,3 (6,7, NA) | 6,0 (4,2, 6,2) |
| OS | | |
| Число (%) пациентов с событием | 44 (29 %) | 64 (42 %) |
| Отношение рисков† (95 % CI) | 0,60 (0,41, 0,89) | — |
| p-значение ‡ | 0,005† | — |
| Медиана, в месяцах (95 % CI) | Не достигнуто (Н/д, Н/д) | Не достигнуто (9,4, NR) |
| **Частота объективных откликов*** | | |
| ORR% (95 % CI) | 45 % (37, 53) | 28 % (21, 36) |
| Полный ответ, % | 4 % | 1 % |
| Частичный ответ, % | 41 % | 27 % |
| Длительность ответа § | | |
| Медиана, месяцы (диапазон) | Не достигнуто (1,9+, 14,5+) | 6,3 (2,1+, 12,6+) |
| % с длительностью > 6 месяцев | 88 %¶ | 59 %# |

* Оценено BICR с помощью RECIST 1.1

† Отношение рисков (KEYTRUDA в сравнении с химиотерапией) на основании стратифицированной модели пропорциональных рисков Кокса

‡ На основе стратифицированного логрангового критерия.

§ На основе пациентов с наилучшим общим ответом в виде подтвержденного полного или частичного ответа.

¶ На основе оценок Kaplan-Meier; включая 43 пациентов с ответом длительностью 6 месяцев и более.

# На основе оценок Kaplan-Meier; включая 16 пациентов с ответом длительностью 6 месяцев и более.

Н/д = Нет данных

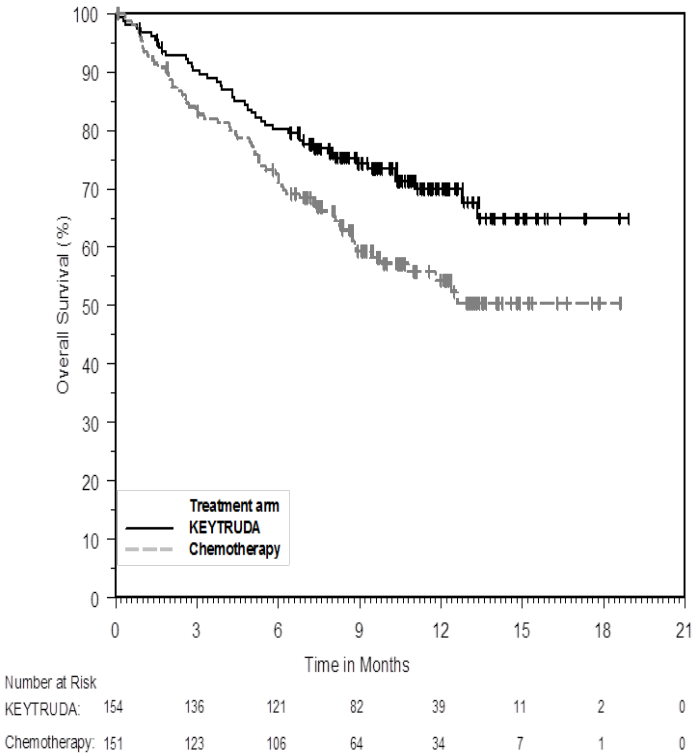



**Рисунок** 5. **Кривая Kaplan-Meier общей выживаемости в исследовании** KEYNOTE-024.

KEYNOTE-**010: Контролируемое исследование у пациентов с NSCLC, ранее получавших химиотерапию**

Клиническая польза PD-L1 IHC 22C3 pharmDx была изучена в KEYNOTE-010, многоцентровом открытом рандомизированном клиническом исследовании, проведенном для оценки безопасности и эффективности препарата KEYTRUDA среди пациентов с NSCLC на поздней стадии развития, ранее проходивших курс химиотерапии платиносодержащими препаратами.[10] На основании результатов оценки для клинического испытания (CTA) (вариант PD-L1 IHC 22C3 pharmDx) у пациентов была установлена экспрессия PD-L1 с TPS ≥ 1 %. У пациентов с мутацией активации рецептора эпителиального фактора роста (EGFR) или транслокацией ALK также отмечалось прогрессирование заболевания на фоне зарегистрированной терапии для данных мутаций перед терапией препаратом pembrolizumab. Пациенты были случайным образом распределены в три группы (1:1:1) и получали пембролизумаб в дозе 2 мг/кг (n=344) или 10 мг/кг (n=346) каждые 3 недели или доцетаксел в дозе 75 мг/м$^2$ каждые 3 недели (n=343) до достижения неприемлемой токсичности или прогрессирования заболевания. Из участия в исследовании были исключены пациенты с аутоиммунным заболеванием, заболеванием, требующим иммуносупрессии, или пациенты, чьи органы грудной клетки были подвергнуты облучению дозой более 30 Гр в предыдущие 26 недель. Оценка состояния опухоли проводилась каждые 9 недель. Основными показателями эффективности были OS и PFS, они оценивались BICR с помощью RECIST 1.1.

На основании результатов CTA в этом исследовании всего были рандомизированы 1033 пациента с NSCLC. Для оценки клинического применения PD-L1 IHC 22C3 pharmDx архивные образцы клинического исследования были ретроспективно анализированы в контрольной лаборатории в США с использованием PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Из 1033 пациентов, опухолевые ткани 529 пациентов были ретроспективно анализированы с использованием теста PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. В образцах 413 пациентов была обнаружена экспрессия PD-L1 (≥ 1 % жизнеспособных клеток опухоли, демонстрирующих мембранное окрашивание любой интенсивности), а в образцах 94 пациентов экспрессия PD-L1 отсутствовала (< 1 % жизнеспособных клеток опухоли, демонстрирующих мембранное окрашивание любой интенсивности). Среди этих 413 пациентов с экспрессией PD-L1 у 163 были взяты образцы с высоким уровнем экспрессии PD-L1 (≥ 50 % жизнеспособных клеток опухоли, демонстрирующих мембранное окрашивание любой интенсивности).



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

Достигнутый уровень совпадения между CTA и PD-L1 IHC 22C3 pharmDx указан в Таблица 17.

**Таблица** 17. Согласованность CTA в сравнении с PD-L1 IHC 22C3 pharmDx.

| Уровни согласованности | PD-L1 Пороговый показатель | Процент совпадения отрицательных результатов (95 % CI) | Процент совпадения положительных результатов (95 % CI) |
|---|---|---|---|
| CTA в сравнении с PD-L1 IHC 22C3 | TPS ≥ 1 % | 94,5 % (91,4–96,6 %) | 80,0 % (76,9–82,8 %) |
| | TPS ≥ 50 % | 98,3 % (97,1–99,0 %) | 73,2 % (67,9–77,9 %) |

У рандомизированных пациентов с наличием экспрессии PD-L1 по данным PD-L1 IHC 22C3 pharmDx демографические и прочие исходные характеристики были четко сбалансированы между группами терапии. Средний возраст пациентов составил 63 года (44 % пациентов в возрасте 65 лет и старше). Большинство пациентов относились к европеоидной расе (77 %) и мужскому полу (58 %); исходный функциональный статус по шкале ECOG составил 0 (29 %) или 1 балл (71 %). 78 % пациентов были курильщиками на момент обследования или курили в прошлом. По гистологической классификации у 22 % пациентов был плоскоклеточный вариант рака, у 69 % — неплоскоклеточный. Исходные и демографические характеристики также по большей части совпадали между группами лечения пембролизумабом и доцетакселом в общем исследовании.

Результаты эффективности представлены в таблицах Таблица 18 и Таблица 19. Препарат KEYTRUDA показал устойчивые клинические преимущества у пациентов с NSCLC с экспрессией PD-L1 (TPS ≥ 1 %), которые усиливались у пациентов с высокой экспрессией PD-L1 (TPS ≥ 50 %), определенной по PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Величина пользы была сопоставима с величиной, определенной в общем клиническом исследовании. В таблицах ниже приведена сводка ключевых критериев эффективности во всей популяции пациентов с экспрессией PD-L1 (TPS ≥ 1 %) и подгруппе с высоким уровнем экспрессии PD-L1 (TPS ≥ 50 %) для общего клинического исследования (TPS ≥ 1 % по CTA) и в популяции с экспрессией PD-L1, выявленной при помощи PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Кривая Kaplan-Meier для OS (TPS ≥ 1 %), определенной по PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, представлена на рисунке Рисунок 6. Результаты эффективности были аналогичны в группах препарата KEYTRUDA с дозами 2 мг/кг и 10 мг/кг.

**Таблица** 18. Ответ на препарат KEYTRUDA у пациентов, ранее получавших NSCLC: Общее клиническое исследование и пациенты с положительным результатом PD-L1 IHC 22C3 pharmDx: PD-L1 TPS ≥ 1 %.

| Конечная точка | KEYTRUDA 2 мг/кг каждые 3 недели | | KEYTRUDA 10 мг/кг каждые 3 недели | | Доцетаксел 75 мг/м$^2$ каждые 3 недели | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Клиническое исследование | PD-L1 IHC 22C3 pharmDx | Клиническое исследование | PD-L1 IHC 22C3 pharmDx | Клиническое исследование | PD-L1 IHC 22C3 pharmDx |
| Количество пациентов | 344 | 140 | 346 | 142 | 343 | 131 |
| OS | | | | | | |
| Смертельные исходы (%) | 172 (50 %) | 59 (42 %) | 156 (45 %) | 59 (42 %) | 193 (56 %) | 67 (51 %) |
| Отношение рисков* (95 % CI) | 0,71 (0,58, 0,88) | 0,54 (0,37, 0,78) | 0,61 (0,49, 0,75) | 0,57 (0,39, 0,82) | — | — |
| p-значение† | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | 0,00115 | — | — |
| Медиана, в месяцах (95 % CI) | 10,4 (9,4, 11,9) | 11,8 (9,6, NA) | 12,7 (10,0, 17,3) | 12,0 (8,7, NA) | 8,5 (7,5, 9,8) | 7,5 (6,3, 9,9) |
| PFS‡ | | | | | | |
| События (%) | 266 (77 %) | 97 (63 %) | 255 (74 %) | 103 (73 %) | 257 (75 %) | 94 (72 %) |
| Отношение рисков* (95 % CI) | 0,88 (0,73, 1,04) | 0,68 (0,50, 0,92) | 0,79 (0,66, 0,94) | 0,79 (0,59, 1,06) | — | — |
| p-значение† | 0,068 | 0,00578 | 0,005 | 0,05767 | — | — |
| Медиана, в месяцах (95 % CI) | 3,9 (3,1, 4,1) | 4,9 (4,1, 6,2) | 4,0 (2,6, 4,3) | 4,0 (2,2, 4,6) | 4,0 (3,1, 4,2) | 3,8 (2,2, 4,2) |
| Частота общего отклика‡ | | | | | | |
| ORR %§ (95 % CI) | 18 % (14, 23) | 24 % (17, 32) | 18 % (15, 23) | 20 % (14, 28) | 9 % (7, 13) | 5 % (2, 11) |

* Отношение рисков (KEYTRUDA в сравнении с доцетакселом) на основании стратифицированной модели пропорциональных рисков Кокса

† На основе стратифицированного логрангового критерия

‡ Оценено BICR с помощью RECIST 1.1

§ Все ответы были представлены частичными ответами

**Таблица** 19. Ответ на препарат KEYTRUDA у ранее получавших лечение пациентов: Общее клиническое исследование и пациенты с положительным результатом PD-L1 IHC 22C3 pharmDx: PD-L1 ≥ 50 %.

| Конечная точка | KEYTRUDA 2 мг/кг каждые 3 недели | | KEYTRUDA 10 мг/кг каждые 3 недели | | Доцетаксел 75 мг/м$^2$ каждые 3 недели | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Клиническое исследование | PD-L1 IHC 22C3 pharmDx | Клиническое исследование | PD-L1 IHC 22C3 pharmDx | Клиническое исследование | PD-L1 IHC 22C3 pharmDx |
| Количество пациентов | 139 | 56 | 151 | 60 | 152 | 47 |



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

| Конечная точка | KEYTRUDA 2 мг/кг каждые 3 недели | | KEYTRUDA 10 мг/кг каждые 3 недели | | Доцетаксел 75 мг/м$^2$ каждые 3 недели | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| OS | | | | | | |
| Смертельные исходы (%) | 58 (42 %) | 18 (32 %) | 60 (40 %) | 19 (32 %) | 86 (57 %) | 25 (53 %) |
| Отношение рисков* (95 % CI) | 0,54 (0,38, 0,77) | 0,45 (0,24, 0,84) | 0,50 (0,36, 0,70) | 0,29 (0,15, 0,56) | — | — |
| p-значение† | < 0,001 | 0,0054 1 | < 0,001 | < 0,001 | — | — |
| Медиана, в месяцах (95 % CI) | 14,9 (10,4, NA) | Не достигнуто (9,3, NA) | 17,3 (11,8, NA) | Не достигнуто (8,3, NA) | 8,2 (6,4, 10,7) | 7,2 (4,4, 8,3) |
| PFS‡ | | | | | | |
| События (%) | 89 (64 %) | 33 (59 %) | 97 (64 %) | 34 (57 %) | 118 (78 %) | 33 (70 %) |
| Отношение рисков* (95 % CI) | 0,58 (0,43, 0,77) | 0,47 (0,28, 0,80) | 0,59 (0,45, 0,78) | 0,41 (0,24, 0,70) | — | — |
| p-значение† | < 0,001 | 0,0022 1 | < 0,001 | < 0,001 | — | — |
| Медиана, в месяцах (95 % CI) | 5,2 (4,0, 6,5) | 5,9 (4,2, 9,0) | 5,2 (4,1, 8,1) | 4,8 (2,8, NA) | 4,1 (3,6, 4,3) | 3,9 (2,0, 4,3) |
| Частота общего отклика‡ | | | | | | |
| ORR %§ (95 % CI) | 30 % (23, 39) | 37 % (25, 52) | 29 % (22, 37) | 28 % (18, 41) | 8 % (4, 13) | 4 % (1, 15) |

* Отношение рисков (KEYTRUDA в сравнении с доцетакселом) на основании стратифицированной модели пропорциональных рисков Кокса

† На основе стратифицированного логрангового критерия

‡ Оценено BICR с помощью RECIST 1.1

§ Все ответы были представлены частичными ответами

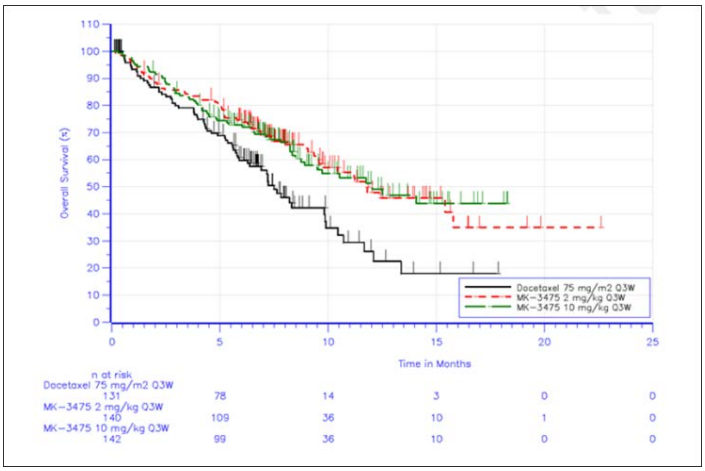



**Рисунок 6. Кривая Kaplan-Meier общей выживаемости у всех рандомизированных пациентов в исследовании** KEYNOTE-010.

Были выполнены дополнительные анализы устойчивости для учета потенциального влияния отсутствующих данных, связанных с пациентами с экспрессией PD-L1 (TPS ≥ 1 %) по данным PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, но у которых могло не наблюдаться экспрессии PD-L1 (TPS < 1 %) по данным CTA. Пациенты с подобными результатами являются частью популяции целевого применения/целевой диагностики (ITD) PD-L1 IHC 22C3 pharmDx; тем не менее они были исключены из клинического исследования по причине отсутствия экспрессии PD-L1 при скрининге CTA. Для учета этих отсутствующих данных был выполнен анализ чувствительности для понимания возможного диапазона отношения рисков (HR), рассчитываемого на основании PD-L1 IHC 22C3 pharmDx в подгруппах с TPS ≥ 1 % и TPS ≥ 50 % в рамках целевой диагностики для подтверждения согласованности с наблюдавшимися HR на основе включения с использованием CTA. Согласно результатам анализа чувствительности HR, рассчитанные значения HR устойчивы к любому предполагаемому снижению эффективности лечения в рамках концепции ITD.

## OPDIVO

### Исследование CA209057 3 фазы среди пациентов с неплоскоклеточным на поздней стадии или с метастатическим неплоскоклеточным NSCLC

Клиническая применимость оценивалась в исследовании CA209057, рандомизированном открытом исследовании фазы 3 препарата ниволумаб в сравнении с препаратом доцетаксел у взрослых (≥ 18 лет) пациентов с неплоскоклеточным вариантом поздней стадии или метастатическим неплоскоклеточным NSCLC после неудачной предшествующей двухкомпонентной химиотерапии на основе препаратов платины.[11] Пациенты были рандомизированы в соотношении 1:1 и стратифицированы по следующим критериям: 1) предварительное проведение или отсутствие проведения поддерживающей терапии и 2) применение терапии второй линии или терапии третьей линии. Образцы опухолевой ткани были собраны до начала исследования (на исходном уровне) до рандомизации и до первого курса лечения для проведения предварительно запланированного анализа эффективности в соответствии с предварительно определенными исходными уровнями экспрессии PD-L1 (дополнительная конечная точка). Основной конечной точкой была общая выживаемость (OS). Другими вторичными конечными точками были частота объективных откликов (ORR), выживаемость без прогрессирования заболевания (PFS) и улучшение симптомов, связанных с заболеванием, после 12 недель в соответствии со шкалой симптомов рака легких (LCSS).

Основные демографические данные и характеристики заболевания в целом не отличались среди рандомизированных пациентов в группах, получавших препараты ниволумаб и доцетаксел. Средний возраст пациентов составил 62 года (диапазон: 21–85), 34 % ≥ 65 лет и 7 % ≥ 75 лет. Большинство пациентов относились к европеоидной расе (92 %) и мужскому полу (55 %); исходный функциональный статус по шкале ECOG составил 0 (31 %) или 1 балл (69 %). 79 % пациентов были курильщиками на момент обследования или курили в прошлом.

Для пациентов с экспрессией PD-L1, определенной при помощи Dako PD-L1 IHC 28-8 pharmDx по всем предварительно определенным уровням экспрессии в группе



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

терапии препаратом OPDIVO, была замечена улучшенная выживаемость по сравнению с лечением доцетакселом, и при его применении выживаемость была сходной с группой пациентов без экспрессии PD-L1, получавших препарат доцетаксел. При анализе уровня экспрессии PD-L1 наблюдалась значимая разница медианы OS в подгруппе пациентов, получавших препарат ниволумаб, по сравнению с подгруппой, получавшей препарат доцетаксел. Медиана OS составила 17,1, 18,2 и 19,4 месяцев у пациентов, получавших препарат ниволумаб, по сравнению с 9,0, 8,1 и 8,0 месяцами для пациентов, получавших препарат доцетаксел, с уровнями экспрессии PD-L1 ≥ 1 %, ≥ 5 % и ≥ 10 % соответственно. Отсутствовали различия в OS в группах лечения у пациентов с уровнями экспрессии < 1 %, < 5 % и < 10 % с диапазонами медианы OS от 9,7 до 10,4 месяца для препарата ниволумаб и от 10,1 до 10,3 месяца — для препарата доцетаксел. На Рисунок 7 показаны отношение рисков (HR) и медиана общей выживаемости (OS) без стратификации. График Kaplan-Meier для подгрупп по уровню экспрессии PD-L1 (Рисунок 8 и Рисунок 9).

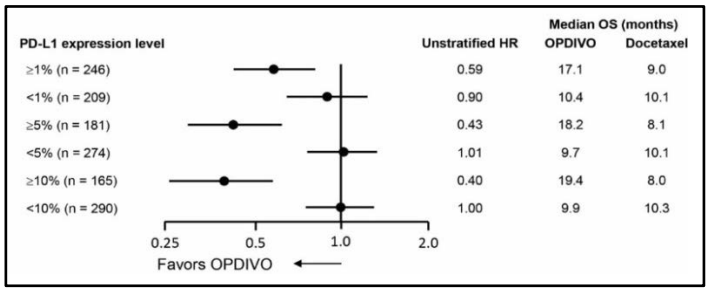



**Рисунок** 7. **График «форест-плот» для** OS **на основе экспрессии** PD-L1 **у пациентов с неплоскоклеточным вариантом** NSCLC **— исследование** CA209057.

Примечание. Отношение рисков без стратификации и соответствующий 95 % CI были оценены в модели пропорциональных рисков Кокса с использованием рандомизированной группы в качестве единственной ковариаты.

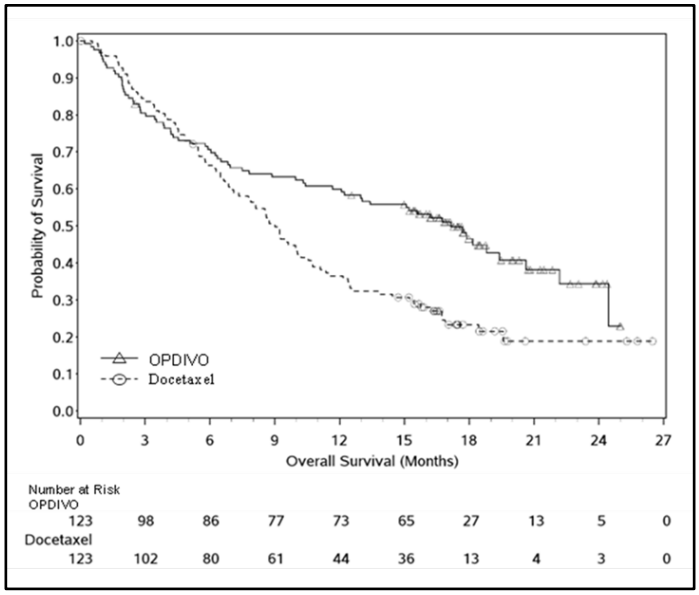



**Рисунок** 8. **Общая выживаемость — пациенты с экспрессией** PD-L1 **≥** 1 % **— исследование CA**209057

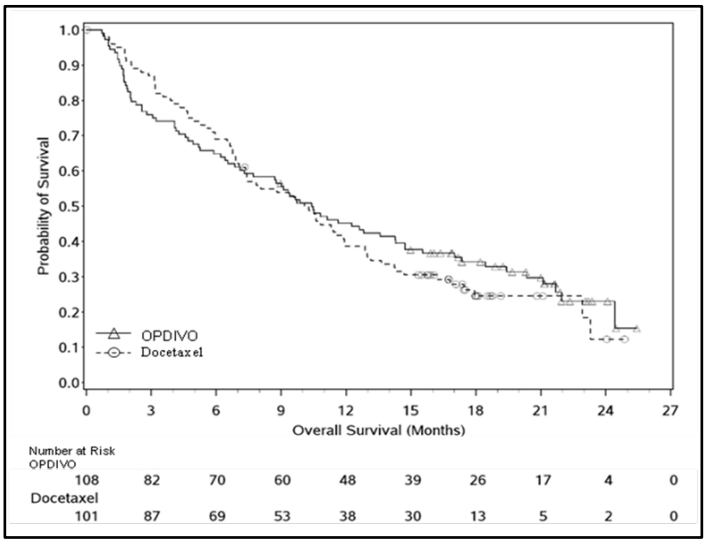



**Рисунок** 9. **Общая выживаемость — пациенты с неплоскоклеточным вариантом** NSCLC **с экспрессией** PD-L1 < 1 % — CA209057.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ. УРОТЕЛИАЛЬНАЯ КАРЦИНОМА

### Чувствительность. Уротелиальная карцинома

Чувствительность метода VENTANA PD-L1 (SP263) Assay была протестирована путем использования производственных партий VENTANA PD-L1 (SP263) Assay промышленного изготовления на 211 уникальных образцах , подготовленных в виде микропрепаратов уротелиальной карциномы FFPE. Сто шестьдесят девять из 211 (80,09 %) тканей были классифицированы, как имеющие высокое значение PD-L1, с помощью VENTANA PD-L1 (SP263) Assay с использованием критериев оценки уротелиальной карциномы.

### Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность. Уротелиальная карцинома

Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay, проведенного на ткани уротелиальной карциномы, оценивались при помощи аппаратов BenchMark ULTRA в сочетании с набором OptiView DAB IHC Detection Kit.

Для определения внутрисуточной повторяемости использовались 24 уникальных образцов ткани уротелиальной карциномы; из каждого такого образца было приготовлено 5 однородных микропрепаратов, которые окрашивали с использованием одного аппарата BenchMark ULTRA за день.

Для определения межсуточной прецизионности использовались 24 уникальных образцов ткани уротелиальной карциномы; из каждого такого образца было приготовлено 2 однородных микропрепарата, которые окрашивали при помощи метода анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay с использованием одного аппарата BenchMark ULTRA в течение 5 дней вразбивку на протяжении как минимум двадцати дней.

Для определения прецизионности между разными аппаратами 26 уникальных образца ткани уротелиальной карциномы окрашивали при помощи анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay с использованием трех аппаратов BenchMark ULTRA. Все предметные стекла были замаскированы, рандомизированы и оценены с использованием алгоритма оценивания для результатов метода VENTANA PD-L1 (SP263) Assay (Таблица 7).

Резюме полученных результатов (Таблица 20).



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

**Таблица** 20. Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность окрашивания посредством метода VENTANA PD-L1 (SP263) Assay образцов ткани уротелиальной карциномы.

| Повторяемость/прецизионность | Общий процент совпадения (95 % CI) |
|---|---|
| Внутрисуточная повторяемость (в пределах одного дня) | 99,2 % (95,4–99,9 %)* |
| Межсуточная прецизионность (5 непоследовательных дней) | 100,0 % (98,4–100,0 %)* |
| Прецизионность результатов между разными аппаратами (для 3 приборов) | 99,0 % (98,1–99,7 %)** |

* Значения 2-стороннего 95-процентного доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.
** Значения 2-стороннего 95-процентного доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода бутстреп-процентилей на основе 2000 бутстреп-выборок.

### Воспроизводимость между партиями. Уротелиальная карцинома

Воспроизводимость между партиями анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay определялась путем тестирования трех партий антител для метода VENTANA PD-L1 (SP263) Assay на 26 уникальных образцах уротелиальной карциномы на аппаратах BenchMark ULTRA с использованием набора OptiView DAB IHC Detection Kit. Все образцы окрашивали при помощи каждой из трех партий первичных антител. Перед оценкой экспрессии PD-L1 все предметные стекла были замаскированы и рандомизированы в соответствии с алгоритмом оценивания результатов метода VENTANA PD-L1 (SP263) Assay (Таблица 7). Общий процент совпадения, процент совпадения положительных результатов и процент совпадения отрицательных результатов (Таблица 21).

**Таблица** 21. Воспроизводимость VENTANA PD-L1 (SP263) Assay между партиями на образцах ткани уротелиальной карциномы

| Повторяемость между партиями | Процент совпадения положительных результатов (95 % CI)* | Процент совпадения отрицательных результатов (95 % CI)* | Общий процент совпадения (95 % CI)* |
|---|---|---|---|
| Среднее для всех трех сравнений партий | 98,3 % (96,7–99,7 %) | 99,7 % (99,1–100,0 %) | 99,0 % (98,1–99,7) |

* Значения 2-стороннего 95-процентного доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода бутстреп-процентилей на основе 2000 бутстреп-выборок.

### Исследования прецизионности между экспертами и по каждому эксперту. Уротелиальная карцинома

Для оценки прецизионности результатов, полученных разными экспертами и каждым экспертом по отдельности, три обученных патоморфолога оценили частично совпадающее подмножество из приблизительно 50 уникальных образцов ткани уротелиальной карциномы, отражающих динамический диапазон уровня экспрессии PD-L1. Перед оценкой окрашивания PD-L1 образцы были замаскированы и рандомизированы в соответствии с алгоритмом оценивания анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay (Таблица 7). Эксперты оценивали все образцы по два раза с промежутком между просмотрами не менее двух недель. Уровни согласованности (Таблица 22).

**Таблица** 22. Исследование прецизионности VENTANA PD-L1 (SP263) Assay между экспертами и по каждому эксперту на образцах ткани уротелиальной карциномы

| Прецизионность эксперта | Среднее количество положительных совпадений (95 % CI)* | Среднее количество отрицательных совпадений (95 % CI)* | Среднее количество общих совпадений (95 % CI)* |
|---|---|---|---|
| Прецизионность между экспертами (среднее значение результатов парных сравнений всех трех экспертов для первого просмотра) | 92,8 % (85,5–98,3 %) | 93,2 % (86,5–98,5 %) | 93,0 % (87,1–98,6 %) |
| Прецизионность одного эксперта (средняя частота совпадений результатов всех трех экспертов между первым и вторым просмотром) | 92,1 % (85,4–96,7 %) | 92,7 % (87,1–96,8 %) | 92,4 % (87,2–96,6 %) |

* Значения 2-стороннего 95-процентного доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода бутстреп-процентилей на основе 2000 бутстреп-выборок.

### Исследование воспроизводимости результата между лабораториями. Уротелиальная карцинома

Было проведено межлабораторное исследование воспроизводимости результата метода VENTANA PD-L1 (SP263) Assay с целью демонстрации воспроизводимости результатов при определении экспрессии PD-L1 в образцах уротелиальной карциномы с использованием 35 образцов ткани в течение 5 дней вразбивку за 20-дневный период в трех сторонних лабораториях. Образцы были замаскированы, рандомизированы и оценены в общей сложности 6 экспертами (по 2 эксперта в каждой лаборатории). Результаты — Таблица 23.

**Таблица** 23. Воспроизводимость окрашивания посредством метода VENTANA PD-L1 (SP263) Assay между лабораториями на образцах ткани уротелиальной карциномы.

| Межлабораторная воспроизводимость | Соответствие процента положительных результатов (95 % CI)* | Соответствие процента отрицательных результатов (95 % CI)* | Общий процент совпадения (95 % CI)* |
|---|---|---|---|
| Во всех образцах | 95,4 % (91,3–98,4 %) | 88,3 % (81,6–94,6 %) | 92,6 % 88,9–95,8 %) |

* Значения 2-стороннего 95-процентного доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода бутстреп-процентилей на основе 2000 бутстреп-выборок.

## ИССЛЕДОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ РЕЗУЛЬТАТОВ. УРОТЕЛИАЛЬНАЯ КАРЦИНОМА

### IMFINZI

Клинические характеристики анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay были оценены в ходе исследования 1 — несравнительного многоцентрового открытого клинического исследования препарата IMFINZI (дурвалумаб), в котором участвовали пациенты с местно распространенной или метастазирующей уротелиальной карциномой. Образцы опухоли, взятые у 332 пациентов, оценивали проспективно на предмет экспрессии PD-L1 в центральной лаборатории при помощи метода VENTANA PD-L1 (SP263) Assay. Статус PD-L1 невозможно было оценить у 31 пациента из-за недостаточного количества опухолевых клеток в образце (n=25), предоставления неподходящей ткани (n=3), складок на ткани (n=1), скопления красителя (n=1) или отделения ткани от предметного стекла (n=3). Случаи, когда статус PD-L1 в образце было невозможно оценить из-за неудачного применения метода анализа, отсутствовали.



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

В исследование 1 были включены 182 пациента с местно распространенной или метастазирующей уротелиальной карциномой. У включенных пациентов заболевание прогрессировало во время или после терапии препаратами платины, в том числе у тех, у кого заболевание прогрессировало в течение 12 месяцев с момента получения неоадъювантной или адъювантной терапии. Эти пациенты начали курс лечения дурвалумабом как минимум за 13 недель до даты прекращения сбора данных. Из исследования были исключены пациенты, у которых в прошлом диагностировали иммунодефицит, заболевания, требующие системного угнетения иммунитета (доза преднизона или его эквивалента не должна была превышать 10 мг/день), серьезное аутоиммунное заболевание, не подвергавшиеся лечению метастазы в ЦНС, ВИЧ, активный туберкулез, гепатит B или C. Все пациенты получали препарат IMFINZI в дозе 10 мг/кг путем внутривенного вливания каждые 2 недели в течение максимум 12 месяцев или до достижения неприемлемой токсичности или прогрессирования заболевания. Оценку опухоли проводили на 6, 12 и 16 неделе, затем каждые 8 недель в течение первого года и каждые 12 недель впоследствии. Основными критериями эффективности считались подтвержденная частота объективных откликов (ORR), определенная в соответствии с RECIST 1.1 в ходе централизованной проверки независимым экспертом, не имеющим данных об исследовании (BICR), и длительность ответа (DoR).

В исследовании 1 средний возраст пациентов составил 67 лет (диапазон: 34-88), 72 % — мужчины,64 % пациентов были европеоидами. У 66 % пациентов был диагностирован висцеральный метастаз (кость, печень или легкое), в том числе у 34 % — метастаз в печень. У 13 % пациентов метастазами были поражены только лимфоузлы. Состояние 66 % пациентов было оценено на 1 балл по шкале ECOG, исходный клиренс креатинина у 41 % пациентов составлял < 60 мл/мин. Результат оценки риска по шкале Беллмунта (включающей оценку по шкале ECOG, базовый гемоглобин и метастазы в печени) составлял 0 у 23 %, 1 — у 38 %, 2 — у 29 % и 3 — у 9 % пациентов. У 20 % пациентов заболевание прогрессировало после неоадъювантной или адъювантной химиотерапии препаратами платины, которая являлась единственной предшествующей линией терапии. 70 % пациентов ранее принимали цисплатин, 30 % — карбоплатин, и 35 % пациентам ранее проводили 2 линии системной терапии или больше. Среднее время последующего наблюдения составило 5,6 месяца. Частичный или полный отклик наблюдался у 31 из 182 пациентов (17,0 %; 95 % CI = 11,9–23,3 %) после лечения препаратом IMFINZI.

Из 182 пациентов, включенных в исследование 1, 128 были включены независимо от статуса PD-L1 и после завершения алгоритма оценивания анализа VENTANA PD-L1 (SP263) Assay. Из этих 128 пациентов 58 были определены как пациенты с высоким уровнем экспрессии PD-L1, 56 — как пациенты с низким уровнем экспрессии PD-L1 или без нее, а оценка образцов, взятых у 14 пациентов, была невозможна. Результаты оценки эффективности (Таблица 24). Среднее время последующего наблюдения для этих пациентов составило 4,9 месяца.

**Таблица** 24. Результаты оценки эффективности для подмножества из 128 пациентов, включенных в исследование 1; экспрессия PD-L1 у пациентов с уротелиальной карциномой.

| **Параметр эффективности*** | **Высокий уровень экспрессии** PD-L1 (N=58) | **Низкий уровень или отсутствие экспрессии** PD-L1 (N=56) | PD-L1 **Невозможно оценить уровень экспрессии** (N=14) |
|---|---|---|---|
| Число пациентов с объективным откликом, подтвержденным в ходе BICR | 11 | 2 | 3 |
| Частота объективных откликов (95 % CI) | 19,0 % (9,9–31,4 %) | 3,6 % (0,4–12,3 %) | 21,4 % (4,7–50,8 %) |
| CR, n (%) | 2 (3,4 %) | 0 | 1 (7,1 %) |
| PR, n (%) | 9 (15,5 %) | 2 (3,6 %) | 2 (14,3 %) |
| Медиана (DoR), месяцев, (диапазон) | 4,24 (0,9+ – 4,2) | NR (1,9+ – 4,2+) | NR (2,3+ – 2,6+) |

* Частота объективных откликов и длительность отклика определены при помощи RECIST 1.1

BICR= централизованная проверка независимым экспертом, не имеющим данных об исследовании

CR= полный отклик

CI= доверительный интервал

DoR= длительность ответа

NR= не достигнуто

PR= частичный отклик

## ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Проблемы и описание способов их устранения (Таблица 25). Если проблема отсутствует в таблице, или если с помощью предложенного способа не удается устранить проблему, обратитесь к местному представителю службы поддержки.

**Таблица** 25. Диагностика и устранение проблем при работе с методом VENTANA PD-L1 (SP263) Assay.

| **Неисправность** | **Возможная причина** | **Предлагаемое решение** |
|---|---|---|
| Слабое окрашивание или отсутствие окрашивания предметных стекол | Выбран неправильный протокол окрашивания | Убедитесь, что используется рекомендованная процедура окрашивания. |
| | | Убедитесь, что в качестве первичного антитела выбрано VENTANA PD-L1 (SP263). |
| | Распад тканей | Убедитесь, что окрашивание тканей производилось в рекомендованный период времени после микротомирования. |
| | Неисправность дозатора | Убедитесь, что колпачок наконечника снят. |
| | | Убедитесь, что дозатор заправлен. |



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

| Неисправность | Возможная причина | Предлагаемое решение |
|---|---|---|
| | | Проверьте наличие в заливочной камере инородных частиц, таких как волокна или осадок. |
| | | См. листок-вкладыш поточного дозатора с номером по каталогу 741-4905 на сайте www.ventana.com. |
| | | Следует применять только рекомендованные фиксаторы и только на протяжении рекомендованного времени фиксации. |
| | Наливной реагент неправильный или отсутствует | Убедитесь в правильности наполнения наливными реагентами. |
| Чрезмерное фоновое окрашивание предметных стекол | Выбран неправильный протокол окрашивания | Убедитесь, что используется рекомендованная процедура окрашивания. |
| | Наливной реагент неправильный или отсутствует | Убедитесь в правильности наполнения наливными реагентами. |
| | Используется недопустимый метод фиксации | Следует применять только рекомендованные фиксаторы и только на протяжении рекомендованного времени фиксации. |
| Ткань отслоилась от предметных стекол | Используются неправильные предметные стекла | Убедитесь, что используются предметные стекла с положительным зарядом. |

## ССЫЛКИ


1. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol 2008; 26:677-704.
2. Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. Cancer Immunol Immunother 2007; 56(5):739-745.
3. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T-cell responses. Immunity 2007; 27(1):111-122.
4. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. Nat Med 1999; 5(12):1365-1369.
5. Massard C, Gordon MS, Sharma S, et al. Safety and efficacy of durvalumab (MEDI4736), an anti-programmed cell death ligand-1 immune checkpoint inhibitor, in patients with advanced urothelial bladder cancer. J Clin Oncol 2016; 34(26):3119-3125.
6. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. Mol Cancer Ther 2015; 14(4):847-856.
7. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
8. Ratcliffe MJ, Sharpe A, Midha A, et al. Agreement between programmed cell death ligand-1 diagnostic assays across multiple protein expression cut-offs in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2017; 23(14):3585-3591.
9. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small cell lung cancer. The N Engl J Med 2016; 375(19):1823-1833.
10. Herbs RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomized controlled trial. Lancet 2016; 387:1540-1550.
11. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced non-squamous non–small cell lung cancer. N Engl J Med 2015; 373(17):1627-1639.


## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ


VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW и логотип VENTANA являются товарными знаками компании Roche. Все остальные товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

© 2018 Ventana Medical Systems, Inc.


## КОНТАКТЫ


Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

www.ventana.com

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.





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

# VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody

Для использования с панелью VENTANA MMR IHC Panel

REF 760-5091

08033668001

IVD Σ 50

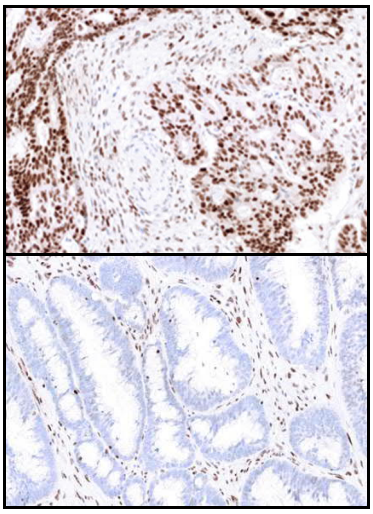


**Рисунок** 1. **Окрашивание антителом** VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody **с неизмененной экспрессией (сверху) или потерянной экспрессией (снизу) в раковой ткани толстой кишки**

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-MLH1 (M1)) предназначено для качественного обнаружения белка MLH1 в фиксированных формалином и залитых в парафин срезах ткани. Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) готово к применению на аппаратах серии BenchMark ULTRA, XT и GX с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit и вспомогательных реагентов.

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) является частью панели VENTANA MMR IHC Panel, в состав которой входят VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody и VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody. Панель VENTANA MMR IHC Panel предназначена для обнаружения недостатка белка, участвующего в репарации неспаренных оснований ДНК, в качестве теста для идентификации лиц, находящихся под угрозой развития синдрома Линча, среди пациентов, которым диагностирован колоректальный рак (КРР), а также у которых выявлена мутация V600E в гене BRAF, в качестве вспомогательного средства для различения спорадического КРР и вероятного синдрома Линча в условиях отсутствия экспрессии белка MLH1.

Результаты анализов, выполненных с использованием данных продуктов, должны интерпретироваться квалифицированным патоморфологом с учетом результатов гистологического исследования, клинической картины и соответствующих контролей.

Предназначено для диагностики in vitro (IVD).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

Колоректальный рак является третьим наиболее распространенным видом рака и четвертой по распространенности причиной смерти в мире.[1] В большинстве случаев КРР наблюдается хромосомная нестабильность, однако примерно в 15 % случаев рак развивается по альтернативному пути, характеризуемому дефектом функции системы репарации неспаренных оснований ДНК (MMR). Вследствие дефекта функции репарации неспаренных оснований (MMR) в опухолях наблюдается микросателлитная нестабильность (MSI), обусловленная неспособностью белков-репараторов (белки MMR) устранять ошибки репликации ДНК.

КРР с дефектами системы MMR обозначается как опухоль с дефицитом белков MMR (dMMR). И наоборот, КРР без дефектов системы MMR обозначается как опухоль с избытком белков MMR (pMMR). Колоректальный рак с дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR) в большинстве случаев имеет низкую дифференцировку и часто демонстрирует гистологические признаки преобладания в проксимальном отделе толстой кишки, а также муцинозного, медуллярного или перстневидноклеточного рака. Кроме того, он характеризуется увеличением числа лимфоцитов, инфильтрующих опухоли.[2,3] В общем, дефицит репарации неспаренных оснований может быть вызван мутациями зародышевой линии в одном из генов MMR с последующей утратой соответствующей нормальной аллели посредством генетических или эпигенетических механизмов, соматическими мутациями в аллелях или эпигенетической инактивацией белка MLH1 посредством метилирования.[4]

Наиболее часто мутациям подвержены следующие четыре гена MMR: MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6. В нормальных клетках белок MLH1 формирует комплекс (гетеродимер) с белком PMS2, в то время как белок MSH2 формирует комплекс с белком MSH6.[5,6] При возникновении неспаренных оснований ДНК гетеродимер MSH2/MSH6 связывается с неспаренным основанием ДНК, провоцируя конформационное изменение. Гетеродимер MLH1/PMS2 связывается с ДНК-связанным комплексом MSH2/MSH6, вызывая эксцизионную репарацию поврежденной ДНК.

Белки MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6 являются клинически значимыми белками MMR, кодируемыми генами, которые могут мутировать у пациентов, имеющих в семейном анамнезе синдром Линча.[7,8] Носители этих мутаций имеют высокий пожизненный риск развития колоректального и других форм рака ввиду накопления ошибок репликации ДНК в пролиферирующих клетках. Синдром Линча составляет 1–6 % всех случаев КРР. Такие опухоли образуются по причине наследования аутосомно-доминантной мутации зародышевой линии в одном из четырех генов MMR; при этом для большинства случаев КРР, связанного с синдромом Линча, характерна потеря экспрессии белка MLH1.[5,9,10] У пациентов с синдромом Линча было выявлено более 300 различных мутаций в семействе белков MMR. Фенотип опухоли, связанной с синдромом Линча, обычно характеризуется иммуногистохимической потерей экспрессии в белках MMR, в частности в белках MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6.[10-13] Исследование MMR методом IHC (иммуногистохимии) продемонстрировало эффективность при идентификации специфичного гена MMR, имеющего наибольшую вероятность обнаружения в нем изменения зародышевой линии или соматического изменения.[14]

Являясь частью панели VENTANA MMR IHC Panel, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) помогает дифференцировать спорадический КРР и вероятный синдром Линча при отсутствии экспрессии белка MLH1.[15,16] При КРР потеря экспрессии белка MLH1 зачастую является результатом гиперметилирования промотора MLH1 и указывает на спорадический характер заболевания.[17] Наличие белка BRAF V600E тесно связано с гиперметилированием промотора MLH1. В итоге положительный результат окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) указывает на спорадический КРР.

## КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

В 1960-х годах был впервые описан синдром Линча и была установлена связь между потерей функции MMR и развитием рака.[18] Потеря экспрессии белков MMR (MLH1, PMS2, MSH2 или MSH6) может привести к MSI и повышенному пожизненному риску развития не только КРР, но также и рака желудка, мозга, поджелудочной железы, кожи, эндометрия и яичников. Пациенты с синдромом Линча имеют 50–80 % пожизненного риска развития КРР.[5,19,20] Синдром Линча уникальным образом отличается от других наследственных раковых синдромов, поскольку проведение прямого исследования опухолевой ткани помогает в идентификации пациентов, находящихся в группе риска развития синдрома Линча, и делает последующий генетический анализ зародышевой линии более информативным. Применение расширенных протоколов скрининга онкологических заболеваний имеет благоприятное значение для семей с синдромом Линча.

Различные руководства, в том числе руководства Национальной комплексной сети онкологических учреждений (NCCN), рекомендуют проводить скрининг всех случаев КРР на предмет потенциального наличия синдрома Линча для идентификации пациентов и семей, которые получат пользу от дальнейшего генетического анализа и консультирования.[18,21-24] Использование панели VENTANA MMR IHC Panel будет способствовать определению статуса MMR КРР посредством классификации случаев КРР как имеющих неизмененную или потерянную экспрессию белка MMR. Обнаружение всех четырех белков MMR в опухоли указывает на нормальную или неизмененную функцию системы MMR. Потеря экспрессии MLH1 или MSH2 почти неизменно сопровождается потерей гетеродимерного белка-партнера PMS2 или MSH6 соответственно. Тем не менее, потеря экспрессии PMS2 или MSH6 не



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

приводит к потере экспрессии MLH1 или MSH2. Потеря экспрессии PMS2, MSH2 и (или) MSH6 соотносится с вероятным синдромом Линча, поэтому пациентов следует направлять на дополнительное тестирование и консультацию согласно клинической практике.

Потеря экспрессии белка MLH1 может указывать на спорадическое возникновение рака или потенциальный синдром Линча. В 15 % или более случаев спорадического КРР потеря экспрессии белка MLH1 происходит ввиду гиперметилирования промотора MLH1.[5,25,26] Важно отметить, что мутация BRAF V600E наблюдается приблизительно в двух третях случаев опухолей, характеризующихся потерей экспрессии MLH1 по причине гиперметилирования промотора MLH1. И напротив, мутация BRAF V600E очень редко наблюдается при опухолях, вызванных синдромом Линча.[25] Таким образом, если результат окрашивания антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-MLH1 (M1)) указывает на потерю экспрессии белка MLH1, антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) может четко определить опухоль как спорадический КРР или вероятный синдром Линча.[5,27] При КРР потеря экспрессии белка MLH1 с положительным статусом BRAF V600E однозначно указывает на то, что опухоль имеет спорадический характер, фактически исключая синдром Линча из списка первопричин возникновения злокачественного новообразования.[17,28] Когда потеря экспрессии белка MLH1 сопровождается отрицательным статусом BRAF V600E, потеря экспрессии MLH1 соотносится с высокой вероятностью наличия синдрома Линча.[29]

## ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) представляет собой мышиное моноклональное антитело, вырабатываемое против полноцепочечного рекомбинантного белка MLH1 с маркером GST. Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) связывается с белком MLH1 в фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) срезах ткани. Антитело может быть обнаружено посредством гаптенированного вторичного антитела с последующей обработкой мультимерным конъюгатом HRP (пероксидазы хрена) с антителом к гаптену (OptiView DAB IHC Detection Kit, №по каталогу 760-700 / 06396500001). После этого специфический комплекс антитела и фермента визуализируется путем осаждения продукта ферментативной реакции. Каждый этап процедуры включает инкубацию в течение строго определенного промежутка времени при заданной температуре. В конце каждой инкубации аппарат BenchMark ULTRA, XT или GX промывает срезы, чтобы остановить реакцию и удалить не связавшиеся вещества, которые могут препятствовать протеканию необходимых реакций на последующих этапах. С помощью данного аппарата также наносится ULTRA LCS (ULTRA LCS (Predilute), №по каталогу 650-210 / 05424534001) или LCS (LCS predilute, № по каталогу 650-010 / 05264839001), который позволяет свести к минимуму испарение водных реагентов с поверхности предметного стекла, содержащего образец.

Помимо окраски антителом VENTANA anti-MLH1 (M1), второе предметное стекло следует окрасить мышиным моноклональным реагентом для отрицательного контроля, Negative Control (Monoclonal) (№ по каталогу 760-2014 / 05266670001). Реагент для отрицательного контроля используется для оценки фонового окрашивания.

## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 50 анализов.

Один 5 мл дозатор с антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) содержит приблизительно 5 мкг мышиного моноклонального антитела.

Антитело разведено в TBS буфере, содержащем 0,3 % белка-носителя.

Общая концентрация белка в реагенте составляет приблизительно 3 мг/мл. Концентрация специфических антител составляет около 1 мкг/мл. Неспецифической реактивности антител у данного продукта не обнаружено.

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) является мышиным моноклональным антителом, полученным из супернатанта клеточной культуры.

См. соответствующую часть листка-вкладыша в упаковке набора для обнаружения VENTANA, чтобы ознакомиться с более подробным описанием: 1) принципов действия; 2) необходимых материалов и реагентов, не входящих в комплект; 3) сбора образцов тканей и подготовки к анализу; 4) процесса контроля качества; 5) принципов поиска и устранения проблем; 6) результатов; 7) общих ограничений.

## НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ МАТЕРИАЛЫ

В комплект поставки не входят красящие реагенты, например наборы для обнаружения VENTANA, а также вспомогательные компоненты, в том числе отрицательные и положительные тканевые контроли.

Для окрашивания требуются следующие реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки.

1. Дополнительные антитела панели VENTANA MMR IHC Panel:
   - VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№по каталогу 760-5094 / 08033692001)
   - VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№по каталогу 760-5093 / 08033684001)
   - VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (№по каталогу 760-5092 / 08033676001)
   - VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№по каталогу 760-5095 / 08033706001)
2. Negative Control (Monoclonal) (№по каталогу 760-2014 / 05266670001)
3. Предметные стекла для микроскопа (с положительным зарядом)
4. Этикетки со штрих-кодами (соответствующие реагенту для отрицательного контроля и используемому первичному антителу)
5. Ксилол (гистологической степени очистки)
6. Этанол или спиртосодержащий реагент (гистологической степени очистки)
   - 100%-й раствор: неразбавленный этанол или спиртосодержащий реагент.
   - 95%-й раствор: смешать 95 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 5 частями деионизированной воды.
   - 80%-й раствор: смешать 80 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 20 частями деионизированной воды.
7. Деионизированная или дистиллированная вода
8. OptiView DAB IHC Detection Kit (№по каталогу 760-700 / 06396500001)
9. Для VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, OptiView Amplification Kit (№по каталогу 760-099 / 06396518001 или №по каталогу 860 099 / 06718663001)
10. EZ Prep Concentrate (10X) (№по каталогу 950-102 / 05279771001)
11. Reaction Buffer Concentrate (10X) (№по каталогу 950-300 / 05353955001)
12. ULTRA LCS (Predilute) (№по каталогу 650-210 / 05424534001) или LCS (LCS predilute, № по каталогу 650-010 / 05264839001)
13. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (№по каталогу 950-224 / 05424569001) или Cell Conditioning 1 (CC1) (№ по каталогу 950-124 / 05279801001)
14. Hematoxylin II (№по каталогу 790-2208 / 05277965001)
15. Bluing Reagent (№по каталогу 760-2037 / 05266769001)
16. Постоянная гистологическая среда для заливки образцов (Permount Fisher №по каталогу SP15-500 или эквивалентная)
17. Покровное стекло (размера, достаточного для закрытия образцов ткани, например VWR, №по каталогу 48393-060)
18. Автоматический аппарат для заключения под покровное стекло (например, Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
19. Световой микроскоп
20. Гигроскопические салфетки

## ХРАНЕНИЕ

После получения реагента и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживать.

Для обеспечения надлежащей сохранности реагента и стабильности антител после каждого использования необходимо закрывать флакон-дозатор крышкой и сразу ставить его в холодильник в вертикальном положении.

На каждом флаконе-дозаторе с раствором антител указан срок годности. При соблюдении условий хранения реагент остается стабильным до даты, указанной на этикетке. Не использовать реагент после истечения срока годности.



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

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Данное первичное антитело можно применять для окрашивания подготовленных стандартным образом, фиксированных формалином и залитых в парафин тканей, при условии использования OptiView DAB IHC Detection Kit, а также аппаратов серии BenchMark ULTRA, XT и GX.

Необходимо получить срезы толщиной приблизительно 4 мкм и нанести их на положительно заряженные предметные стекла. Для окрашивания следует использовать свежие срезы тканей, поскольку антигенность тканевых срезов со временем может уменьшаться. Одновременно с исследованием неизвестных образцов рекомендуется провести исследование на положительном и отрицательном тканевых контролях.

При использовании панели VENTANA MMR IHC Panel рекомендуется, чтобы ткань в течение 6 часов после иссечения была зафиксирована в 10 % нейтральном забуференном формалине (NBF) на 6–24 часа из расчета окрашивания в миндалинах. Приемлемое окрашивание также достигалось при фиксации цинк-формалином и фиксаторами Z-5 в течение 6–24 часов. С панелью VENTANA MMR IHC Panel не рекомендуется использовать спиртовой раствор формалина (AFA), 95 % этиловый спирт и фиксаторы PREFER, поскольку в этих случаях ткани демонстрируют нестабильные результаты окрашивания или полное их отсутствие.

Используемое количество фиксатора должно составлять от 15 до 20 объемов ткани. За 24 часа фиксатор проникает в плотную ткань не более чем на 2–3 мм, а в пористую ткань — не более чем на 5 мм. Фиксирование следует проводить при комнатной температуре (15–25 °C).[30,31]

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики in vitro (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. Раствор ProClin 300 используется в данном реагенте в качестве консерванта. Он относится к раздражающим средствам и при контакте с кожей может стать причиной сенсибилизации. При работе с реагентом соблюдайте меры предосторожности. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. Используйте защитную одежду и перчатки.
4. Материалы человеческого или животного происхождения следует считать биологически опасными материалами и утилизировать, соблюдая все необходимые меры предосторожности.
5. Избегайте контакта реагентов с глазами и слизистыми оболочками. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды.
6. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.
7. Проконсультируйтесь с местными и (или) государственными органами в отношении рекомендованного способа утилизации.
8. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) предназначено для использования на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX в комбинации с OptiView DAB IHC Detection Kit и вспомогательными реагентами. В таблице 1 приведен протокол окрашивания для применения с антителом VENTANA anti-MLH1 (M1). Сведения о влиянии других значений времени и температуры при демаскировке антигена на устойчивость анализа к возникновению ошибок отсутствуют. Поэтому отклонение от рекомендуемых условий для демаскировки антигена, представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными. Следует использовать и документировать надлежащие контроли. Пользователи, которые отклоняются от указанного протокола, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

Параметры автоматических процедур могут быть отображены на экране, напечатаны и отредактированы согласно процедуре, описанной в руководстве пользователя, прилагаемом к соответствующим приборам. Для получения более подробной информации об этапах процедуры иммуногистохимического окрашивания см. листок-вкладыш в упаковке OptiView DAB IHC Detection Kit.

**Таблица** 1. Протокол окрашивания для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX.

| **Тип процедуры** | **Метод** | | |
|---|---|---|---|
| | BenchMark ULTRA **Аппарат** | BenchMark XT **Аппарат** | BenchMark GX **Аппарат** |
| **Депарафинирование** | Выбрано | Выбрано | Выбрано |
| **Кондиционирование клеток (демаскирование антигена)** | Cell Conditioning 1, 64 минуты при 100 °C | Cell Conditioning 1, 64 мин | Cell Conditioning 1, 64 мин |
| Pre-Primary Peroxidase Inhibitor | Выбрано | Выбрано | Выбрано |
| **Антитела (первичные)** | 24 минут, 36°C | 24 минут, 37 °C | 24 минут, 37 °C |
| OptiView HQ Linker | 8 мин (по умолчанию) | | |
| OptiView HRP Multimer | 8 мин (по умолчанию) | | |
| **Контрастное окрашивание** | Hematoxylin II, 4 минуты | | |
| **Обработка после контрокрашивания** | Bluing, 4 минуты | | |

Отклонение от рекомендуемых условий (особенно для демаскировки антигена), представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными. Тем не менее, в связи с различиями в фиксации и обработке тканей, а также в лабораторном оборудовании и внешних условиях может потребоваться увеличение или уменьшение времени инкубации первичных антител в зависимости от отдельных образцов и предпочтений эксперта. Подробную информацию о различиях в методиках фиксации см. в разделе Immunohistochemistry: Principles and Advances (Иммуногистохимический анализ: принципы и достижения).[32]

## ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

### Реагент для отрицательного контроля

Ventana Medical Systems, Inc. настоятельно рекомендует использовать реагент для отрицательного контроля для окрашивания смежного среза образца ткани пациента на отдельном предметном стекле, а не на предметном стекле, где образец был окрашен антителом VENTANA anti-MLH1 (M1). Мышиный моноклональный реагент для отрицательного контроля (Negative Control (Monoclonal), №по каталогу 760-2014 / 05266670001) рекомендуется для использования вместо первичного антитела для оценки неспецифического окрашивания. Параметры окрашивания антитела, используемого с реагентом для отрицательного контроля, должны соответствовать параметрам окрашивания первичного антитела.

### Положительный тканевый контроль

При выполнении каждой процедуры окрашивания необходимо проводить положительный тканевый контроль. Оптимальная лабораторная практика — помещение среза для положительного контроля на одно стекло с образцом ткани пациента. Такая практика позволяет распознать случаи, когда первичное антитело или другой важный реагент не оказывают должного эффекта на образец ткани пациента. Для оптимального контроля качества лучше всего подойдет образец ткани, в норме показывающий слабое положительное окрашивание. Положительно окрашиваемые компоненты ткани служат подтверждением того, что антитела нанесены и что прибор работает надлежащим образом. Данная ткань может



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

содержать как положительно, так и отрицательно окрашиваемые клетки или компоненты ткани и использоваться в качестве как положительного, так и отрицательного тканевого контроля. В качестве контроля следует использовать свежие образцы тканей, полученные в ходе вскрытия, биопсии или хирургических операций. Образцы следует как можно скорее подготовить или зафиксировать по процедуре, используемой для исследуемых образцов. С использованием таких образцов должен контролироваться весь процесс исследования, начиная от подготовки ткани и заканчивая окрашиванием. Использование среза ткани, фиксированного или обработанного по процедуре, отличной от процедуры тестируемого образца, позволяет обеспечить контроль всех реагентов и этапов метода, кроме фиксации и обработки ткани.

Заведомо положительные тканевые контроли следует использовать только для контроля правильности работы с обработанными тканями и тестирования реагентов, а не в качестве вспомогательного средства при постановке конкретного диагноза на основании образцов пациента. Если не наблюдается положительного окрашивания положительных тканевых контролей, результаты окрашивания тестовых образцов следует считать неверными.

Ткань КРР с белком MLH1, имеющим клинический статус «Неизмененная», или нормальной тканью толстой кишки после предварительной обработки антителом VENTANA anti-MLH1 (M1), может использоваться в качестве положительного тканевого контроля. Нормальная ткань толстой кишки будет иметь результат окрашивания белка MLH1 с использованием антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) «Неизмененная». Положительный тканевый контроль должен демонстрировать однозначное ядерное окрашивание в жизнеспособной опухоли и (или) элементах здоровой ткани толстой кишки. Внутренние клетки положительных контролей (например, лимфоциты, фибробласты или здоровый эпителий вблизи опухоли) для всех тканей должны иметь положительный результат окрашивания в ядре.

### Отрицательный тканевый контроль

Так как белки MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6 экспрессируются во всех тканях, для данных биомаркеров не существует нормального отрицательного тканевого контроля. Однако ткань КРР, в которой белок MLH1 имеет клинический статус «потерянная», после предварительной обработки антителом VENTANA anti-MLH1 (M1), может использоваться в качестве отрицательного тканевого контроля. Отрицательный тканевый контроль следует использовать только для проверки точности характеристик обработанных тканей, исследуемых реагентов и аппаратов, но не для формулировки конкретного диагноза на основании образцов пациента.

### Верификация анализа

Перед начальным использованием антитела или системы окрашивания в диагностической процедуре следует верифицировать специфичность антитела. Для этого выполняется тестирование антитела на серии тканей с известными характеристиками эффективности IHC, представляющими клинический статус MLH1 как в неизмененной ткани. (См. «Процедуры контроля качества», описанные ранее в этом разделе листка-вкладыша, а также рекомендации по контролю качества Программы лабораторной аккредитации коллегии американских патологов (College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program), контрольной карты по патологической анатомии[33] или CLSI Approved Guideline.[31])

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОКРАШИВАНИЯ/ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Схема клеточного окрашивания для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) имеет ядерный характер в активно пролиферирующих клетках. Квалифицированный патоморфолог присваивает клинический статус образцам КРР, окрашенным с помощью антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), на основании собственной оценки наличия или отсутствия специфичного ядерного окрашивания в опухолевой ткани. Клинический статус «Неизмененная» присваивается образцам с однозначным ядерным окрашиванием в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии приемлемых внутренних положительных контролей (ядерное окрашивание в лимфоцитах, фибробластах или здоровом эпителии вблизи опухоли). Клинический статус «Потерянная» присваивается образцам с однозначной потерей ядерного окрашивания или с фокальным слабым неоднозначным ядерным окрашиванием в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии внутренних положительных контролей, как показано в таблице 2.

Если во внутренних положительных контролях однозначное ядерное окрашивание отсутствует и (или) фоновое окрашивание мешает интерпретации, анализ следует считать неприемлемым. При этом необходимо провести анализ повторно. Точечное ядерное окрашивание опухолевых клеток следует считать отрицательным (потерянная экспрессия). В случае с фокальным окрашиванием опухолевых клеток интенсивность ядерного окрашивания по меньшей мере должна быть аналогична интенсивности окрашивания внутренних положительных контролей наряду со сливающимся/непрерывным характером окрашивания ядер в нескольких эпителиальных железах или эпителиальных жемчужинах, чтобы образцу был присвоен клинический статус «Неизмененная». При отсутствии указанных условий образцу присваивается клинический статус «Потерянная».

**Таблица** 2. Интерпретация окрашивания для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1)

| Клинический статус | Описание |
|---|---|
| **Неизмененная экспрессия** MLH1 | Однозначное ядерное окрашивание в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии внутренних положительных контролей (ядерное окрашивание в лимфоцитах, фибробластах или здоровом эпителии толстой кишки вблизи опухоли). |
| **Потерянная экспрессии** MLH1 | Однозначная потеря ядерного окрашивания или фокальное слабое неоднозначное ядерное окрашивание в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии внутренних положительных контролей. |

Образцы, окрашенные антителом VENTANA anti-MLH1 (M1), классифицируются как «Неизмененная» или «Потерянная» в зависимости от наличия или отсутствия специфического окрашивания в опухолевой ткани.

## ОСОБЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

Антитела и реагенты компании Ventana Medical Systems, Inc. имеют оптимальную концентрацию для применения в соответствии с прилагающейся инструкцией. Отклонение от рекомендуемых условий для демаскировки антигена, представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными.Следует использовать и документировать надлежащие контроли. Пользователи, которые отклоняются от указанного протокола, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

При использовании панели VENTANA MMR IHC Panel рекомендуется, чтобы образцы ткани были зафиксированы в 10 % нейтральном забуференном формалине на 6–24 часа в течение 6 часов после иссечения. Приемлемое окрашивание наблюдается после фиксации цинк-формалином и фиксатором Z-5 в течение 6–24 часов. Не рекомендуется фиксировать ткани в 95 % спирте, спиртовом растворе формалина с уксусной кислотой (AFA) или фиксаторах PREFER.

Анализ некоторых образцов может быть особенно сложным в связи со следующими проблемами:

- Неспецифическое фоновое окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать неспецифическое фоновое окрашивание по недостаточно понятным причинам. По этой причине оценка предметного стекла с антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) должна включать в себя сравнение предметного стекла с срезом ткани, окрашенным реагентом для отрицательного контроля для определения уровня неспецифичного фонового окрашивания. Цитоплазматическое окрашивание (при наличии) должно игнорироваться при IHC интерпретации результатов окрашивания антителом VENTANA anti-MLH1 (M1).
- Фокальное окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать фокальное окрашивание в опухолевых клетках; интенсивность окрашивания может варьировать от слабой до сильной. На основании IHC алгоритма оценивания антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), фокальное слабое неоднозначное ядерное окрашивание в жизнеспособных опухолевых клетках в присутствии внутренних положительных контролей должно квалифицироваться как «потерянная». Окрашивание может варьироваться в зависимости от уровня интенсивности, которая, в свою очередь, может варьироваться в зависимости от опухоли; однако интенсивность не влияет на клинический статус MLH1.
- Точечное окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать дискретное точечное окрашивание в нескольких ядрах опухоли; интенсивность окрашивания может варьировать от слабой до сильной. Такой характер окрашивания следует игнорировать, и если образец имеет только этот тип



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

характера окрашивания, ему следует присвоить клинический статус «Потерянная».

- Тканевые артефакты или артефакты, вызванные окрашиванием. Гистологические артефакты, возникающие в ходе обработки образцов и микротомии, также могут осложнить определение IHC клинического статуса антитела VENTANA anti-MLH1 (M1). К таким артефактам относятся, кроме прочего, градиенты фиксации и краевые эффекты, захват DAB, образование пузырьков в ядре, недостаточное окрашивание на некоторых участках ткани, разрыв или складки ткани и потеря среза ткани. В некоторых случаях может потребоваться повторное окрашивание новых срезов или получение нового образца.

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИТЕЛА VENTANA ANTI-MLH1 (M1)

### Аналитическая чувствительность/специфичность

Аналитическая чувствительность и специфичность были определены посредством окрашивания множественных образцов нормальных и опухолевых тканей человека антителом VENTANA anti-MLH1 (M1). Результаты приведены в Таблица 3 и Таблица 4. Положительное окрашивание является ядерным, если не указано иное. В результате окрашивания нормальных и опухолевых тканей антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) непредвиденных результатов получено не было. Как и ожидалось, поскольку репарация неспаренных оснований присутствует во всех активно пролиферирующих клетках, все здоровые и опухолевые ткани продемонстрировали положительное окрашивание.

**Таблица** 3. Аналитическая чувствительность/специфичность окрашивания FFPE нормальных тканей антителом VENTANA anti-MLH1 (M1)

| Ткань | Кол-во положительных случаев/ общее кол-во случаев | Ткань | Кол-во положительных случаев/ общее кол-во случаев |
|---|---|---|---|
| Надпочечник | 3/3 | Легкое | 4/4 |
| Мочевой пузырь | 3/3 | Лимфоузлы | 3/3 |
| Костный мозг | 3/3 | Мезотелий | 4/4 |
| Яичник | 5/5 | Поджелудочная железа | 3/3 |
| Молочная железа | 3/3 | Паращитовидная железа | 3/3 |
| Мозжечок | 3/3 | Периферический нерв | 5/5 |
| Головной мозг | 3/3 | Простата | 3/3 |
| Шейка матки | 3/3 | Скелетная мышца | 3/3 |
| Толстая кишка | 3/3 | Кожа | 3/3 |
| Эндометрий | 3/3 | Селезенка | 3/3 |
| Пищевод | 3/3 | Желудок | 3/3 |
| Сердце | 3/3 | Яичко | 3/3 |
| Гипофиз | 3/3 | Тимус | 3/3 |
| Стенка кишечника | 3/3 | Щитовидная железа | 4/4 |
| Почка | 3/3 | Язык/слюнная железа | 3/3 |
| Печень | 3/3 | Миндалины | 3/3 |

Примечание. Белки репарации неспаренных оснований, такие как MLH1, присутствуют во всех клетках с активной пролиферацией. Для всех тканей положительное/отрицательное окрашивание определялось для тканеспецифичных элементов при наличии положительного окрашивания в здоровых контрольных клетках (лимфоцитах, фибробластах и эпителиальных клетках).

**Таблица** 4. Аналитическая чувствительность/специфичность окрашивания различных FFPE опухолевых тканей антителом VENTANA anti-MLH1 (M1)

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Глиобластома (головной мозг) | 1/1 |
| Менингиома (головной мозг) | 1/1 |
| Эпендимома (головной мозг) | 1/1 |
| Олигодендроглиома (головной мозг) | 1/1 |
| Серозная аденокарцинома (яичник) | 1/1 |
| Аденокарцинома (яичник) | 1/1 |
| Панкреато-нейроэндокринное новообразование (поджелудочная железа) | 1/1 |
| Семинома (яичко) | 1/1 |
| Медуллярная карцинома (щитовидная железа) | 1/1 |
| Папиллярная карцинома (щитовидная железа) | 1/1 |
| Протоковая карцинома in situ (молочная железа) | 1/1 |
| Микроинвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 1/1 |
| Инвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 1/1 |
| Мелкоклеточная карцинома (легкое) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (легкое) | 1/1 |
| Нейроэндокринная карцинома (пищевод) | 1/1 |
| Аденокарцинома (пищевод) | 1/1 |
| Перстневидноклеточная карцинома (желудок) | 1/1 |
| Аденокарцинома (тонкая кишка) | 1/1 |
| Стромальная саркома (тонкая кишка) | 1/1 |
| Гастроинтестинальная стромальная опухоль (GIST) (тонкая кишка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (толстая кишка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (прямая кишка) | 1/1 |
| Гастроинтестинальная стромальная опухоль (GIST) (прямая кишка) | 1/1 |
| Гепатобластома (печень) | 1/1 |
| Светлоклеточная карцинома (почка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (предстательная железа) | 2/2 |
| Лейомиома (матка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (матка) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (шейка матки) | 2/2 |



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

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Эмбриональная рабдомиосаркома (поперечно-полосатая мускулатура) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (кожа) | 1/1 |
| Нейрофиброма (поясница) | 1/1 |
| Нейробластома (забрюшинное пространство) | 1/1 |
| Мезотелиома (брюшина) | 1/1 |
| В-клеточная лимфома, неуточненная (лимфатический узел) | 3/3 |
| Лимфома Ходжкина (Hodgkin) (лимфатический узел) | 1/1 |
| Лейомиосаркома (мочевой пузырь) | 1/1 |
| Остеосаркома | 1/1 |
| Веретеноклеточная рабдомиосаркома (брюшина) | 1/1 |
| Лейомиосаркома (гладкая мускулатура) | 1/1 |

Примечание. Белки репарации неспаренных оснований, такие как MLH1, присутствуют во всех клетках с активной пролиферацией. Для всех тканей положительное/отрицательное окрашивание определялось для опухолевых клеток при наличии положительного окрашивания в здоровых контрольных клетках (лимфоцитах, фибробластах и эпителиальных клетках).

### Внутрисуточная повторяемость и межсуточная прецизионность

Повторяемость и прецизионность окрашивания антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) оценивались на аппарате BenchMark ULTRA в сочетании с OptiView DAB IHC Detection Kit.

Внутрисуточная повторяемость оценивалась с использованием 10 образцов КРР (5 с неизмененной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией MLH1). Пять реплицированных предметных стекол каждого из образцов КРР окрашивались антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) на одном аппарате BenchMark ULTRA в один день. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все предметные стекла были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им статус «Неизмененная» или «Потерянная».

Межсуточная прецизионность также оценивалась с использованием 10 образцов КРР (5 с неизмененной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией MLH1). Реплицированные предметные стекла каждого из образцов КРР окрашивались антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) на аппарате BenchMark ULTRA в каждый из 5 непоследовательных дней. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все предметные стекла были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им статус «Неизмененная» или «Потерянная».

Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5. На основании объединенных данных всех возможных парных сочетаний исследования внутрисуточной повторяемости и межсуточной прецизионности продемонстрировали 100%-е совпадение положительных результатов (PPA), 100%-е совпадение отрицательных результатов (NPA) и общее 100%-е совпадение результатов (OPA). Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 5.

**Таблица** 5. Внутрисуточная повторяемость и межсуточная прецизионность окрашивания антителом VENTANA anti-MLH1 (M1), согласно выявленному клиническому статусу (неизмененная или потерянная)

| Повторяемость/прецизионность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Внутрисуточная повторяемость | Неизменен-ная | PPA | 25/25 | 100,0. | (86,7; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 25/25 | 100,0. | (86,7; 100,0) |
| | Всего | OPA | 50/50 | 100,0. | (92,9; 100,0) |
| Межсуточная прецизионность | Неизменен-ная | PPA | 50/50 | 100,0. | (92,9; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 50/50 | 100,0. | (92,9; 100,0) |
| | Всего | OPA | 100/100 | 100,0. | (96,3; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

### Прецизионность между разными аппаратами BenchMark

Прецизионность между разными аппаратами BenchMark ULTRA для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) определялась методом окрашивания реплицированных предметных стекол с 10 образцами КРР (5 с неизмененной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией MLH1) на 3 аппаратах BenchMark ULTRA с применением антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) и использованием OptiView DAB IHC Detection kit. Реплицированные предметные стекла каждого из образцов КРР окрашивались антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) на 3 аппаратах BenchMark ULTRA.

Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все предметные стекла были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им клинический статус «Неизмененная» или «Потерянная». Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5.

При определении прецизионности между разными аппаратами BenchMark ULTRA был проведен сравнительный анализ пар клинического статуса предметных стекол для каждого образца между аппаратами и продемонстрированными 100% PPA, NPA и OPA. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 6.

**Таблица** 6. Прецизионность между разными аппаратами BenchMark ULTRA для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), согласно выявленному клиническому статусу (неизмененная или потерянная)

| Точность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Между разными аппаратами | Неизменен-ная | PPA | 30/30 | 100,0. | (88,6; 100,0) |
| | Потерян-ная | NPA | 30/30 | 100,0. | (88,6; 100,0) |
| | Всего | OPA | 60/60 | 100,0. | (94,0; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

Кроме того, прецизионность между разными аппаратами для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) определялась методом окрашивания реплицированных предметных стекол с 6 образцами КРР (4 с неизмененной экспрессией и 2 с потерянной экспрессией MLH1) на 3 аппаратах BenchMark XT и 3 аппаратах Benchmark GX с применением антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) и использованием OptiView DAB IHC Detection Kit.



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

Было проведено 15 наблюдений на каждый образец при объединении 3 аппаратов; медиана для каждого образца определялась по этим 15 наблюдениям. Индивидуальные наблюдения одного и того же образца считались согласующимися с медианной интенсивностью сигнала образца, если их интенсивность находилась в пределах 0,5. При определении прецизионности между аппаратами BenchMark XT и BenchMark GX для каждого образца был выполнен сравнительный анализ пар по уровню интенсивности окрашивания опухолевой ткани. Результаты были следующими: 100 % OPA между 3 аппаратами BenchMark XT и 100 % OPA между 3 аппаратами BenchMark GX. Для всех предметных стекол уровень фонового окрашивания был приемлемым (≤ 0,5) как на аппаратах BenchMark XT, так и на аппаратах GX.

### Конкордантность платформы BenchMark

Конкордантность между аппаратами BenchMark ULTRA, XT и GX для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) была определена методом окрашивания образцов КРР антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit. Клинический статус всех предметных стекол (неизмененная/потерянная) оценивался одним и тем же патоморфологом.

Между платформами было проведено парное сравнение клинических статусов образцов КРР, в том числе сравнение GX с ULTRA (128 образцов с неизмененной экспрессией и 23 с потерянной экспрессией); сравнение GX с XT (128 образца с неизмененной экспрессией и 22 с потерянной экспрессией); и сравнение ULTRA с XT (140 образцов с неизмененной экспрессией и 23 с потерянной экспрессией). Все парные сравнения, выполненные между платформами, продемонстрировали 100%-е среднее совпадение положительных результатов (APA), среднее совпадение отрицательных результатов (ANA) и OPA.

### Исследования прецизионности оценок эксперта

Прецизионность по каждому эксперту и между экспертами оценивалась по 20 образцам КРР (11 с неизмененной экспрессией и 9 с потерей экспрессии), окрашенным антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) и OptiView DAB IHC Detection Kit. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца.

Все предметные стекла были рандомизированы и оценивались 3 патоморфологами на предмет клинического статуса MLH1 «неизмененная» или «потерянная». Патоморфологам был неизвестен диагноз образцов. После четырехнедельного отмывочного периода окрашенные антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) предметные стекла были повторно рандомизированы для проведения второй оценки клинического статуса MLH1 каждым из 3 патоморфологов. Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5.

Для определения прецизионности по каждому эксперту сравнивали исходную и итоговую оценки слайда, полученные от одного и того же патоморфолога. Всего было выполнено сравнение 20 предметных стекол с срезом КРР на каждого патоморфолога. Сравнения 3 патоморфологов были объединены и продемонстрировали 98,5% APA, 98,1% ANA и 98,3% OPA для прецизионности по каждому эксперту. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 7.

Для определения прецизионности между экспертами сравнивали все оценки предметных стекол (20 КРР x 2 оценки/образец x 3 патоморфолога = 120 оценок предметных стекол) со статусом модального образца для каждого образца КРР. Результаты демонстрируют 100 % PPA, 98,1 % NPA и 99,2 % OPA для прецизионности между экспертами. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 7.

**Таблица** 7. Прецизионность по каждому эксперту и между экспертами оценивалась антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) для образцов КРР, согласно выявленному клиническому статусу MLH1 (неизмененная/потеря)

| Точность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| По каждому эксперту | Неизменен-ная | APA | 66/67 | 98,5. | (88,0; 100,0) |
| | Потерянная | ANA | 52/53 | 98,1. | (83,3; 100,0) |
| | Всего | OPA | 59/60 | 98,3. | (85,0; 100,0) |
| Между экспертами | Неизменен-ная | PPA | 66/66 | 100,0. | (94,5; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 53/54 | 98,1. | (90,2, 99,7) |
| | Всего | OPA | 119/120 | 99,2. | (95,4, 99,9) |

Примечание. Для оценки по каждому эксперту 95% доверительные интервалы для APA и ANA были рассчитаны по методу Клоппера-Пирсона; 95% доверительный интервал для OPA 95% CI был рассчитан по методу бутстреп. Для оценки между экспертами 95% доверительные интервалы были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

### Прецизионность между партиями

Прецизионность между партиями антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) была определена методом анализа 3 производственных партий антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), каждая с использованием строенных предметных стекол из 10 образцов КРР (5 с неизмененной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией MLH1) на аппарате BenchMark ULTRA с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit.

Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Наборы предметных стекол были рандомизированы, а затем их оценку провел один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов и номер партии антитела VENTANA anti-MLH1 (M1). Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5.

При определении прецизионности между партиями антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) все оценки предметных стекол сравнивались со статусом модального образца для каждого образца КРР. Показатель OPA между партиями антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) составил 100 %, продемонстрировав, что окрашивание антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) является воспроизводимым между партиями антитела.

Сводные данные полученных результатов для анализа прецизионности между партиями антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) приведены в таблице 8.

**Таблица** 8. Прецизионность между партиями антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), согласно выявленному клиническому статусу (неизмененная или потерянная)

| Точность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Между партиями | Неизменен-ная | PPA | 45/45 | 100,0. | (92,1; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 45/45 | 100,0. | (92,1; 100,0) |
| | Всего | OPA | 90/90 | 100,0. | (95,9; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

### Исследование воспроизводимости результата между лабораториями

Исследование воспроизводимости результата между лабораториями для панели VENTANA MMR IHC Panel было проведено для демонстрации воспроизводимости каждого анализа панели VENTANA MMR IHC Panel для определения клинического статуса. В исследование было включено 6 образцов ткани КРР (3 с неизмененной экспрессией и 3 с потерянной экспрессией) для каждого белка MMR и 16 образцов ткани КРР (8 положительных и 8 отрицательных) для определения BRAF V600E.



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

Циклы проводились на 3 аппаратах BenchMark ULTRA в каждый из 5 непоследовательных дней за 21-дневный период в трех независимых лабораториях. Образцы были рандомизированы и оценены в общей сложности 6 экспертами (по 2 в каждом исследовательском центре), которые не знали заранее, каков клинический статус MMR в образцах набора исследования. Для каждого из 40 образцов в исследовании было проведено 30 наблюдений по всем дням, исследовательским центрам и экспертам. Эталонный статус модального образца был получен для каждого образца на основании наиболее часто наблюдаемого статуса в 30 наблюдениях. Всего в исследовании было проведено 1200 наблюдений для всех пяти белков. Для всех оцениваемых образцов уровень приемлемости в отношении морфологических структур и фона в данном исследовании составил 100 %. Сводные данные по объединенным (для всех пяти белков) статистическим показателям совпадений между эталонным статусом модального образца и индивидуальными наблюдениями приведены в таблице 9.

**Таблица** 9. Совпадения между панелью VENTANA MMR IHC Panel и эталонным статусом модального образца

| Межлабораторная повторяемость | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Все белки | Неизмененная/положительный | PPA | 598/600 | 99,8. | (98,7; 100,0) |
| | Потерянная/отрицательный | NPA | 593/600 | 98,9. | (97,4; 99,5) |
| | Всего | OPA | 1191/1200 | 99,4. | (98,6; 99,7) |

Примечание. Клинический статус определяется как «неизмененная» или «потерянная» для экспрессии белка MMR или «положительный» или «отрицательный» для белка BRAF V600E Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием подхода на основе обобщенной оценочной модели со смешанными эффектами (GLMM).

Кроме того, для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) были проведены парные сравнения между исследовательскими центрами, межсуточными показателями и показателями между экспертами. Для MLH1 этот набор исследований включал в общем 180 наблюдений. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 10. Данные обозначают повторяемость анализа по 5 дням, 3 исследовательским центрам и 6 экспертам.

**Таблица** 10. Показатели парных совпадений межлабораторной воспроизводимости для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), согласно выявленному клиническому статусу (неизмененная или потерянная)

| Межлабораторная повторяемость | | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Между исследовательскими центрами (3 исследовательских центра) | | APA | 360/360 | 100,0. | (98,9; 100,0) |
| | | ANA | 360/360 | 100,0. | (98,9; 100,0) |
| | | OPA | 360/360 | 100,0. | (98,9; 100,0) |
| Межсуточная (5 непоследовательных дней) | Лаборатория A | APA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | | ANA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | | OPA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | Лаборатория B | APA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | | ANA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | | OPA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | Лаборатория C | APA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | | ANA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | | OPA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| Между экспертами (2 патоморфолога на исследовательский центр) | | APA | 90/90 | 100,0. | (95,9; 100,0) |
| | | ANA | 90/90 | 100,0. | (95,9; 100,0) |
| | | OPA | 90/90 | 100,0. | (95,9; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

### Исследование точности: сравнение метода получения результатов с использованием панели VENTANA MMR IHC Panel и молекулярного тестирования (секвенирование ДНК и гиперметилирование промотора MLH1)

Исследование было проведено для сравнения эффективности использования панели VENTANA MMR IHC Panel и молекулярного тестирования, в том числе комплексной панели образцов тканей толстой кишки для секвенирования ДНК с целью идентификации КРР, который (i) характеризуется дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR) и (ii) содержит мутацию BRAF V600E. Панель образцов тканей толстой кишки для секвенирования ДНК включала геномный анализ вариаций, присутствующих в генах MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, EPCAM), BRAF и других генах, играющих важное значение при канцерогенезе (например PIK3CA, KRAS, NRAS, ERBB2 и т. д.). Секвенирование включало все экзоны, интронные и фланкирующие последовательности, а также значимые делеции, дупликации и мозаицизм.

Для исследования последовательности образцов КРР окрашивались H&E (гематоксилином и эозином) и оценивались на предмет надлежащей фиксации и морфологии, включая наличие клеточных элементов (опухоль и клетки внутренних контролей). Каждый образец оценивали, чтобы определить, состоит ли образец из опухолевых клеток как минимум на 50 %. Такая оценка была проведена для обеспечения достаточного количества опухолевых клеток в образце согласно рекомендациям для проведения молекулярного тестирования. После оценки в исследование было включено 105 образцов, соответствующих этим критериям. Кроме того, были включены 13 образцов КРР, демонстрирующих клинический статус «Потерянная» при исследовании методом IHC, чтобы гарантировать, что потеря экспрессии каждого маркера будет отражена в исследовании. Тканевые срезы всех образцов исследования были окрашены методом IHC с использованием панели VENTANA MMR IHC Panel и соответствующих реагентов для отрицательного контроля. Дополнительные тканевые срезы были обработаны с помощью панели образцов ткани толстой кишки для секвенирования ДНК. Гиперметилирование промотора MLH1 — один из механизмов, который может привести к потере экспрессии белка MLH1, и его связывают со спорадическим КРР, а не с потенциальным синдромом Линча. Поэтому все образцы с потерей экспрессии MLH1, идентифицированные методом IHC при проведении исследования, были проанализированы на предмет гиперметилирования промотора MLH1.

С окончательным набором исследования, состоящим из 118 образцов, в анализ были включены показатели PPA и NPA для всех объединенных маркеров (т. е. все объединенные наблюдаемые значения), при этом молекулярное тестирование выступало в качестве эталона для сравнения IHC. Анализ включал в себя сравнение статуса белка MMR (неизмененная/потерянная) с молекулярным статусом, определенным как «нормальный» (нет патогенных мутаций, отрицателен в отношении гиперметилирования промотора MLH1 и BRAF дикого типа (отсутствие мутации V600E)) или «аномальный» (наличие патогенных мутаций, положителен в отношении гиперметилирования промотора MLH1 и (или) положителен в отношении мутации BRAF V600E). В этом исследовании патогенная мутация в опухоли определяется как герминативная или соматическая мутация, которая, согласно прогнозу, приводит к потере экспрессии белка MMR. Показатели точечной оценки составили 99,4 % PPA, 93,5 % NPA и 98,8 % OPA, как показано в таблице 11.

Также был проведен сводный анализ для сравнения четырех IHC маркеров MMR (без антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) с результатами молекулярного



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

тестирования. Показатели точечной оценки составили 99,3 % PPA, 89,7 % NPA и 98,5 % OPA, как показано в таблице 12.

В рамках дополнительного анализа сравнили результаты исследования методом IHC для четырех маркеров MMR с результатами молекулярного тестирования генов MMR на уровне одного образца, чтобы включить в исследование статус всех маркеров и получить результат dMMR/pMMR при использовании двух методов. Результаты данного анализа представлены в таблице 13, OPA при применении двух методов составляет 97,4 %.

В рамках исследования было выполнено сравнение статуса MMR при исследовании методом IHC и статуса молекулярного тестирования генов MMR для отдельных маркеров MMR. Показатель OPA для каждого маркера MMR при сравнении с объединенными результатами панели образцов ткани толстой кишки для секвенирования ДНК и анализа гиперметилирования промотора MLH1 составлял 100,0 % для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), 99,1 % для VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, 98,3 % для VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody и 96,6 % для антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

Клинический статус BRAF V600E в образцах КРР, полученных методом IHC с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), также сравнивался с результатами оценки мутационного статуса BRAF, определенными с помощью секвенирования ДНК. Показатели PPA, NPA и OPA IHC тестирования с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и применением метода секвенирования ДНК в качестве эталона составили 100 % (таблица 14). Было проведено дополнительное тестирование для подтверждения способности антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) к четкому определению образцов КРР, демонстрирующих потерю экспрессии белка MLH1. Из 23 образцов, положительных в отношении BRAF V600E, в 20 методом IHC была выявлена потеря экспрессии белка MLH1, и они были положительны в отношении гиперметилирования промотора MLH1. Эти данные указывают на тесную связь положительного статуса BRAF V600E и статуса гиперметилирования промотора MLH1. Оставшиеся образцы представляли собой образцы с pMMR (неизмененная экспрессия для всех белков MMR). Все образцы, положительные на BRAF V600E, идентифицировали как образцы со спорадическим КРР. Результаты подтвердили, что антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) правильно идентифицирует образцы КРР, имеющие мутацию BRAF V600E. Также данные подтвердили возможность использования антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) для дифференциации спорадического КРР и вероятного синдрома Линча при отсутствии экспрессии белка MLH1.

**Таблица** 11. Совокупный анализ для совпадений панели VENTANA MMR IHC Panel между IHC и молекулярным тестированием

| **Статус*** (**Молекулярное тестирование**/IHC) | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| Нормальный/неизменненная | PPA | 523/526 | 99,4. | (98,7; 100,0) |
| Аномальный/потерянная | NPA | 58/62 | 93,5. | (87,1; 98,6) |
| Всего | OPA | 581/588 | 98,8. | (98,0; 99,7) |

* При использовании метода IHC статус экспрессии белка системы MMR — неизмененная или потерянная. Для этого анализа отрицательные и положительные на BRAF V600E образцы были включены в категории «Неизмененная» или «Потерянная» соответственно. Молекулярное тестирование указывает на отсутствие (нормальный) или присутствие (аномальный) потенциальных патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп.

**Таблица** 12. Совокупный анализ совпадений четырех IHC маркеров MMR (без антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) между IHC и молекулярным тестированием

| **Статус*** (**Молекулярное тестирование**/IHC) | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| Нормальный/неизменненная | PPA | 428/431 | 99,3. | (98,4; 100,0) |
| Аномальный/потерянная | NPA | 35/39 | 89,7. | (79,4; 97,7) |
| Всего | OPA | 463/470 | 98,5. | (97,3; 99,6) |

* При использовании метода IHC статус экспрессии белка — неизмененная или потерянная. Молекулярное тестирование указывает на отсутствие (нормальный) или присутствие (аномальный) потенциальных патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп.

**Таблица** 13. Совпадения четырех маркеров MMR при исследовании методом IHC и результатов молекулярного тестирования для определения статуса MMR (dMMR/pMMR)

| **Статус** MMR* | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| pMMR | PPA | 79/80 | 98,8. | (93,3; 99,8) |
| dMMR | NPA | 35/37 | 94,6. | (82,3; 98,5) |
| Всего | OPA | 114/117 | 97,4. | (92,7; 99,1) |

* При использовании метода IHC статус pMMR образца формулируется как «Неизмененная» для всех MMR-белков, в то время как при статусе dMMR наблюдается потеря экспрессии одного или нескольких MMR-белков. В рамках молекулярного тестирования статус pMMR представляет собой отсутствие патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1, в то время как статус dMMR представляет собой наличие патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

**Таблица** 14. Совпадения между методом IHC с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и молекулярным тестированием

| BRAF V600E **Статус** (**Молекулярное тестирование**/IHC) | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| Положительный/аномальный | PPA | 23/23 | 100,0. | (85,7; 100,0) |
| Отрицательный/нормальный | NPA | 95/95 | 100,0. | (96,1; 100,0) |
| Всего | OPA | 118/118 | 100,0. | (96,8; 100,0) |

Статус для BRAF V600E был определен как «положительный» или «отрицательный» по результатам IHC и «аномальный» (присутствие мутации V600E) или «нормальный» (BRAF дикого типа) по результатам молекулярного тестирования. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ


1. Yuan L, Chi Y, Chen W, Chen X, Wei P, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. Int J Clin Exp Med. 2015;8(11):20988-21000.
2. Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. Arch Pathol Lab Med. 2011;135(10):1269-1277.





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

3. Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. Am J Surg Pathol. 2003;27(11):1393-1406.
4. Tiwari AK, Roy HK, Lynch HT. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. QJM. 2016;109(3):151-158.
5. Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. Expert Rev Mol Diagn. 2016;16(5):591-604.
6. Silva FCC, Torrezan GT, Ferreira JRO, Oliveira LP, Begnami M, et al. Germline Mutations in MLH1 Leading to Isolated Loss of PMS2 Expression in Lynch Syndrome: Implications for Diagnostics in the Clinic. Am J Surg Pathol. 2017;41(6):861-864.
7. Boyer JC, Umar A, Risinger JI, Lipford JR, Kane M, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. Cancer Res. 1995;55(24):6063-6070.
8. Lawes DA, Pearson T, Sengupta S, Boulos PB. The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. Br J Cancer. 2005;93(4):472-477.
9. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med. 2003;348(10):919-932.
10. Peltomaki P. Role of ДНК mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. J Clin Oncol. 2003;21(6):1174-1179.
11. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. Cancer. 1996;78(6):1149-1167.
12. Caldes T, Godino J, Sanchez A, Corbacho C, De la Hoya M, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. Oncol Rep. 2004;12(3):621-629.
13. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, et al. Value of immunohistochemical detection of ДНК mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. Am J Surg Pathol. 2005;29(1):96-104.
14. Cunningham JM, Tester DJ, Thibodeau SN. Mutation detection in colorectal cancers : direct sequencing of ДНК mismatch repair genes. Methods Mol Med. 2001;50:87-98.
15. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. J Med Genet. 2004;41(9):664-668.
16. Jin M, Hampel H, Zhou X, Schunemann L, Yearsley M, et al. BRAF V600E mutation analysis simplifies the testing algorithm for Lynch syndrome. Am J Clin Pathol. 2013;140(2):177-183.
17. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2004;10(1 Pt 1):191-195.
18. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, et al. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. Diseases of the Colon & Rectum. 2014;57(8):1025-1048.
19. Egoavil C, Alenda C, Castillejo A, Paya A, Peiro G, et al. Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers. PLoS One. 2013;8(11):e79737.
20. Connell LC, Mota JM, Braghiroli MI, Hoff PM. The Rising Incidence of Younger Patients With Colorectal Cancer: Questions About Screening, Biology, and Treatment. Curr Treat Options Oncol. 2017;18(4):23.
21. Provenzale D, Gupta S, Ahnen DJ, Bray T, Cannon JA, et al. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2016;14(8):1010-1030.
22. Balmana J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D, Group EGW. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. Ann Oncol. 2013;24 Suppl 6:vi73-80.
23. Evaluation of Genomic Applications in P, Prevention Working G. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. Genet Med. 2009;11(1):35-41.
24. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst. 2004;96(4):261-268.
25. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. J Med Genet. 2012;49(3):151-157.
26. Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting ДНК mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. Semin Diagn Pathol. 2015;32(5):352-361.
27. Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, Gylling A, Lahtinen L, et al. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. Virchows Arch. 2013;463(5):613-621.
28. Toon CW, Chou A, DeSilva K, Chan J, Patterson J, et al. BRAFV600E immunohistochemistry in conjunction with mismatch repair status predicts survival in patients with colorectal cancer. Mod Pathol. 2014;27(5):644-650.
29. Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. Int J Cancer. 2004;108(2):237-242.
30. Carson FL, Hladik C, Cappellano CH, Pathology ASfC. Histotechnology: A Self-Instructional Text: American Society for Clinical Pathology; 2015.
31. CSLI. Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
32. Roche PC, Hsi ED, Firfer BL. Immunohistochemistry: Principles and Advances. Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology, 7th Edition: American Society of Microbiology; 2006.
33. Rabinovitch A. The College of American Pathologists laboratory accreditation program. Accreditation and Quality Assurance. 2002;7(11):473-476.

## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW и логотип VENTANA являются товарными знаками Roche.

Все остальные товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

© 2019 Ventana Medical Systems, Inc. и Roche Diagnostics International, Inc.

## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

www.ventana.com

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.



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

# VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

Для использования с Панелью VENTANA MMR IHC Panel

REF 760-5092

08033676001

IVD Σ 50

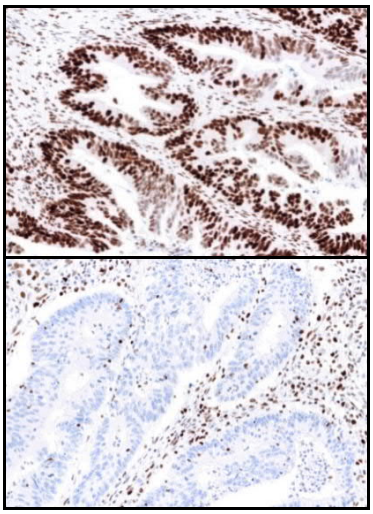


**Рисунок** 1. **Окрашивание антителом** VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody **с неизмененной экспрессией (сверху) или потерянной экспрессией (снизу) в раковой ткани толстой кишки**

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-MSH6 (SP93)) предназначено для качественного обнаружения белка MSH6 в фиксированных формалином и залитых в парафин срезах ткани. Антитело VENTANA anti-MSH6 (SP93) готово для применения на аппаратах серии BenchMark ULTRA, XT и GX с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit и вспомогательных реагентов.

Антитело VENTANA anti-MSH6 (SP93) является частью панели VENTANA MMR IHC Panel, в состав которой входят VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody и VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody. Панель VENTANA MMR IHC Panel предназначена для обнаружения недостатка белка, участвующего в репарации неспаренных оснований ДНК, в качестве теста для идентификации лиц, находящихся под угрозой развития синдрома Линча, среди пациентов, которым диагностирован колоректальный рак (КРР), а также у которых выявлена мутация V600E в гене BRAF, в качестве вспомогательного средства для различения спорадического КРР и вероятного синдрома Линча в условиях отсутствия экспрессии белка MLH1.

Результаты анализов, выполненных с использованием данных продуктов, должны интерпретироваться квалифицированным патоморфологом с учетом результатов гистологического исследования, клинической картины и соответствующих контролей.

Предназначено для диагностики in vitro (IVD).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

Колоректальный рак является третьим наиболее распространенным видом рака и четвертой по распространенности причиной смерти в мире.[1] В большинстве случаев КРР наблюдается хромосомная нестабильность, однако примерно в 15 % случаев рак развивается по альтернативному пути, характеризуемому дефектом функции системы репарации неспаренных оснований ДНК (MMR). Вследствие дефекта функции репарации неспаренных оснований (MMR) в опухолях наблюдается микросателлитная нестабильность (MSI), обусловленная неспособностью белков-репараторов (белки MMR) устранять ошибки репликации ДНК.

КРР с дефектами системы MMR обозначается как опухоль с дефицитом белков MMR (dMMR). И наоборот, КРР без дефектов системы MMR обозначается как опухоль с избытком белков MMR (pMMR). Колоректальный рак с дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR) в большинстве случаев имеет низкую дифференцировку и часто демонстрирует гистологические признаки преобладания в проксимальном отделе толстой кишки, а также муцинозного, медуллярного или перстневидноклеточного рака. Кроме того, он характеризуется увеличением числа лимфоцитов, инфильтрующих опухоли.[2,3] В общем, дефицит репарации неспаренных оснований может быть вызван мутациями зародышевой линии в одном из генов MMR с последующей утратой соответствующей нормальной аллели посредством генетических или эпигенетических механизмов, соматическими мутациями в аллелях или эпигенетической инактивацией белка MLH1 посредством метилирования.[4]

Наиболее часто мутациям подвержены следующие четыре гена MMR: MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6. В нормальных клетках белок MLH1 формирует комплекс (гетеродимер) с белком PMS2, в то время как белок MSH2 формирует комплекс с белком MSH6.[5,6] При возникновении неспаренных оснований ДНК гетеродимер MSH2/MSH6 связывается с неспаренным основанием ДНК, провоцируя конформационное изменение. Гетеродимер MLH1/PMS2 связывается с ДНК-связанным комплексом MSH2/MSH6, вызывая эксцизионную репарацию поврежденной ДНК.

Белки MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6 являются клинически значимыми белками MMR, кодируемыми генами, которые могут мутировать у пациентов, имеющих в семейном анамнезе синдром Линча.[7,8] Носители этих мутаций имеют высокий пожизненный риск развития колоректального и других форм рака ввиду накопления ошибок репликации ДНК в пролиферирующих клетках. Синдром Линча составляет 1–6 % всех случаев КРР. Такие опухоли образуются по причине наследования аутосомно-доминантной мутации зародышевой линии в одном из четырех генов MMR; при этом для большинства случаев КРР, связанного с синдромом Линча, характерна потеря экспрессии белка MLH1.[5,9,10] У пациентов с синдромом Линча было выявлено более 300 различных мутаций в семействе белков MMR. Фенотип опухоли, связанной с синдромом Линча, обычно характеризуется иммуногистохимической потерей экспрессии в белках MMR, в частности в белках MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6.[10-13] Исследование MMR методом IHC (иммуногистохимии) продемонстрировало эффективность при идентификации специфичного гена MMR, имеющего наибольшую вероятность обнаружения в нем изменения зародышевой линии или соматического изменения.[14]

Являясь частью панели VENTANA MMR IHC Panel, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) помогает дифференцировать спорадический КРР и вероятный синдром Линча при отсутствии экспрессии белка MLH1.[15,16] При КРР потеря экспрессии белка MLH1 зачастую является результатом гиперметилирования промотора MLH1 и указывает на спорадический характер заболевания.[17] Наличие белка BRAF V600E тесно связано с гиперметилированием промотора MLH1. В итоге положительный результат окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) указывает на спорадический КРР.

## КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

В 1960-х годах был впервые описан синдром Линча и была установлена связь между потерей функции MMR и развитием рака.[18] Потеря белков MMR (MLH1, PMS2, MSH2 или MSH6) может привести к MSI и повышенному пожизненному риску развития не только КРР, но также и рака желудка, мозга, поджелудочной железы, кожи, эндометрия и яичников. Пациенты с синдромом Линча имеют 50–80 % пожизненного риска развития КРР.[5,19,20] Синдром Линча уникальным образом отличается от других наследственных раковых синдромов, поскольку проведение прямого исследования опухолевой ткани помогает в идентификации пациентов, находящихся в группе риска развития синдрома Линча, и делает последующий генетический анализ зародышевой линии более информативным. Применение расширенных протоколов скрининга онкологических заболеваний имеет благоприятное значение для семей с синдромом Линча.

Различные руководства, в том числе руководства Национальной комплексной сети онкологических учреждений (NCCN), рекомендуют проводить скрининг всех случаев КРР на предмет потенциального наличия синдрома Линча для идентификации пациентов и семей, которые получат пользу от дальнейшего генетического анализа и консультирования.[18,21-24] Использование панели VENTANA MMR IHC Panel будет способствовать определению статуса MMR КРР посредством классификации случаев КРР как имеющих неизмененную или потерянную экспрессию белка MMR. Обнаружение всех четырех белков MMR в опухоли указывает на нормальную или неизмененную функцию системы MMR. Потеря экспрессии MLH1 или MSH2 почти



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

неизменно сопровождается потерей гетеродимерного белка-партнера PMS2 или MSH6 соответственно. Тем не менее, потеря экспрессии PMS2 или MSH6 не приводит к потере экспрессии MLH1 или MSH2. Потеря PMS2, MSH2 и (или) MSH6 соотносится с вероятным синдромом Линча, поэтому пациентов следует направлять на дополнительное тестирование и консультацию согласно клинической практике.

Потеря экспрессии белка MLH1 может указывать на спорадическое возникновение рака или потенциальный синдром Линча. В 15 % или более случаев спорадического КРР потеря экспрессии белка MLH1 происходит ввиду гиперметилирования промотора MLH1.[5,25,26] Важно отметить, что мутация BRAF V600E наблюдается приблизительно в двух третях случаев опухолей, характеризующихся потерей экспрессии MLH1 по причине гиперметилирования промотора MLH1. И напротив, мутация BRAF V600E очень редко наблюдается при опухолях, вызванных синдромом Линча.[25] Таким образом, если результат окрашивания антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-MLH1 (M1)) указывает на потерю экспрессии белка MLH1, антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) может четко определить опухоль как спорадическую или вызванную вероятным синдромом Линча.[5,27] При КРР потеря экспрессии белка MLH1 с положительным статусом BRAF V600E однозначно указывает на то, что опухоль имеет спорадический характер, фактически исключая синдром Линча из списка первопричин возникновения злокачественного новообразования.[17,28] Когда потеря экспрессии белка MLH1 сопровождается отрицательным статусом BRAF V600E, это указывает на высокую вероятность наличия синдрома Линча.[29]

## ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-MSH6 (SP93)) представляет собой кроличье моноклональное антитело против синтетического пептида, соответствующего внутренней области белка MSH6 человека. Антитело VENTANA anti-MSH6 (SP93) связывается с белком MSH6 в фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) срезах ткани. Антитело может быть обнаружено посредством гаптенированного вторичного антитела с последующей обработкой мультимерным конъюгатом HRP (пероксидазы хрена) с антителом к гаптену (OptiView DAB IHC Detection Kit, № по каталогу 760-700 / 06396500001). После этого специфический комплекс антитела и фермента визуализируется путем осаждения продукта ферментативной реакции. Каждый этап процедуры включает инкубацию в течение строго определенного промежутка времени при заданной температуре. В конце каждой инкубации каждый аппарат BenchMark ULTRA, XT и GX промывает срезы, чтобы остановить реакцию и удалить несвязавшиеся вещества, которые могут препятствовать протеканию необходимых реакций на последующих этапах. С помощью данного аппарата также наносится ULTRA LCS (ULTRA LCS (Predilute), № по каталогу 650-210 / 05424534001) или LCS (LCS predilute, № по каталогу 650-010 / 05264839001), который позволяет свести к минимуму испарение водных реагентов с поверхности предметного стекла, содержащего образец.

Помимо окраски антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93), второе предметное стекло следует окрасить кроличьим моноклональным реагентом для отрицательного контроля, Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (№ по каталогу 790-4795 / 06683380001). Реагент для отрицательного контроля используется для оценки фонового окрашивания.

## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

Антитело VENTANA anti-MSH6 (SP93) содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 50 анализов.

Один дозатор антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) объемом 5 мл содержит приблизительно 5 мкг кроличьих моноклональных антител.

Антитела разведены в 0,05 M Трис-HCl с 1% белком-носителем и 0,10% ProClin 300, в качестве консерванта.

Общая концентрация белка в реагенте составляет примерно 10 мг/мл. Концентрация специфических антител составляет около 1 мкг/мл. Неспецифической реактивности антител у данного продукта не обнаружено.

Антитело VENTANA anti-MSH6 (SP93) представляет собой рекомбинантное кроличье моноклональное антитело, полученное в виде очищенного супернатанта клеточной культуры.

См. соответствующую часть листка-вкладыша в упаковке набора для обнаружения VENTANA, чтобы ознакомиться с более подробным описанием: 1) принципов действия; 2) необходимых материалов и реагентов, не входящих в комплект; 3) сбора образцов тканей и подготовки к анализу; 4) процесса контроля качества; 5) принципов поиска и устранения проблем; 6) результатов; 7) общих ограничений.

## НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ МАТЕРИАЛЫ

В комплект поставки не входят красящие реагенты, например наборы для обнаружения VENTANA, а также вспомогательные компоненты, в том числе отрицательные и положительные тканевые контроли.

Для окрашивания требуются следующие реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки.

1. Дополнительные антитела VENTANA MMR IHC Panel:
   - VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№по каталогу 760-5091 / 08033668001)
   - VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№по каталогу 760-5094 / 08033692001)
   - VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№по каталогу 760-5093 / 08033684001)
   - VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№по каталогу 760-5095 / 08033706001)
2. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (№ по каталогу 790-4795 / 06683380001)
3. Предметные стекла для микроскопа (с положительным зарядом)
4. Этикетки со штрих-кодами (соответствующие реагенту для отрицательного контроля и используемому первичному антителу)
5. Ксилол (гистологической степени очистки)
6. Этанол или спиртосодержащий реагент (гистологической степени очистки)
   - 100%-й раствор: неразбавленный этанол или спиртосодержащий реагент.
   - 95%-й раствор: смешать 95 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 5 частями деионизированной воды.
   - 80%-й раствор: смешать 80 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 20 частями деионизированной воды.
7. Деионизированная или дистиллированная вода
8. OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700 / 06396500001)
9. Для VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, OptiView Amplification Kit (№по каталогу 760-099 / 06396518001 или №по каталогу 860-099 / 06718663001)
10. EZ Prep Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-102 / 05279771001)
11. Reaction Buffer Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-300 / 05353955001)
12. ULTRA LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-210 / 05424534001) или LCS (LCS predilute № по каталогу 650-010 / 05264839001)
13. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (№ по каталогу 950-224 / 05424569001) или Cell Conditioning 1 (CC1) № по каталогу 950-124 / 05279801001)
14. Hematoxylin II (№ по каталогу 790-2208 / 05277965001)
15. Bluing Reagent (№ по каталогу 760-2037 / 05266769001)
16. Постоянная гистологическая среда для заливки образцов (Permount Fisher № по каталогу SP15-500 или эквивалентная)
17. Покровное стекло (размера, достаточного для закрытия образцов ткани, например VWR, № по каталогу 48393-060)
18. Автоматический аппарат для заключения под покровное стекло (например, Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
19. Световой микроскоп
20. Гигроскопические салфетки

## ХРАНЕНИЕ

После получения реагента и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживать.

Для обеспечения надлежащей сохранности реагента и стабильности антител после каждого использования необходимо закрывать флакон-дозатор крышкой и сразу ставить его в холодильник в вертикальном положении.



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

На каждом флаконе-дозаторе с раствором антител указан срок годности. При соблюдении условий хранения реагент остается стабильным до даты, указанной на этикетке. Не использовать реагент после истечения срока годности.

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Данное первичное антитело можно применять для окрашивания подготовленных стандартным образом, фиксированных формалином и залитых в парафин тканей, при условии использования OptiView DAB IHC Detection Kit, а также аппаратов серии BenchMark ULTRA, XT и GX.

Необходимо получить срезы толщиной приблизительно 4 мкм и нанести их на положительно заряженные предметные стекла. Для окрашивания следует использовать свежие срезы тканей, поскольку антигенность тканевых срезов со временем может уменьшаться. Одновременно с исследованием неизвестных образцов рекомендуется провести исследование на положительном и отрицательном тканевых контролях.

При использовании панели VENTANA MMR IHC Panel рекомендуется, чтобы ткань в течение 6 часов после иссечения была зафиксирована в 10 % нейтральном забуференном формалине (NBF) на 6–24 часа из расчета окрашивания в миндалинах. Приемлемое окрашивание также достигалось при фиксации цинк-формалином и фиксаторами Z-5 в течение 6–24 часов. С панелью VENTANA MMR IHC Panel не рекомендуется использовать спиртовой раствор формалина (AFA), 95 % этиловый спирт и фиксаторы PREFER, поскольку в этих случаях ткани демонстрируют нестабильные результаты окрашивания или полное их отсутствие.

Используемое количество фиксатора должно составлять от 15 до 20 объемов ткани. За 24 часа фиксатор проникает в плотную ткань не более чем на 2–3 мм, а в пористую ткань — не более чем на 5 мм. Фиксирование следует проводить при комнатной температуре (15–25 °C).[30,31]

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики in vitro (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. Раствор ProClin 300 используется в данном реагенте в качестве консерванта. Он относится к раздражающим средствам и при контакте с кожей может стать причиной сенсибилизации. При работе с реагентом соблюдайте меры предосторожности. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. Используйте защитную одежду и перчатки.
4. Материалы человеческого или животного происхождения следует считать биологически опасными материалами и утилизировать, соблюдая все необходимые меры предосторожности.
5. Избегайте контакта реагентов с глазами и слизистыми оболочками. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды.
6. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.
7. Проконсультируйтесь с местными и (или) государственными органами в отношении рекомендованного способа утилизации.
8. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Антитело VENTANA anti-MSH6 (SP93) предназначено для использования на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX в комбинации с OptiView DAB IHC Detection Kit и вспомогательными реагентами. В таблице 1 приведен протокол окрашивания для применения с антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93). Сведения о влиянии других значений времени и температуры при демаскировке антигена на устойчивость анализа к возникновению ошибок отсутствуют. Поэтому отклонение от рекомендуемых условий для демаскировки антигена, представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными. Следует использовать и документировать надлежащие контроли. Пользователи, которые отклоняются от указанного протокола, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

Параметры автоматических процедур могут быть отображены на экране, напечатаны и отредактированы согласно процедуре, описанной в руководстве пользователя, прилагаемом к соответствующим приборам. Для получения более подробной информации об этапах процедуры иммуногистохимического окрашивания см. листок-вкладыш в упаковке OptiView DAB IHC Detection Kit.

**Таблица** 1. Протокол окрашивания для VENTANA anti-MSH6 (SP93) антитела с применением OptiView DAB IHC Detection Kit на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX.

| **Тип процедуры** | **Метод** | | |
|---|---|---|---|
| | BenchMark ULTRA **Аппарат** | BenchMark XT **Аппарат** | BenchMark GX **Аппарат** |
| **Депарафинирование** | Выбрано | Выбрано | Выбрано |
| **Кондиционирование клеток (демаскирование антигена)** | Cell Conditioning 1, 64 минуты при 100 °C | Cell Conditioning 1, 64 мин | Cell Conditioning 1, 64 мин |
| Pre-Primary Peroxidase Inhibitor | Выбрано | Выбрано | Выбрано |
| **Антитела (первичные)** | 12 минут, 36°C | 12 минут, 37 °C | 12 минут, 37 °C |
| OptiView HQ Linker | 8 мин (по умолчанию) | | |
| OptiView HRP Multimer | 8 мин (по умолчанию) | | |
| **Контрастное окрашивание** | Hematoxylin II, 4 минуты | | |
| **Обработка после контрокрашивания** | Bluing, 4 минуты | | |

Отклонение от рекомендуемых условий (особенно для демаскировки антигена), представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными. Тем не менее, в связи с различиями в фиксации и обработке тканей, а также в лабораторном оборудовании и внешних условиях, может потребоваться увеличение или уменьшение времени инкубации первичных антител в зависимости от отдельных образцов и предпочтений эксперта. Подробную информацию о различиях в методиках фиксации см. в разделе Immunohistochemistry: Principles and Advances (Иммуногистохимический анализ: принципы и достижения).[32]

## ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

### Реагент для отрицательного контроля

Ventana Medical Systems, Inc. настоятельно рекомендует использовать реагент для отрицательного контроля для окрашивания смежного среза образца ткани пациента на отдельном предметном стекле, а не на предметном стекле, где образец был окрашен антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93). Кроличий моноклональный реагент для отрицательного контроля (Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, № 790-4795 / 06683380001) рекомендуется для использования вместо первичного антитела для оценки неспецифического окрашивания. Параметры окрашивания антитела, используемого с реагентом для отрицательного контроля, должны соответствовать параметрам окрашивания первичного антитела.

### Положительный тканевый контроль

При выполнении каждой процедуры окрашивания необходимо проводить положительный тканевый контроль. Оптимальная лабораторная практика — помещение среза для положительного контроля на одно стекло с образцом ткани пациента. Такая практика позволяет распознать случаи, когда первичное антитело или другой важный реагент не оказывают должного эффекта на образец ткани пациента. Для оптимального контроля качества лучше всего подойдет образец ткани, в норме показывающий слабое положительное окрашивание. Положительно окрашиваемые компоненты ткани служат подтверждением того, что антитела нанесены и что прибор работает надлежащим образом. Данная ткань может содержать как положительно, так и отрицательно окрашиваемые клетки или



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

компоненты ткани и использоваться в качестве как положительного, так и отрицательного тканевого контроля. В качестве контроля следует использовать свежие образцы тканей, полученные в ходе вскрытия, биопсии или хирургических операций. Образцы следует как можно скорее подготовить или зафиксировать по процедуре, используемой для исследуемых образцов. С использованием таких образцов должен контролироваться весь процесс исследования, начиная от подготовки ткани и заканчивая окрашиванием. Использование среза ткани, фиксированного или обработанного по процедуре, отличной от процедуры тестируемого образца, позволяет обеспечить контроль всех реагентов и этапов метода, кроме фиксации и обработки ткани.

Заведомо положительные тканевые контроли следует использовать только для контроля правильности работы с обработанными тканями и тестирования реагентов, а не в качестве вспомогательного средства при постановке конкретного диагноза на основании образцов пациента. Если не наблюдается положительного окрашивания положительных тканевых контролей, результаты окрашивания тестовых образцов следует считать неверными.

Ткань КРР, в которой белок MSH6 имеет клинический статус неизменной или нормальной ткани толстой кишки после предварительной обработки антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93), может использоваться в качестве положительного тканевого контроля. Нормальная ткань толстой кишки будет иметь положительный результат окрашивания белка MSH6 с использованием антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93). Положительный тканевый контроль должен демонстрировать однозначное ядерное окрашивание в жизнеспособной опухоли и (или) элементах здоровой ткани толстой кишки. Внутренние клетки положительных контролей (например, лимфоциты, фибробласты или здоровый эпителий вблизи опухоли) для всех тканей должны иметь положительный результат окрашивания в ядре.

### Отрицательный тканевый контроль

Так как белки MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6 экспрессируются во всех тканях, для данных биомаркеров не существует нормального отрицательного тканевого контроля. Однако ткань КРР, в которой белок MSH6 имеет клинический статус как «потерянная», после предварительной обработки антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93), может использоваться в качестве отрицательного тканевого контроля. Отрицательный тканевый контроль следует использовать только для проверки точности характеристик обработанных тканей, исследуемых реагентов и аппаратов, но не для формулировки конкретного диагноза на основании образцов пациента.

### Верификация анализа

Перед начальным использованием антитела или системы окрашивания в диагностической процедуре следует верифицировать специфичность антитела. Для этого выполняется тестирование антитела на серии тканей с известными характеристиками эффективности IHC, представляющими клинический статус MSH6 как в неизмененной ткани. (См. «Процедуры контроля качества», описанные ранее в этом разделе листка-вкладыша, а также рекомендации по контролю качества Программы лабораторной аккредитации коллегии американских патологов (College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program), контрольной карты по патологической анатомии [33] илиCLSI Approved Guideline.[30])

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОКРАШИВАНИЯ/ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Схема клеточного окрашивания для антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) имеет ядерный характер в активно пролиферирующих клетках. Квалифицированный патоморфолог присваивает клинический статус образцам КРР, окрашенным с помощью антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93), на основании собственной оценки наличия или отсутствия специфичного ядерного окрашивания в опухолевой ткани. Клинический статус «Неизмененная» присваивается образцам с однозначным ядерным окрашиванием в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии приемлемых внутренних положительных контролей (ядерное окрашивание в лимфоцитах, фибробластах или здоровом эпителии вблизи опухоли). Клинический статус «Потерянная» присваивается образцам с однозначной потерей ядерного окрашивания или с фокальным слабым неоднозначным ядерным окрашиванием в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии внутренних положительных контролей, как показано в таблице 2.

Если во внутренних положительных контролях однозначное ядерное окрашивание отсутствует и (или) фоновое окрашивание мешает интерпретации, анализ следует считать неприемлемым. При этом необходимо провести анализ повторно. Точечное ядерное окрашивание опухолевых клеток следует считать отрицательным (потерянная экспрессия). В случае с фокальным окрашиванием опухолевых клеток интенсивность ядерного окрашивания по меньшей мере должна быть аналогична интенсивности окрашивания внутренних положительных контролей наряду со сливающимся/непрерывным характером окрашивания ядер в нескольких эпителиальных железах или эпителиальных жемчужинах, чтобы образцу был присвоен клинический статус «Неизмененная». При отсутствии указанных условий образцу присваивается клинический статус «Потерянная».

**Таблица** 2. Интерпретация окрашивания для антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93)

| Клинический статус | Описание |
|---|---|
| **Неизмененная экспрессия** MSH6 | Однозначное ядерное окрашивание в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии внутренних положительных контролей (ядерное окрашивание в лимфоцитах, фибробластах или здоровом эпителии толстой кишки вблизи опухоли). |
| **Потерянная экспрессия** MSH6 | Однозначная потеря ядерного окрашивания или фокальное слабое неоднозначное ядерное окрашивание в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии внутренних положительных контролей. |

Образцы, окрашенные антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93), классифицируются как «Неизмененная» или «Потерянная» в зависимости от наличия или отсутствия специфического окрашивания в опухолевой ткани.

## ОСОБЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

Антитела и реагенты компании Ventana Medical Systems, Inc. имеют оптимальную концентрацию для применения в соответствии с прилагающейся инструкцией. Отклонение от рекомендуемых условий для демаскировки антигена, представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными. Следует использовать и документировать надлежащие контроли. Пользователи, которые отклоняются от указанного протокола, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

При использовании панели VENTANA MMR IHC Panel рекомендуется, чтобы образцы ткани были зафиксированы в 10 % нейтральном забуференном формалине на 6–24 часа в течение 6 часов после иссечения. Приемлемое окрашивание наблюдается после фиксации цинк-формалином и фиксатором Z-5 в течение 6–24 часов. Не рекомендуется фиксировать ткани в 95 % спирте, спиртовом растворе формалина с уксусной кислотой (AFA) или фиксаторах PREFER.

Анализ некоторых образцов может быть особенно сложным в связи со следующими проблемами:

- Неспецифическое фоновое окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать неспецифическое фоновое окрашивание по недостаточно понятным причинам. По этой причине оценка предметного стекла с антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93) должна включать в себя сравнение предметного стекла с срезом ткани, окрашенным реагентом для отрицательного контроля для определения уровня неспецифичного фонового окрашивания. Цитоплазматическое окрашивание (при наличии) должно игнорироваться при IHC интерпретации результатов окрашивания антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93).
- Фокальное окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать фокальное окрашивание в опухолевых клетках; интенсивность окрашивания может варьировать от слабой до сильной. На основании IHC алгоритма оценивания антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93), фокальное слабое неоднозначное ядерное окрашивание в жизнеспособных опухолевых клетках в присутствии внутренних положительных контролей должно квалифицироваться как «потерянная». Окрашивание может варьироваться в зависимости от уровня интенсивности, которая, в свою очередь, может варьироваться в зависимости от опухоли; однако интенсивность не влияет на клинический статус MSH6.
- Точечное окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать дискретное точечное окрашивание в нескольких ядрах опухоли; интенсивность окрашивания может варьировать от слабой до сильной. Такой характер окрашивания следует игнорировать, и если образец имеет только этот тип



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

характера окрашивания, ему следует присвоить клинический статус «Потерянная».

- Тканевые артефакты или артефакты, вызванные окрашиванием. Гистологические артефакты, возникающие в ходе обработки образцов и микротомии, также могут осложнить определение IHC клинического статуса антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93). К таким артефактам относятся, кроме прочего, градиенты фиксации и краевые эффекты, захват DAB, образование пузырьков в ядре, недостаточное окрашивание на некоторых участках ткани, разрыв или складки ткани и потеря среза ткани. В некоторых случаях может потребоваться повторное окрашивание новых срезов или получение нового образца.

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИТЕЛА VENTANA ANTI-MSH6 (SP93)

### Аналитическая специфичность/чувствительность

Аналитическая специфичность и чувствительность были определены посредством окрашивания множественных образцов нормальных и опухолевых тканей человека антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93). Результаты приведены в Таблица 3 и Таблице 4. Положительное окрашивание является ядерным, если не указано иное. В результате окрашивания нормальных и опухолевых тканей антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93) непредвиденных результатов получено не было. Как и ожидалось, поскольку репарация неспаренных оснований присутствует во всех активно пролиферирующих клетках, большинство здоровых и опухолевых тканей продемонстрировали положительное окрашивание.

**Таблица** 3. Аналитическая специфичность/чувствительность окрашивания FFPE нормальных тканей антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93)

| Ткань | Кол-во положительных случаев/ общее кол-во случаев | Ткань | Кол-во положительных случаев/ общее кол-во случаев |
|---|---|---|---|
| Надпочечник | 3/3 | Легкое | 4/4 |
| Мочевой пузырь | 3/3 | Лимфоузлы | 3/3 |
| Костный мозг | 3/3 | Мезотелий | 3/3 |
| Яичник | 5/5 | Поджелудочная железа | 3/3 |
| Молочная железа | 3/3 | Паращитовидная железа | 3/3 |
| Мозжечок | 3/3 | Периферический нерв | 5/5 |
| Головной мозг | 3/3 | Простата | 3/3 |
| Шейка матки | 3/3 | Скелетная мышца | 3/3 |
| Толстая кишка | 3/3 | Кожа | 3/3 |
| Эндометрий | 2/3 | Селезенка | 3/3 |
| Пищевод | 3/3 | Желудок | 3/3 |
| Сердце | 3/3 | Яичко | 3/3 |
| Гипофиз | 3/3 | Тимус | 3/3 |
| Стенка кишечника | 3/3 | Щитовидная железа | 4/4 |
| Почка | 3/3 | Язык/слюнная железа | 3/3 |
| Печень | 3/3 | Миндалины | 3/3 |

Примечание. Белки репарации неспаренных оснований, такие как MSH6, присутствуют во всех клетках с активной пролиферацией. Для всех тканей положительное/отрицательное окрашивание определялось для тканеспецифичных элементов при наличии положительного окрашивания в здоровых контрольных клетках (лимфоцитах, фибробластах и эпителиальных клетках).

**Таблица** 4. Аналитическая специфичность/чувствительность окрашивания различных FFPE опухолевых тканей антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93)

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Глиобластома (головной мозг) | 1/1 |
| Менингиома (головной мозг) | 1/1 |
| Эпендимома (головной мозг) | 1/1 |
| Олигодендроглиома (головной мозг) | 1/1 |
| Серозная аденокарцинома (яичник) | 1/1 |
| Аденокарцинома (яичник) | 1/1 |
| Панкреато-нейроэндокринное новообразование (поджелудочная железа) | 1/1 |
| Семинома (яичко) | 2/2 |
| Медуллярная карцинома (щитовидная железа) | 1/1 |
| Папиллярная карцинома (щитовидная железа) | 1/1 |
| Протоковая карцинома in situ (молочная железа) | 1/1 |
| Микроинвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 1/1 |
| Инвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 1/1 |
| В-клеточная лимфома, неуточненная (селезенка) | 1/1 |
| Мелкоклеточная карцинома (легкое) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (легкое) | 1/1 |
| Аденокарцинома (легкое) | 1/1 |
| Нейроэндокринная карцинома (пищевод) | 1/1 |
| Аденокарцинома (пищевод) | 1/1 |
| Перстневидноклеточная карцинома (желудок) | 1/1 |
| Аденокарцинома (тонкая кишка) | 1/1 |
| Стромальная саркома (тонкая кишка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (толстая кишка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (прямая кишка) | 1/1 |
| Гастроинтестинальная стромальная опухоль (GIST) (прямая кишка) | 1/1 |
| Гепатоцеллюлярная карцинома (печень) | 1/1 |
| Гепатобластома (печень) | 1/1 |
| Светлоклеточная карцинома (почка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (предстательная железа) | 2/2 |
| Аденокарцинома (матка) | 1/1 |



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

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Светлоклеточная карцинома (эндометрий) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (шейка матки) | 2/2 |
| Эмбриональная рабдомиосаркома (поперечно-полосатая мускулатура) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (кожа) | 1/1 |
| Нейробластома (забрюшинное пространство) | 1/1 |
| Мезотелиома (брюшина) | 1/1 |
| В-клеточная лимфома, неуточненная (лимфатический узел) | 2/2 |
| Лимфома Ходжкина (Hodgkin) (лимфатический узел) | 1/1 |
| Диффузная анапластическая крупноклеточная лимфома | 1/1 |
| Лейомиосаркома (мочевой пузырь) | 1/1 |
| Остеосаркома | 1/1 |
| Веретеноклеточная рабдомиосаркома (брюшина) | 1/1 |
| Лейомиосаркома (гладкая мускулатура) | 1/1 |

Примечание. Белки репарации неспаренных оснований, такие как MSH6, присутствуют во всех клетках с активной пролиферацией. Для всех тканей положительное/отрицательное окрашивание определялось для опухолевых клеток при наличии положительного окрашивания в здоровых контрольных клетках (лимфоцитах, фибробластах и эпителиальных клетках).

### Внутрисуточная повторяемость и межсуточная прецизионность

Повторяемость и прецизионность окрашивания антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93) оценивались на аппарате BenchMark ULTRA в сочетании с OptiView DAB IHC Detection Kit.

Внутрисуточная повторяемость оценивалась с использованием 10 образцов КРР (5 с неизмененной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией MSH6). Пять реплицированных предметных стекол каждого из образцов КРР окрашивались антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93) на одном аппарате BenchMark ULTRA в один день. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93) предметное стекло объединялось с реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им статус «Неизмененная» или «Потерянная».

Межсуточная прецизионность также оценивалась с использованием 10 образцов КРР (5 с неизмененной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией MSH6). Реплицированные предметные стекла каждого из образцов КРР окрашивались антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93) на аппарате BenchMark ULTRA в каждый из 5 непоследовательных дней. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93) предметное стекло объединялось с реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им статус «Неизмененная» или «Потерянная».

Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5. На основании объединенных данных всех возможных парных сочетаний исследования внутрисуточной повторяемости и межсуточной прецизионности продемонстрировали 100%-е совпадение положительных результатов (PPA), 100%-е совпадение отрицательных результатов (NPA) и общее 100%-е совпадение результатов (OPA). Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 5.

**Таблица** 5. Внутрисуточная повторяемость и межсуточная прецизионность окрашивания антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93), согласно выявленному клиническому статусу (неизмененная или потерянная)

| Повторяемость/Точность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Внутрисуточная повторяемость | Неизмененная | PPA | 25/25 | 100,0. | (86,7; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 25/25 | 100,0. | (86,7; 100,0) |
| | Всего | OPA | 50/50 | 100,0. | (92,9; 100,0) |
| Межсуточная прецизионность | Неизмененная | PPA | 50/50 | 100,0. | (92,9; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 50/50 | 100,0. | (92,9; 100,0) |
| | Всего | OPA | 100/100 | 100,0. | (96,3; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

### Прецизионность между разными аппаратами BenchMark

Прецизионность между разными аппаратами BenchMark ULTRA для антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) определялась методом окрашивания реплицированных предметных стекол с 10 образцами КРР (5 с неизмененной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией MSH6) на 3 аппаратах BenchMark ULTRA с применением антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) и использованием OptiView DAB IHC Detection Kit. Реплицированные предметные стекла каждого из образцов КРР окрашивались антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93) на 3 аппаратах BenchMark ULTRA.

Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел оценку их клинического статуса («Неизмененная» или «Потерянная»). Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5.

При определении прецизионности между разными аппаратами BenchMark ULTRA был проведен сравнительный анализ пар клинического статуса предметных стекол для каждого образца между аппаратами и продемонстрированными 100% PPA, NPA и OPA. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 6.

**Таблица** 6. Прецизионность между разными аппаратами BenchMark ULTRA для антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93), согласно выявленному клиническому статусу (неизмененная или потерянная)

| Точность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Между разными аппаратами | Неизмененная | PPA | 30/30 | 100,0. | (88,6; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 30/30 | 100,0. | (88,6; 100,0) |
| | Всего | OPA | 60/60 | 100,0. | (94,0; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

Кроме того, прецизионность между разными аппаратами для антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) определялась методом окрашивания реплицированных



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

предметных стекол с 6 образцами КРР (4 с неизмененной экспрессией и 2 с потерянной экспрессией MSH6) на 3 аппаратах BenchMark XT и 3 аппаратах BenchMark GX с применением антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) и использованием OptiView DAB IHC Detection Kit.

Было проведено 15 наблюдений на каждый образец при объединении 3 аппаратов; медиана для каждого образца определялась по этим 15 наблюдениям. Индивидуальные наблюдения одного и того же образца считались согласующимися с медианной интенсивностью сигнала образца, если их интенсивность находилась в пределах 0,5. При определении прецизионности между аппаратами BenchMark XT и BenchMark GX для каждого образца был выполнен сравнительный анализ пар по уровню интенсивности окрашивания опухолевой ткани. Результаты были следующими: 100 % OPA между 3 аппаратами BenchMark XT и 100 % OPA между 3 аппаратами BenchMark GX. Для всех предметных стекол уровень фонового окрашивания был приемлемым (≤ 0,5) как на аппаратах BenchMark XT, так и на аппаратах GX.

### Конкордантность платформы BenchMark

Конкордантность между аппаратами BenchMark ULTRA, XT и GX для антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) была определена методом окрашивания образцов КРР антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93) с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit. Клинический статус всех предметных стекол (неизмененная/потерянная) оценивался одним и тем же патоморфологом.

Между платформами было проведено парное сравнение образцов КРР, в том числе сравнение GX с ULTRA (134 образцов с неизмененной экспрессией и 20 с потерянной экспрессией); сравнение GX с XT (133 образца с неизмененной экспрессией и 21 с потерянной экспрессией); и сравнение ULTRA с XT (136 образцов с неизмененной экспрессией и 20 с потерянной экспрессией). Все парные сравнения, выполненные между платформами, продемонстрировали 100%-е среднее совпадение положительных результатов (APA), среднее совпадение отрицательных результатов (ANA) и OPA.

### Исследования прецизионности оценок эксперта

Прецизионность по каждому эксперту и между экспертами оценивалась по 20 образцам КРР (11 с неизмененной экспрессией и 9 с потерянной экспрессией), окрашенным антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93) и OptiView DAB IHC Detection Kit. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца.

Все пары предметных стекол были рандомизированы и оценивались 3 патоморфологами на предмет клинического статуса MSH6 «неизмененная» или «потерянная». Патоморфологам был неизвестен диагноз образцов. После четырехнедельного отмывочного периода окрашенные антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93) предметные стекла были повторно рандомизированы для проведения второй оценки клинического статуса MSH6 каждым из 3 патоморфологов. Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5.

Для определения прецинзионности по каждому эксперту сравнивали исходную и итоговую оценки слайда, полученные от одного и того же патоморфолога. Всего было выполнено сравнение 20 предметных стекол с срезом КРР на каждого патоморфолога. Сравнения 3 патоморфологов были объединены и продемонстрировали 98,5% APA, 98,1% ANA и 98,3% OPA для прецизионности по каждому эксперту. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 7.

Для определения прецизионности между экспертами сравнивали все оценки предметных стекол (20 КРР x 2 оценки/образец x 3 патоморфолога = 120 оценок предметных стекол) со статусом модального образца для каждого образца КРР. Результаты демонстрируют 100 % PPA, 98,1 % NPA и 99,2 % OPA для прецизионности между экспертами. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 7.

**Таблица** 7. Прецизионность по каждому эксперту и между экспертами антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) для образцов КРР, согласно выявленному клиническому статусу MSH6 (неизмененная/потерянная)

| Точность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| По каждому эксперту | Неизмененная | APA | 66/67 | 98,5. | (88,0; 100,0) |
| | Потерянная | ANA | 52/53 | 98,1. | (83,3; 100,0) |
| | Всего | OPA | 59/60 | 98,3. | (85,0; 100,0) |
| Между экспертами | Неизмененная | PPA | 66/66 | 100,0. | (94,5; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 53/54 | 98,1. | (90,2, 99,7) |
| | Всего | OPA | 119/120 | 99,2. | (95,4, 99,9) |

Примечание. Для оценки по каждому эксперту 95% доверительные интервалы для APA и ANA были рассчитаны по методу Клоппера-Пирсона; 95% доверительный интервал для OPA 95% CI был рассчитан по методу бутстреп. Для оценки между экспертами 95% доверительные интервалы были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

### Прецизионность между партиями

Прецизионность между партиями антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) была определена методом анализа 3 производственных партий антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93), каждая с использованием строенных предметных стекол из 10 образцов КРР (5 с неизмененной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией MSH6) на аппарате BenchMark ULTRA с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit.

Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Пары предметных стекол были рандомизированы, а затем их оценку провел один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов и номер партии антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93). Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5.

При определении прецизионности между партиями антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) все оценки предметных стекол сравнивались со статусом модального образца для каждого образца КРР. Показатель OPA между партиями антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) составил 100 %, продемонстрировав, что окрашивание антителом VENTANA anti-MSH6 (SP93) является воспроизводимым между партиями антитела.

Сводные данные полученных результатов для анализа прецизионности между партиями антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) приведены в таблице 8.

**Таблица** 8. Прецизионность между партиями антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93), согласно выявленному клиническому статусу (неизмененная или потерянная)

| Точность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Между партиями | Неизмененная | PPA | 45/45 | 100,0. | (92,1; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 45/45 | 100,0. | (92,1; 100,0) |
| | Всего | OPA | 90/90 | 100,0. | (95,9; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.



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

### Исследование воспроизводимости результата между лабораториями

Исследование воспроизводимости результата между лабораториями для панели VENTANA MMR IHC Panel было проведено для демонстрации воспроизводимости каждого анализа панели VENTANA MMR IHC Panel для определения клинического статуса. В исследование было включено 6 образцов ткани КРР (3 с неизмененной экспрессией и 3 с потерянной экспрессией) для каждого белка MMR и 16 образцов ткани КРР (8 положительных и 8 отрицательных) для определения BRAF V600E. Циклы проводились на 3 аппаратах BenchMark ULTRA в каждый из 5 непоследовательных дней за 21-дневный период в трех независимых лабораториях. Каждое окрашенное антителом предметное стекло объединялось с H&E и предметными стеклами, окрашенными реагентом для отрицательного контроля, из того же образца. Все наборы предметных стекол были рандомизированы и оценены в общей сложности 6 экспертами (по 2 в каждом исследовательском центре), которые не знали заранее, каков клинический статус MMR в образцах набора исследования. Для каждого из 40 образцов в исследовании было проведено 30 наблюдений по всем дням, исследовательским центрам и экспертам. Эталонный статус модального образца был получен для каждого образца на основании наиболее часто наблюдаемого статуса в 30 наблюдениях. Всего в исследовании было проведено 1200 наблюдений для всех пяти белков. Для всех оцениваемых образцов уровень приемлемости в отношении морфологических структур и фона в данном исследовании составил 100 %. Сводные данные по объединенным (для всех пяти белков) статистическим показателям совпадений между эталонным статусом модального образца и индивидуальными наблюдениями приведены в таблице 9.

**Таблица** 9. Совпадения между панелью VENTANA MMR IHC Panel и эталонным статусом модального образца

| Межлабораторная повторяемость | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Все белки | Неизмененная/положительный | PPA | 598/600 | 99,8. | (98,7; 100,0) |
| | Потерянная/отрицательный | NPA | 593/600 | 98,9. | (97,4; 99,5) |
| | Всего | OPA | 1191/1200 | 99,4. | (98,6; 99,7) |

Примечание. Клинический статус определяется как «Неизмененная» или «Потерянная» для экспрессии белка MMR и «Положительный» или «Отрицательный» для белка BRAF V600E Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием подхода на основе обобщенной оценочной модели со смешанными эффектами (GLMM).

Кроме того, для антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) были проведены парные сравнения между исследовательскими центрами, показателями между экспертами и межэкспертными показателями. Для MSH6 этот набор исследований включал в общем 180 наблюдений. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 10. Данные обозначают повторяемость анализа по 5 дням, 3 исследовательским центрам и 6 экспертам.

**Таблица** 10. Показатели парных совпадений межлабораторной воспроизводимости для антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93), согласно выявленному клиническому статусу (неизмененная или потерянная)

| Межлабораторная повторяемость | | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Между исследовательскими центрами (3 исследовательских центра) | | APA | 360/364 | 98,9. | (96,8; 100,0) |
| | | ANA | 352/356 | 98,9. | (96,6; 100,0) |
| | | OPA | 356/360 | 98,9. | (96,7; 100,0) |
| | Лаборатория A | APA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | | ANA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| Межсуточная (5 непоследовательных дней) | | OPA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | Лаборатория B | APA | 120/124 | 96,8. | (90,9; 100,0) |
| | | ANA | 112/116 | 96,6. | (88,9; 100,0) |
| | | OPA | 116/120 | 96,7. | (90,0; 100,0) |
| | Лаборатория C | APA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | | ANA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | | OPA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| Между экспертами (2 патоморфолога на исследовательский центр) | | APA | 90/91 | 98,9. | (96,8; 100,0) |
| | | ANA | 88/89 | 98,9. | (96,6; 100,0) |
| | | OPA | 89/90 | 98,9. | (96,7; 100,0) |

Примечание. Значения 95 % доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп; в случаях, где показатель точечной оценки составлял 100 %, использовался метод оценки Уилсона.

### Исследование точности: сравнение метода получения результатов с использованием панели VENTANA MMR IHC Panel и молекулярного тестирования (секвенирование ДНК и гиперметилирование промотора MLH1)

Исследование было проведено для сравнения эффективности использования панели VENTANA MMR IHC Panel и молекулярного тестирования, в том числе комплексной панели образцов тканей толстой кишки для секвенирования ДНК с целью идентификации КРР, который (i) характеризуется дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR) и (ii) содержит мутацию BRAF V600E. Панель образцов тканей толстой кишки для секвенирования ДНК включала геномный анализ вариаций, присутствующих в генах MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, EPCAM), BRAF и других генах, играющих важное значение при канцерогенезе (например PIK3CA, KRAS, NRAS, ERBB2 и т. д.). Секвенирование включало все экзоны, интронные и фланкирующие последовательности, а также значимые делеции, дупликации и мозаицизм.

Для исследования последовательности образцов КРР окрашивались H&E (гематоксилином и эозином) и оценивались на предмет надлежащей фиксации и морфологии, включая наличие клеточных элементов (опухоль и клетки внутренних контролей). Каждый образец оценивали, чтобы определить, состоит ли образец из опухолевых клеток как минимум на 50 %. Такая оценка была проведена для обеспечения достаточного количества опухолевых клеток в образце согласно рекомендациям для проведения молекулярного тестирования. После оценки в исследование было включено 105 образцов, соответствующих этим критериям. Кроме того, были включены 13 образцов КРР, демонстрирующих клинический статус «Потерянная» при исследовании методом IHC, чтобы гарантировать, что потеря экспрессии каждого маркера будет отражена в исследовании. Срезы всех образцов исследования были окрашены методом IHC с использованием панели VENTANA MMR IHC Panel и соответствующих реагентов для отрицательного контроля. Дополнительные срезы были обработаны с помощью панели образцов ткани толстой кишки для секвенирования ДНК. Гиперметилирование промотора MLH1 — один из механизмов, который может привести к потере экспрессии белка MLH1, и его связывают со спорадическим КРР, а не с потенциальным синдромом Линча. Поэтому все образцы с потерей экспрессии MLH1, идентифицированные методом IHC при проведении исследования, были проанализированы на предмет гиперметилирования промотора MLH1.

С окончательным набором исследования, состоящим из 118 образцов, в анализ были включены показатели PPA и NPA для всех объединенных маркеров (т. е. все объединенные наблюдаемые значения), при этом молекулярное тестирование выступало в качестве эталона для сравнения IHC. Анализ включал в себя сравнение



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

статуса белка MMR (неизмененная/потерянная) с молекулярным статусом, определенным как «нормальный» (нет патогенных мутаций, отрицателен в отношении гиперметилирования промотора MLH1 и BRAF дикого типа (отсутствие мутации V600E)) или «аномальный» (наличие патогенных мутаций, положителен в отношении гиперметилирования промотора MLH1 и (или) положителен в отношении мутации BRAF V600E). В этом исследовании патогенная мутация в опухоли определяется как герминативная или соматическая мутация, которая, согласно прогнозу, приводит к потере экспрессии белка MMR. Показатели точечной оценки составили 99,4 % PPA, 93,5 % NPA и 98,8 % OPA, как показано в таблице 11.

Также был проведен сводный анализ для сравнения четырех IHC маркеров MMR (без антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) с результатами молекулярного тестирования. Показатели точечной оценки составили 99,3 % PPA, 89,7 % NPA и 98,5 % OPA, как показано в таблице 12.

В рамках дополнительного анализа сравнили результаты исследования методом IHC для четырех маркеров MMR с результатами молекулярного тестирования генов MMR на уровне одного образца, чтобы включить в исследование статус всех маркеров и получить результат dMMR/pMMR при использовании двух методов. Результаты данного анализа представлены в таблице 13, OPA при применении двух методов составляет 97,4 %.

В рамках исследования было выполнено сравнение статуса MMR при исследовании методом IHC и статуса молекулярного тестирования генов MMR для отдельных маркеров MMR. Показатель OPA для каждого маркера MMR при сравнении с объединенными результатами панели образцов ткани толстой кишки для секвенирования ДНК и анализа гиперметилирования промотора MLH1 составлял 100,0 % для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), 99,1 % для VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, 98,3 % для VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody и 96,6 % для антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

Клинический статус BRAF V600E в образцах КРР, полученных методом IHC с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), также сравнивался с результатами оценки мутационного статуса BRAF, определенными с помощью секвенирования ДНК. Показатели PPA, NPA и OPA IHC тестирования с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и применением метода секвенирования ДНК в качестве эталона составили 100 % (таблица 14). Было проведено дополнительное тестирование для подтверждения способности антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) к четкому определению образцов КРР, демонстрирующих потерю экспрессии белка MLH1. Из 23 образцов, положительных в отношении BRAF V600E, в 20 методом IHC была выявлена потеря экспрессии белка MLH1, и они были положительны в отношении гиперметилирования промотора MLH1. Эти данные указывают на тесную связь положительного статуса BRAF V600E и статуса гиперметилирования промотора MLH1. Оставшиеся образцы представляли собой образцы с pMMR (неизмененная экспрессия для всех белков MMR). Все образцы, положительные на BRAF V600E, идентифицировали как образцы со спорадическим КРР. Результаты подтвердили, что антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) правильно идентифицирует образцы КРР, имеющие мутацию BRAF V600E. Также данные подтвердили возможность использования антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) для дифференциации спорадического КРР и вероятного синдрома Линча при отсутствии экспрессии белка MLH1.

**Таблица** 11. Совокупный анализ для совпадений панели VENTANA MMR IHC Panel между IHC и молекулярным тестированием

| **Статус*** (**Молекулярное тестирование**/IHC) | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| Нормальный/неизменная | PPA | 523/526 | 99,4. | (98,7; 100,0) |
| Аномальный/потерянная | NPA | 58/62 | 93,5. | (87,1; 98,6) |
| Всего | OPA | 581/588 | 98,8. | (98,0; 99,7) |

* При использовании метода IHC статус экспрессии белка системы MMR — неизмененная или потерянная. Для этого анализа отрицательные и положительные на BRAF V600E образцы были включены в категории «Неизмененная» или «Потерянная» соответственно. Молекулярное тестирование указывает на отсутствие (нормальный) или присутствие (аномальный) потенциальных патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп.

**Таблица** 12. Совокупный анализ совпадений четырех IHC маркеров MMR (без антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) между IHC и молекулярным тестированием

| **Статус*** (**Молекулярное тестирование**/IHC) | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| Нормальный/неизменная | PPA | 428/431 | 99,3. | (98,4; 100,0) |
| Аномальный/потерянная | NPA | 35/39 | 89,7. | (79,4; 97,7) |
| Всего | OPA | 463/470 | 98,5. | (97,3; 99,6) |

* При использовании метода IHC статус экспрессии белка — неизмененная или потерянная. Молекулярное тестирование указывает на отсутствие (нормальный) или присутствие (аномальный) потенциальных патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп.

**Таблица** 13. Совпадения четырех маркеров MMR при исследовании методом IHC и результатов молекулярного тестирования для определения статуса MMR (dMMR/pMMR)

| **Статус** MMR* | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| pMMR | PPA | 79/80 | 98,8. | (93,3; 99,8) |
| dMMR | NPA | 35/37 | 94,6. | (82,3; 98,5) |
| Всего | OPA | 114/117 | 97,4. | (92,7; 99,1) |

* При использовании метода IHC статус pMMR образца формулируется как «Неизмененная» для всех MMR-белков, в то время как при статусе dMMR наблюдается потеря экспрессии одного или нескольких MMR-белков. В рамках молекулярного тестирования статус pMMR представляет собой отсутствие патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1, в то время как статус dMMR представляет собой наличие патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

**Таблица** 14. Совпадения между методом IHC с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и молекулярным тестированием

| BRAF V600E **Статус** (**Молекулярное тестирование**/IHC) | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| Положительный/аномальный | PPA | 23/23 | 100,0. | (85,7; 100,0) |
| Отрицательный/нормальный | NPA | 95/95 | 100,0. | (96,1; 100,0) |
| Всего | OPA | 118/118 | 100,0. | (96,8; 100,0) |

Статус для BRAF V600E был определен как «положительный» или «отрицательный» по результатам IHC и «аномальный» (присутствие мутации V600E) или «нормальный» (BRAF дикого типа) по результатам молекулярного тестирования. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.



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

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ


1. Yuan L, Chi Y, Chen W, Chen X, Wei P, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. Int J Clin Exp Med. 2015;8(11):20988-21000.
2. Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. Arch Pathol Lab Med. 2011;135(10):1269-1277.
3. Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. Am J Surg Pathol. 2003;27(11):1393-1406.
4. Tiwari AK, Roy HK, Lynch HT. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. QJM. 2016;109(3):151-158.
5. Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. Expert Rev Mol Diagn. 2016;16(5):591-604.
6. Silva FCC, Torrezan GT, Ferreira JRO, Oliveira LP, Begnami M, et al. Germline Mutations in MLH1 Leading to Isolated Loss of PMS2 Expression in Lynch Syndrome: Implications for Diagnostics in the Clinic. Am J Surg Pathol. 2017;41(6):861-864.
7. Boyer JC, Umar A, Risinger JI, Lipford JR, Kane M, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. Cancer Res. 1995;55(24):6063-6070.
8. Lawes DA, Pearson T, Sengupta S, Boulos PB. The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. Br J Cancer. 2005;93(4):472-477.
9. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med. 2003;348(10):919-932.
10. Peltomaki P. Role of ДНК mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. J Clin Oncol. 2003;21(6):1174-1179.
11. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. Cancer. 1996;78(6):1149-1167.
12. Caldes T, Godino J, Sanchez A, Corbacho C, De la Hoya M, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. Oncol Rep. 2004;12(3):621-629.
13. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, et al. Value of immunohistochemical detection of ДНК mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. Am J Surg Pathol. 2005;29(1):96-104.
14. Cunningham JM, Tester DJ, Thibodeau SN. Mutation detection in colorectal cancers : direct sequencing of ДНК mismatch repair genes. Methods Mol Med. 2001;50:87-98.
15. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. J Med Genet. 2004;41(9):664-668.
16. Jin M, Hampel H, Zhou X, Schunemann L, Yearsley M, et al. BRAF V600E mutation analysis simplifies the testing algorithm for Lynch syndrome. Am J Clin Pathol. 2013;140(2):177-183.
17. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2004;10(1 Pt 1):191-195.
18. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, et al. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. Diseases of the Colon & Rectum. 2014;57(8):1025-1048.
19. Egoavil C, Alenda C, Castillejo A, Paya A, Peiro G, et al. Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers. PLoS One. 2013;8(11):e79737.
20. Connell LC, Mota JM, Braghiroli MI, Hoff PM. The Rising Incidence of Younger Patients With Colorectal Cancer: Questions About Screening, Biology, and Treatment. Curr Treat Options Oncol. 2017;18(4):23.
21. Provenzale D, Gupta S, Ahnen DJ, Bray T, Cannon JA, et al. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2016;14(8):1010-1030.
22. Balmana J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D, Group EGW. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. Ann Oncol. 2013;24 Suppl 6:vi73-80.
23. Evaluation of Genomic Applications in P, Prevention Working G. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. Genet Med. 2009;11(1):35-41.
24. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst. 2004;96(4):261-268.
25. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. J Med Genet. 2012;49(3):151-157.
26. Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting ДНК mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. Semin Diagn Pathol. 2015;32(5):352-361.
27. Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, Gylling A, Lahtinen L, et al. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. Virchows Arch. 2013;463(5):613-621.
28. Toon CW, Chou A, DeSilva K, Chan J, Patterson J, et al. BRAFV600E immunohistochemistry in conjunction with mismatch repair status predicts survival in patients with colorectal cancer. Mod Pathol. 2014;27(5):644-650.
29. Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. Int J Cancer. 2004;108(2):237-242.
30. Carson FL, Hladik C, Cappellano CH, Pathology ASfC. Histotechnology: A Self-Instructional Text: American Society for Clinical Pathology; 2015.
31. CSLI. Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
32. Roche PC, Hsi ED, Firfer BL. Immunohistochemistry: Principles and Advances. Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology, 7th Edition: American Society of Microbiology; 2006.
33. Rabinovitch A. The College of American Pathologists laboratory accreditation program. Accreditation and Quality Assurance. 2002;7(11):473-476.


## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ


VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW и логотип VENTANA являются товарными знаками Roche.

Все остальные товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

© 2019 Ventana Medical Systems, Inc. и Roche Diagnostics International, Inc.


## КОНТАКТЫ


Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.

www.ventana.com





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

# VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody

Для использования с панелью VENTANA MMR IHC Panel

REF 760-5093

08033684001

IVD Σ 50

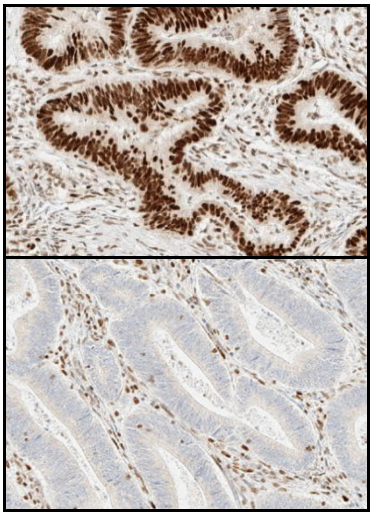


**Рисунок** 1. **Окрашивание антителом** VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody **с неизмененной экспрессией (сверху) или потерянной экспрессией (снизу) в раковой ткани толстой кишки**

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-MSH2 (G219-1129)) предназначено для качественногообнаружения белка MSH2 в фиксированных формалином и залитых в парафин срезах ткани. Антитело VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) готово к применению на аппаратах серии BenchMark ULTRA, XT и GX с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit и вспомогательных реагентов.

Антитело VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) является частью панели VENTANA MMR IHC Panel, в состав которой входят VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody и VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody. Панель VENTANA MMR IHC Panel предназначена для обнаружения недостатка белка, участвующего в репарации неспаренных оснований ДНК, в качестве теста для идентификации лиц, находящихся под угрозой развития синдрома Линча, среди пациентов, которым диагностирован колоректальный рак (КРР), а также у которых выявлена мутация V600E в гене BRAF, в качестве вспомогательного средства для различения спорадического КРР и вероятного синдрома Линча в условиях отсутствия экспрессии белка MLH1.

Результаты анализов, выполненных с использованием данных продуктов, должны интерпретироваться квалифицированным патоморфологом с учетом результатов гистологического исследования, клинической картины и соответствующих контролей.

Предназначено для диагностики in vitro (IVD).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

Колоректальный рак является третьим наиболее распространенным видом рака и четвертой по распространенности причиной смерти в мире.[1] В большинстве случаев КРР наблюдается хромосомная нестабильность, однако примерно в 15 % случаев рак развивается по альтернативному пути, характеризуемому дефектом функции системы репарации неспаренных оснований ДНК (MMR). Вследствие дефекта функции репарации неспаренных оснований (MMR) в опухолях наблюдается микросателлитная нестабильность (MSI), обусловленная неспособностью белков-репараторов (белки MMR) устранять ошибки репликации ДНК.

КРР с дефектами системы MMR обозначается как опухоль с дефицитом белков MMR (dMMR). И наоборот, КРР без дефектов системы MMR обозначается как опухоль с избытком белков MMR (pMMR). Колоректальный рак с дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR) в большинстве случаев имеет низкую дифференцировку и часто демонстрирует гистологические признаки преобладания в проксимальном отделе толстой кишки, а также муцинозного, медуллярного или перстневидноклеточного рака. Кроме того, он характеризуется увеличением числа лимфоцитов, инфильтрующих опухоли.[2,3] В общем, дефицит репарации неспаренных оснований может быть вызван мутациями зародышевой линии в одном из генов MMR с последующей утратой соответствующей нормальной аллели посредством генетических или эпигенетических механизмов, соматическими мутациями в аллелях или эпигенетической инактивацией белка MLH1 посредством метилирования.[4]

Наиболее часто мутациям подвержены следующие четыре гена MMR: MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6. В нормальных клетках белок MLH1 формирует комплекс (гетеродимер) с белком PMS2, в то время как белок MSH2 формирует комплекс с белком MSH6.[5,6] При возникновении неспаренных оснований ДНК гетеродимер MSH2/MSH6 связывается с неспаренным основанием ДНК, провоцируя конформационное изменение. Гетеродимер MLH1/PMS2 связывается с ДНК-связанным комплексом MSH2/MSH6, вызывая эксцизионную репарацию поврежденной ДНК.

Белки MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6 являются клинически значимыми белками MMR, кодируемыми генами, которые могут мутировать у пациентов, имеющих в семейном анамнезе синдром Линча.[7,8] Носители этих мутаций имеют высокий пожизненный риск развития колоректального и других форм рака ввиду накопления ошибок репликации ДНК в пролиферирующих клетках. Синдром Линча составляет 1–6 % всех случаев КРР. Такие опухоли образуются по причине наследования аутосомно-доминантной мутации зародышевой линии в одном из четырех генов MMR; при этом для большинства случаев КРР, связанного с синдромом Линча, характерна потеря экспрессии белка MLH1.[5,9,10] У пациентов с синдромом Линча было выявлено более 300 различных мутаций в семействе белков MMR. Фенотип опухоли, связанной с синдромом Линча, обычно характеризуется иммуногистохимической потерей экспрессии в белках MMR, в частности в белках MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6.[10-13] Исследование MMR методом IHC (иммуногистохимии) продемонстрировало эффективность при идентификации специфичного гена MMR, имеющего наибольшую вероятность обнаружения в нем изменения зародышевой линии или соматического изменения.[14]

Являясь частью панели VENTANA MMR IHC Panel, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) помогает дифференцировать спорадический КРР и вероятный синдром Линча при отсутствии экспрессии белка MLH1.[15,16] При КРР потеря экспрессии белка MLH1 зачастую является результатом гиперметилирования промотора MLH1 и указывает на спорадический характер заболевания.[17] Наличие белка BRAF V600E тесно связано с гиперметилированием промотора MLH1. В итоге положительный результат окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) указывает на спорадический КРР.

## КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

В 1960-х годах был впервые описан синдром Линча и была установлена связь между потерей функции MMR и развитием рака.[18] Потеря экспрессии белков MMR (MLH1, PMS2, MSH2 или MSH6) может привести к MSI и повышенному пожизненному риску развития не только КРР, но также и рака желудка, мозга, поджелудочной железы, кожи, эндометрия и яичников. Пациенты с синдромом Линча имеют 50–80 % пожизненного риска развития КРР.[5,19,20] Синдром Линча уникальным образом отличается от других наследственных раковых синдромов, поскольку проведение прямого исследования опухолевой ткани помогает в идентификации пациентов, находящихся в группе риска развития синдрома Линча, и делает последующий генетический анализ зародышевой линии более информативным. Применение расширенных протоколов скрининга онкологических заболеваний имеет благоприятное значение для семей с синдромом Линча.

Различные руководства, в том числе руководства Национальной комплексной сети онкологических учреждений (NCCN), рекомендуют проводить скрининг всех случаев КРР на предмет потенциального наличия синдрома Линча для идентификации пациентов и семей, которые получат пользу от дальнейшего генетического анализа и консультирования.[18,21-24] Использование панели VENTANA MMR IHC Panel будет способствовать определению статуса MMR КРР посредством классификации случаев КРР как имеющих неизмененную или потерянную экспрессию белка MMR. Обнаружение всех четырех белков MMR в опухоли указывает на нормальную или неизмененную функцию системы MMR. Потеря экспрессии MLH1 или MSH2 почти неизменно сопровождается потерей гетеродимерного белка-партнера PMS2 или MSH6 соответственно. Тем не менее, потеря экспрессии PMS2 или MSH6 не приводит к потере экспрессии MLH1 или MSH2. Потеря экспрессии PMS2, MSH2



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

и (или) MSH6 соотносится с вероятным синдромом Линча, поэтому пациентов следует направлять на дополнительное тестирование и консультацию согласно клинической практике.

Потеря экспрессии белка MLH1 может указывать на спорадическое возникновение рака или потенциальный синдром Линча. В 15 % или более случаев спорадического КРР потеря экспрессии белка MLH1 происходит ввиду гиперметилирования промотора MLH1.[5,25,26] Важно отметить, что мутация BRAF V600E наблюдается приблизительно в двух третях случаев опухолей, характеризующихся потерей экспрессии MLH1 по причине гиперметилирования промотора MLH1. И напротив, мутация BRAF V600E очень редко наблюдается в опухолях, вызванных синдромом Линча.[25] Таким образом, если результат окрашивания антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-MLH1 (M1)) указывает на потерю экспрессии белка MLH1, антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) может четко определить опухоль как спорадический КРР или вероятный синдром Линча.[5,27] При КРР потеря экспрессии белка MLH1 с положительным статусом BRAF V600E однозначно указывает на то, что опухоль имеет спорадический характер, фактически исключая синдром Линча из списка первопричин возникновения злокачественного новообразования.[17,29] Когда потеря экспрессии белка MLH1 сопровождается отрицательным статусом BRAF V600E, это указывает на высокую вероятность наличия синдрома Линча.[29]

## ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-MSH2 (G219-1129)) представляет собой мышиное моноклональное антитело, вырабатываемое против рекомбинантного белка человека MSH2. Антитело VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) связывается с белком MSH2 в фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) срезах ткани. Антитело может быть обнаружено посредством гаптенированного вторичного антитела с последующей обработкой мультимерным конъюгатом HRP (пероксидазы хрена) с антителом к гаптену (OptiView DAB IHC Detection Kit, № по каталогу 760-700 / 06396500001). После этого специфический комплекс антитела и фермента визуализируется путем осаждения продукта ферментативной реакции. Каждый этап процедуры включает инкубацию в течение строго определенного промежутка времени при заданной температуре. В конце каждой инкубации каждый аппарат BenchMark ULTRA, XT и GX промывает срезы, чтобы остановить реакцию и удалить несвязавшиеся вещества, которые могут препятствовать протеканию необходимых реакций на последующих этапах. С помощью данного аппарата также наносится ULTRA LCS (ULTRA LCS (Predilute), № по каталогу 650-210 / 05424534001) или LCS (LCS predilute, № по каталогу 650-010 / 05264839001), который позволяет свести к минимуму испарение водных реагентов с поверхности предметного стекла, содержащего образец.

Помимо окраски антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), второе предметное стекло следует окрасить мышиным моноклональным реагентом для отрицательного контроля, Negative Control (Monoclonal) (№ 760-2014 / 05266670001). Реагент для отрицательного контроля используется для оценки фонового окрашивания.

## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

Антитело VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 50 анализов.

Один 5 мл дозатор с антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) содержит приблизительно 100 мкг мышиного моноклонального антитела.

Антитело разведено в фосфатном буферном растворе 0,1 M (pH 7,3), содержащем 0,3% белка-переносчика, 0,05% Brij 35 и 0,05% ProClin300 в качестве консерванта.

Общая концентрация белка в реагенте составляет приблизительно 3 мг/мл. Концентрация специфических антител составляет около 20 мкг/мл. Неспецифической реактивности антител у данного продукта не обнаружено.

Антитело VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) является мышиным моноклональным антителом, полученным из очищенного супернатанта клеточной культуры.

См. соответствующую часть листка-вкладыша в упаковке набора для обнаружения VENTANA, чтобы ознакомиться с более подробным описанием: 1) принципов действия; 2) необходимых материалов и реагентов, не входящих в комплект; 3) сбора образцов тканей и подготовки к анализу; 4) процесса контроля качества; 5) принципов поиска и устранения проблем; 6) результатов; 7) общих ограничений.

## НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ МАТЕРИАЛЫ

В комплект поставки не входят красящие реагенты, например наборы для обнаружения VENTANA, а также вспомогательные компоненты, в том числе микропрепараты отрицательные и положительные тканевые контроли.

Для окрашивания требуются следующие реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки.

1. Дополнительные антитела панели VENTANA MMR IHC Panel:
   - VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№по каталогу 760-5091 / 08033668001)
   - VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№по каталогу 760-5094 / 08033692001)
   - VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (№по каталогу 760-5092 / 08033676001)
   - VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№по каталогу 760-5095 / 08033706001)
2. Negative Control (Monoclonal) (№ 760-2014 / 05266670001)
3. Предметные стекла для микроскопа (с положительным зарядом)
4. Этикетки со штрих-кодами (соответствующие реагенту для отрицательного контроля и используемому первичному антителу)
5. Ксилол (гистологической степени очистки)
6. Этанол или спиртосодержащий реагент (гистологической степени очистки)
   - 100%-й раствор: неразбавленный этанол или спиртосодержащий реагент.
   - 95%-й раствор: смешать 95 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 5 частями деионизированной воды.
   - 80%-й раствор: смешать 80 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 20 частями деионизированной воды.
7. Деионизированная или дистиллированная вода
8. OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700 / 06396500001)
9. Для VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, OptiView Amplification Kit (№по каталогу 760-099 / 06396518001 или №по каталогу 860-099 / 06718663001)
10. EZ Prep Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-102 / 05279771001)
11. Reaction Buffer Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-300 / 05353955001)
12. ULTRA LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-210 / 05424534001) или LCS (LCS predilute № по каталогу 650-010 / 05264839001)
13. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (№ по каталогу 950-224 / 05424569001) или Cell Conditioning 1 (CC1) № по каталогу 950-124 / 05279801001)
14. Hematoxylin II (№ по каталогу 790-2208 / 05277965001)
15. Bluing Reagent (№ по каталогу 760-2037 / 05266769001)
16. Постоянная гистологическая среда для заливки образцов (Permount Fisher № по каталогу SP15-500 или эквивалентная)
17. Покровное стекло (размера, достаточного для закрытия образцов ткани, например VWR, № по каталогу 48393-060)
18. Автоматический аппарат для заключения под покровное стекло (например, Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
19. Световой микроскоп
20. Гигроскопические салфетки

## ХРАНЕНИЕ

После получения реагента и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживать.

Для обеспечения надлежащей сохранности реагента и стабильности антител после каждого использования необходимо закрывать флакон-дозатор крышкой и сразу ставить его в холодильник в вертикальном положении.

На каждом флаконе-дозаторе с раствором антител указан срок годности. При соблюдении условий хранения реагент остается стабильным до даты, указанной на этикетке. Не использовать реагент после истечения срока годности.



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

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Данное первичное антитело можно применять для окрашивания подготовленных стандартным образом, фиксированных формалином и залитых в парафин тканей, при условии использования OptiView DAB IHC Detection Kit, а также аппаратов серии BenchMark ULTRA, XT и GX.

Необходимо получить срезы толщиной приблизительно 4 мкм и нанести их на положительно заряженные предметные стекла. Для окрашивания следует использовать свежие срезы тканей, поскольку антигенность тканевых срезов со временем может уменьшаться. Одновременно с исследованием неизвестных образцов рекомендуется провести исследование на положительном и отрицательном тканевых контролях.

При использовании панели VENTANA MMR IHC Panel рекомендуется, чтобы ткань в течение 6 часов после иссечения была зафиксирована в 10 % нейтральном забуференном формалине (NBF) на 6–24 часа из расчета окрашивания в миндалинах. Приемлемое окрашивание также достигалось при фиксации цинк-формалином и фиксаторами Z-5 в течение 6–24 часов. С панели VENTANA MMR IHC Panel не рекомендуется использовать спиртовой раствор формалина (AFA), 95 % этиловый спирт и фиксаторы PREFER, поскольку в этих случаях ткани демонстрируют нестабильные результаты окрашивания или полное их отсутствие.

Используемое количество фиксатора должно составлять от 15 до 20 объемов ткани. За 24 часа фиксатор проникает в плотную ткань не более чем на 2–3 мм, а в пористую ткань — не более чем на 5 мм. Фиксирование следует проводить при комнатной температуре (15–25 °C).[30,31]

Одновременно с исследованием неизвестных образцов рекомендуется провести исследование на положительном и отрицательном тканевых контролях.

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики in vitro (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. Раствор ProClin 300 используется в данном реагенте в качестве консерванта. Он относится к раздражающим средствам и при контакте с кожей может стать причиной сенсибилизации. При работе с реагентом соблюдайте меры предосторожности. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. Используйте защитную одежду и перчатки.
4. Материалы человеческого или животного происхождения следует считать биологически опасными материалами и утилизировать, соблюдая все необходимые меры предосторожности.
5. Избегайте контакта реагентов с глазами и слизистыми оболочками. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды.
6. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.
7. Проконсультируйтесь с местными и (или) государственными органами в отношении рекомендованного способа утилизации.
8. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Антитело VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) предназначено для использования на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX в комбинации с OptiView DAB IHC Detection Kit и вспомогательными реагентами. В таблице 1 приведен протокол окрашивания для применения с антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129). Сведения о влиянии других значений времени и температуры при демаскировке антигена на устойчивость анализа к возникновению ошибок отсутствуют. Поэтому отклонение от рекомендуемых условий для демаскировки антигена, представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными. Следует использовать и документировать надлежащие контроли. Пользователи, которые отклоняются от указанного протокола, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

Параметры автоматических процедур могут быть отображены на экране, напечатаны и отредактированы согласно процедуре, описанной в руководстве пользователя, прилагаемом к соответствующим приборам. Для получения более подробной информации об этапах процедуры иммуногистохимического окрашивания см. листок-вкладыш в упаковке OptiView DAB IHC Detection Kit.

**Таблица** 1. Рекомендуемый протокол окрашивания для антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit и аппаратов BenchMark ULTRA, XT и GX.

| **Тип процедуры** | **Метод** | | |
|---|---|---|---|
| | BenchMark ULTRA **Аппарат** | BenchMark XT **Аппарат** | BenchMark GX **Аппарат** |
| **Депарафинирование** | Выбрано | Выбрано | Выбрано |
| **Кондиционирование клеток (демаскирование антигена)** | Cell Conditioning 1, 40 мин 100°C | Cell Conditioning 1, 40 мин | Cell Conditioning 1, 40 мин |
| Pre-Primary Peroxidase Inhibitor | Выбрано | Выбрано | Выбрано |
| **Антитела (первичные)** | 12 минут, 36°C | 12 минут, 37 °C | 12 минут, 37 °C |
| OptiView HQ Linker | 8 мин (по умолчанию) | | |
| OptiView HRP Multimer | 8 мин (по умолчанию) | | |
| **Контрастное окрашивание** | Hematoxylin II, 4 минуты | | |
| **Обработка после контрокрашивания** | Bluing, 4 минуты | | |

Отклонение от рекомендуемых условий (особенно для демаскировки антигена), представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными. Тем не менее, в связи с различиями в фиксации и обработке тканей, а также в лабораторном оборудовании и внешних условиях, может потребоваться увеличение или уменьшение времени инкубации первичных антител в зависимости от отдельных образцов и предпочтений эксперта. Подробную информацию о различиях в методиках фиксации см. в разделе Immunohistochemistry: Principles and Advances (Иммуногистохимический анализ: принципы и достижения).[32]

## ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

### Реагент для отрицательного контроля

Ventana Medical Systems, Inc. настоятельно рекомендует использовать реагент для отрицательного контроля для окрашивания смежного среза образца ткани пациента на отдельном предметном стекле, а не на предметном стекле, где образец был окрашен антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129). Мышиный моноклональный реагент для отрицательного контроля (Negative Control (Monoclonal), №по каталогу 760-2014 / 05266670001) рекомендуется для использования вместо первичного антитела для оценки неспецифического окрашивания. Параметры окрашивания антитела, используемого с реагентом для отрицательного контроля, должны соответствовать параметрам окрашивания первичного антитела.

### Положительный тканевый контроль

При выполнении каждой процедуры окрашивания необходимо проводить положительный тканевый контроль. Оптимальная лабораторная практика — помещение среза для положительного контроля на одно стекло с образцом ткани пациента. Такая практика позволяет распознать случаи, когда первичное антитело или другой важный реагент не оказывают должного эффекта на образец ткани пациента. Для оптимального контроля качества лучше всего подойдет образец ткани, в норме показывающий слабое положительное окрашивание. Положительно окрашиваемые компоненты ткани служат подтверждением того, что антитела нанесены и что прибор работает надлежащим образом. Данная ткань может содержать как положительно, так и отрицательно окрашиваемые клетки или компоненты ткани и использоваться в качестве как положительного, так и отрицательного тканевого контроля. В качестве контроля следует использовать свежие образцы тканей, полученные в ходе вскрытия, биопсии или хирургических



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

операций. Образцы следует как можно скорее подготовить или зафиксировать по процедуре, используемой для исследуемых образцов. С использованием таких образцов должен контролироваться весь процесс исследования, начиная от подготовки ткани и заканчивая окрашиванием. Использование среза ткани, фиксированного или обработанного по процедуре, отличной от процедуры тестируемого образца, позволяет обеспечить контроль всех реагентов и этапов метода, кроме фиксации и обработки ткани.

Заведомо положительные тканевые контроли следует использовать только для контроля правильности работы с обработанными тканями и тестирования реагентов, а не в качестве вспомогательного средства при постановке конкретного диагноза на основании образцов пациента. Если не наблюдается положительного окрашивания положительных тканевых контролей, результаты окрашивания тестовых образцов следует считать неверными.

Ткань КРР с белком MSH2, имеющим клинический статус «неизмененная», или нормальной тканью толстой кишки после предварительной обработки антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), может использоваться в качестве положительного тканевого контроля. Нормальная ткань толстой кишки будет иметь положительный результат окрашивания белка MSH2 с использованием антитела VENTANA anti-MSH2. Положительный тканевый контроль должен демонстрировать однозначное ядерное окрашивание в жизнеспособных опухолевых клетках в присутствии внутренних положительных контролей (ядерное окрашивание в лимфоцитах, фибробластах или нормальном эпителии вблизи опухоли).

### Отрицательный тканевый контроль

Так как белки MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6 экспрессируются во всех тканях, для данных биомаркеров не существует нормального отрицательного тканевого контроля. Однако, ткань КРР, в которой белок MSH2 имеет клинический статус «Потерянная», после предварительной обработки антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), может использоваться в качестве отрицательного тканевого контроля. Отрицательный тканевый контроль следует использовать только для проверки точности характеристик обработанных тканей, исследуемых реагентов и аппаратов, но не для формулировки конкретного диагноза на основании образцов пациента.

#### Верификация анализа

Перед начальным использованием антитела или системы окрашивания в диагностической процедуре следует верифицировать специфичность антитела. Для этого выполняется тестирование антитела на серии тканей с известными характеристиками эффективности IHC, представляющими клинический статус белка MSH2 в тканях как «неизмененная». (См. «Процедуры контроля качества», описанные ранее в этом разделе листка-вкладыша, а также рекомендации по контролю качества Программы лабораторной аккредитации коллегии американских патологов (College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program), контрольной карты по патологической анатомии[33] или CLSI Approved Guideline.[31])

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОКРАШИВАНИЯ/ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Схема клеточного окрашивания для антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) имеет ядерный характер в активно пролиферирующих клетках. Квалифицированный патоморфолог присваивает клинический статус образцам КРР, окрашенным с помощью антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), на основании собственной оценки наличия или отсутствия специфичного ядерного окрашивания в опухолевой ткани. Клинический статус «Неизмененная» присваивается образцам с однозначным ядерным окрашиванием в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии приемлемых внутренних положительных контролей (ядерное окрашивание в лимфоцитах, фибробластах или здоровом эпителии вблизи опухоли). Клинический статус «Потерянная» присваивается образцам с однозначной потерей ядерного окрашивания или с фокальным слабым неоднозначным ядерным окрашиванием в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии внутренних положительных контролей, как показано в таблице 2.

Если во внутренних положительных контролях однозначное ядерное окрашивание отсутствует и (или) фоновое окрашивание мешает интерпретации, анализ следует считать неприемлемым. При этом необходимо провести анализ повторно. Точечное ядерное окрашивание опухолевых клеток следует считать отрицательным (потерянная экспрессия). В образцах с фокальным окрашиванием опухолевых клеток интенсивность ядерного окрашивания по меньшей мере должна быть аналогична интенсивности окрашивания внутренних положительных контролей наряду со сливающимся/непрерывным характером окрашивания ядер в нескольких эпителиальных железах или эпителиальных жемчужинах, чтобы образцу был присвоен клинический статус «Неизмененная». При отсутствии указанных условий образцу присваивается клинический статус «Потерянная».

**Таблица** 2. Интерпретация окрашивания для антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129)

| Клинический статус | Описание |
|---|---|
| **Неизмененная экспрессия** MSH2 | Однозначное ядерное окрашивание в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии внутренних положительных контролей (ядерное окрашивание в лимфоцитах, фибробластах или здоровом эпителии толстой кишки вблизи опухоли) |
| **Потерянная экспрессия** MSH2 | Однозначная потеря ядерного окрашивания или фокальное слабое неоднозначное ядерное окрашивание в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии внутренних положительных контролей. |

Образцы, окрашенные антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), классифицируются как «неизмененная» или «потерянная» в зависимости от наличия или отсутствия специфического окрашивания в опухолевой ткани.

## ОСОБЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

Антитела и реагенты компании Ventana Medical Systems, Inc. имеют оптимальную концентрацию для применения в соответствии с прилагающейся инструкцией. Отклонение от рекомендуемых условий для демаскировки антигена, представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными. Следует использовать и документировать надлежащие контроли. Пользователи, которые отклоняются от указанного протокола, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

При использовании панели VENTANA MMR IHC Panel рекомендуется, чтобы образцы ткани были зафиксированы в 10 % нейтральном забуференном формалине на 6–24 часа в течение 6 часов после иссечения. Приемлемое окрашивание наблюдается после фиксации цинк-формалином и фиксатором Z-5 в течение 6–24 часов. Не рекомендуется фиксировать ткани в 95 % спирте, спиртовом растворе формалина с уксусной кислотой (AFA) или фиксаторах PREFER.

Анализ некоторых образцов может быть особенно сложным в связи со следующими проблемами:

- Неспецифическое фоновое окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать неспецифическое фоновое окрашивание по недостаточно понятным причинам. По этой причине оценка предметного стекла с антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) должна включать в себя сравнение предметного стекла с срезом ткани, окрашенным реагентом для отрицательного контроля для определения уровня неспецифичного фонового окрашивания. Цитоплазматическое окрашивание (при наличии) должно игнорироваться при IHC интерпретации результатов окрашивания антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129).
- Фокальное окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать фокальное окрашивание в опухолевых клетках; интенсивность окрашивания может варьировать от слабой до сильной. На основании IHC алгоритма оценивания антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), фокальное слабое неоднозначное ядерное окрашивание в жизнеспособных опухолевых клетках в присутствии внутренних положительных контролей должно квалифицироваться как «потерянная». Окрашивание может варьироваться в зависимости от уровня интенсивности, которая, в свою очередь, может варьироваться в зависимости от опухоли; однако интенсивность не влияет на клинический статус MMR.
- Точечное окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать дискретное точечное окрашивание в нескольких ядрах опухоли; интенсивность окрашивания может варьировать от слабой до сильной. Такой характер окрашивания следует игнорировать, и если образец имеет только этот тип характера окрашивания, ему следует присвоить клинический статус «Потерянная».
- Тканевые артефакты или артефакты, вызванные окрашиванием. Гистологические артефакты, возникающие в ходе обработки образцов и



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

микротомии, также могут осложнить определение IHC клинического статуса антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129). К таким артефактам относятся, кроме прочего, градиенты фиксации и краевые эффекты, захват DAB, образование пузырьков в ядре, недостаточное окрашивание на некоторых участках ткани, разрыв или складки ткани и потеря среза ткани. В некоторых случаях может потребоваться повторное окрашивание новых срезов или получение нового образца.

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИТЕЛА VENTANA ANTI-MSH2 (G219-1129)

### Аналитическая чувствительнbсть/специфичность

Аналитическая чувствительность и специфичность были определены посредством окрашивания множественных образцов нормальных и опухолевых тканей человека антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129). Результаты приведены в Таблица 3 и Таблица 4. Положительное окрашивание является ядерным, если не указано иное. В результате окрашивания нормальных и опухолевых тканей антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) непредвиденных результатов получено не было. Как и ожидалось, поскольку репарация неспаренных оснований присутствует во всех активно пролиферирующих клетках, большинство здоровых и опухолевых тканей продемонстрировали положительное окрашивание.

**Таблица** 3. Аналитическая чувствительность/специфичность окрашивания FFPE нормальных тканей антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129)

| Ткань | Кол-во положительных случаев/ общее кол-во случаев | Ткань | Кол-во положительных случаев/ общее кол-во случаев |
|---|---|---|---|
| Надпочечник | 3/3 | Легкое | 3/3 |
| Мочевой пузырь | 3/3 | Лимфоузлы | 3/3 |
| Костный мозг | 3/3 | Мезотелий | 3/3 |
| Яичник | 5/5 | Поджелудочная железа | 3/3 |
| Молочная железа | 3/3 | Паращитовидная железа | 3/3 |
| Мозжечок | 3/3 | Периферический нерв | 5/5 |
| Головной мозг | 3/3 | Простата | 3/3 |
| Шейка матки | 3/3 | Скелетная мышца | 3/3 |
| Толстая кишка | 3/3 | Кожа | 3/3 |
| Эндометрий | 3/3 | Селезенка | 3/3 |
| Пищевод | 3/3 | Желудок | 3/3 |
| Сердце | 1/3 | Яичко | 3/3 |
| Гипофиз | 3/3 | Тимус | 3/3 |
| Стенка кишечника | 3/3 | Щитовидная железа | 3/3 |
| Почка | 3/3 | Язык/слюнная железа | 2/3 |
| Печень | 3/3 | Миндалины | 3/3 |

Примечание. Белки репарации неспаренных оснований, такие как MSH2, присутствуют во всех клетках с активной пролиферацией. Для всех тканей положительное/отрицательное окрашивание определялось для тканеспецифичных элементов при наличии положительного окрашивания в здоровых контрольных клетках (лимфоцитах, фибробластах и эпителиальных клетках).

**Таблица** 4. Аналитическая чувствительность/специфичность окрашивания различных FFPE опухолевых тканей антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129)

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Глиобластома (головной мозг) | 1/1 |
| Менингиома (головной мозг) | 1/1 |
| Эпендимома (головной мозг) | 1/1 |
| Олигодендроглиома (головной мозг) | 1/1 |
| Серозная аденокарцинома (яичник) | 1/1 |
| Аденокарцинома (яичник) | 1/1 |
| Панкреато-нейроэндокринное новообразование (поджелудочная железа) | 1/1 |
| Аденокарцинома (поджелудочная железа) | 1/1 |
| Семинома (яичко) | 2/2 |
| Медуллярная карцинома (щитовидная железа) | 1/1 |
| Папиллярная карцинома (щитовидная железа) | 1/1 |
| Протоковая карцинома in situ (молочная железа) | 1/1 |
| Микроинвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 1/1 |
| Инвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 1/1 |
| В-клеточная лимфома, неуточненная (селезенка) | 1/1 |
| Мелкоклеточная карцинома (легкое) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (легкое) | 1/1 |
| Аденокарцинома (легкое) | 1/1 |
| Нейроэндокринная карцинома (пищевод) | 1/1 |
| Аденокарцинома (пищевод) | 1/1 |
| Перстневидноклеточная карцинома (желудок) | 1/1 |
| Аденокарцинома (тонкая кишка) | 1/1 |
| Стромальная саркома (тонкая кишка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (толстая кишка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (прямая кишка) | 1/1 |
| Гастроинтестинальная стромальная опухоль (GIST) (прямая кишка) | 1/1 |
| Гепатобластома (печень) | 1/1 |
| Светлоклеточная карцинома (почка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (предстательная железа) | 2/2 |
| Лейомиома (матка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (матка) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (шейка матки) | 2/2 |



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

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Эмбриональная рабдомиосаркома (поперечно-полосатая мускулатура) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (кожа) | 1/1 |
| Нейробластома (забрюшинное пространство) | 1/1 |
| Мезотелиома (брюшина) | 1/1 |
| В-клеточная лимфома, неуточненная (лимфатический узел) | 2/2 |
| Лимфома Ходжкина (Hodgkin) (лимфатический узел) | 1/1 |
| Лейомиосаркома (мочевой пузырь) | 1/1 |
| Остеосаркома | 1/1 |
| Лейомиосаркома (гладкая мускулатура) | 1/1 |

Примечание. Белки репарации неспаренных оснований, такие как MSH2, присутствуют во всех клетках с активной пролиферацией. Для всех тканей положительное/отрицательное окрашивание определялось для опухолевых клеток при наличии положительного окрашивания в здоровых контрольных клетках (лимфоцитах, фибробластах и эпителиальных клетках).

### Внутрисуточная повторяемость и межсуточная прецизионность

Повторяемость и прецизионность окрашивания антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) оценивались на аппарате BenchMark ULTRA в сочетании с OptiView DAB IHC Detection Kit.

Внутрисуточная повторяемость оценивалась с использованием 11 образцов КРР (6 с неизмененной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией MSH2). Пять реплицированных предметных стекол каждого из образцов КРР окрашивались антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) на одном аппарате BenchMark ULTRA в один день. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им статус «Неизмененная» или «Потерянная».

Межсуточная прецизионность также оценивалась с использованием 11 образцов КРР (6 с неизмененной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией MSH2). Реплицированные предметные стекла каждого из образцов КРР окрашивались антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) на аппарате BenchMark ULTRA в каждый из 5 непоследовательных дней. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им статус «Неизмененная» или «Потерянная».

Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5. На основании объединенных данных всех возможных парных сочетаний исследования внутрисуточной повторяемости и межсуточной прецизионности продемонстрировали 100%-е совпадение положительных результатов (PPA), 100%-е совпадение отрицательных результатов (NPA) и общее 100%-е совпадение результатов (OPA). Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 5.

**Таблица** 5. Внутрисуточная повторяемость и межсуточная прецизионность окрашивания антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), согласно выявленному клиническому статусу (неизмененная или потерянная)

| Повторяемость/ Точность | Клинический Статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Внутрисуточная повторяемость | Неизмененная | PPA | 30/30 | 100,0. | (88,6; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 25/25 | 100,0. | (86,7; 100,0) |
| | Всего | OPA | 55/55 | 100,0. | (93,5;100,0) |
| Межсуточная прецизионность | Неизмененная | PPA | 60/60 | 100,0. | (94,0; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 50/50 | 100,0. | (92,9; 100,0) |
| | Всего | OPA | 110/110 | 100,0. | (96,6; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

### Прецизионность между разными аппаратами BenchMark

Прецизионность между разными аппаратами BenchMark ULTRA для антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) определялась методом окрашивания реплицированных предметных стекол с 11 образцами КРР (6 с неизмененной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией MSH2) на 3 аппаратах BenchMark ULTRA с применением антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) и использованием OptiView DAB IHC Detection Kit. Реплицированные предметные стекла каждого из образцов КРР окрашивались антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) на 3 аппаратах BenchMark ULTRA.

Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел оценку их клинического статуса («Неизмененная» или «Потерянная»). Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5.

При определении прецизионности между разными аппаратами BenchMark ULTRA был проведен сравнительный анализ пар клинического статуса предметных стекол для каждого образца между аппаратами и продемонстрированными 100% PPA, NPA и OPA. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 6.

**Таблица** 6. Прецизионность между разными аппаратами BenchMark ULTRA для антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), согласно выявленному клиническому статусу (неизмененная или потерянная)

| Точность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Между разными аппаратами | Неизмененная | PPA | 36/36 | 100,0. | (90,4; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 30/30 | 100,0. | (88,6; 100,0) |
| | Всего | OPA | 66/66 | 100,0. | (94,5; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

Кроме того, прецизионность между разными аппаратами для антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) определялась методом окрашивания реплицированных предметных стекол с 6 образцами КРР (4 с неизмененной экспрессией и 2 с потерянной экспрессией MSH2) на 3 аппаратах BenchMark XT и 3 аппаратах BenchMark GX с применением антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) и использованием OptiView DAB IHC Detection Kit.

Было проведено 15 наблюдений на каждый образец при объединении 3 аппаратов; медиана для каждого образца определялась по этим 15 наблюдениям.



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

Индивидуальные наблюдения одного и того же образца считались согласующимися с медианной интенсивностью сигнала образца, если их интенсивность находилась в пределах 0,5. При определении прецизионности между аппаратами BenchMark XT и BenchMark GX для каждого образца был выполнен сравнительный анализ пар по уровню интенсивности окрашивания опухолевой ткани. Результаты были следующими: 100 % OPA между 3 аппаратами BenchMark XT и 100 % OPA между 3 аппаратами BenchMark GX. Для всех предметных стекол уровень фонового окрашивания был приемлемым (≤ 0,5) как на аппаратах BenchMark XT, так и на аппаратах GX.

### Конкордантность платформы BenchMark

Конкордантность между аппаратами BenchMark ULTRA, XT и GX для антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) была определена методом окрашивания образцов KPP антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit. Клинический статус всех предметных стекол (неизмененная/потерянная) оценивался одним и тем же патоморфологом.

Между платформами было проведено парное сравнение образцов KPP, в том числе сравнение GX с ULTRA (136 образцов с неизмененной экспрессией и 23 с потерянной экспрессией); сравнение GX с XT (134 образца с неизмененной экспрессией и 23 с потерянной экспрессией); и сравнение ULTRA с XT (137 образцов с неизмененной экспрессией и 23 с потерянной экспрессией). Все парные сравнения, выполненные между платформами, продемонстрировали 100%-е среднее совпадение положительных результатов (APA), среднее совпадение отрицательных результатов (ANA) и OPA.

### Исследования прецизионности оценок эксперта

Прецизионность по каждому эксперту и между экспертами оценивалась по 20 образцам KPP (12 с неизмененной экспрессией и 8 с потерянной экспрессией), окрашенным антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) и OptiView DAB IHC Detection Kit. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца.

Все пары предметных стекол были рандомизированы и оценивались 3 патоморфологами на предмет клинического статуса MSH2 «неизмененная» или «потерянная». Патоморфологам был неизвестен диагноз образцов. После четырехнедельного отмывочного периода окрашенные антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) предметные стекла были повторно рандомизированы для проведения второй оценки клинического статуса MSH2 каждым из 3 патоморфологов. Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5.

Для определения прецинзионности по каждому эксперту сравнивали исходную и итоговую оценки слайда, полученные от одного и того же патоморфолога. Всего было выполнено сравнение 20 предметных стекол с срезом KPP на каждого патоморфолога. Сравнения 3 патоморфологов были объединены и продемонстрировали 100,0% APA, 100,0% ANA и 100,0% OPA для прецинзионности по каждому эксперту. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 7.

Для определения прецизионности между экспертами сравнивали все оценки предметных стекол (20 KPP x 2 оценки/образец x 3 патоморфолога = 120 оценок предметных стекол) со статусом модального образца для каждого образца KPP. Результаты демонстрируют 100,0 % PPA, NPA и OPA для прецизионности между экспертами. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 7.

**Таблица** 7. Прецизионность по каждому эксперту и между экспертами антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) для образцов KPP, согласно выявленному клиническому статусу MSH2 (неизмененная/потерянная)

| Прецизионность эксперта | Клинический Статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| По каждому эксперту | Неизменная | APA | 72/72 | 100,0. | (94,9; 100,0) |
| | Потерянная | ANA | 48/48 | 100,0. | (92,3;100,0) |
| | Всего | OPA | 60/60 | 100,0. | (94,0; 100,0) |
| Между экспертами | Неизменная | PPA | 72/72 | 100,0. | (94,9; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 48/48 | 100,0. | (92,6;100,0) |
| | Всего | OPA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |

Примечание. Для оценки по каждому эксперту 95% доверительные интервалы для APA и ANA были рассчитаны по методу Клоппера-Пирсона; 95% доверительный интервал для OPA 95% CI был рассчитан по методу бутстреп. Для оценки между экспертами 95% доверительные интервалы были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

### Прецизионность между партиями

Прецизионность между партиями антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) была определена методом анализа 3 производственных партий антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), каждая с использованием строенных предметных стекол из 10 образцов KPP (5 с неизмененной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией MSH2) на аппарате BenchMark ULTRA с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit.

Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Пары предметных стекол были рандомизированы, а затем их оценку провел один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов и номер партии антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129). Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5.

При определении прецизионности между партиями антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) все оценки предметных стекол сравнивались со статусом модального образца для каждого образца KPP. Показатель OPA между партиями антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) составил 100 %, продемонстрировав, что окрашивание антителом VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) является воспроизводимым между партиями антитела.

Сводные данные полученных результатов для анализа прецизионности между партиями антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) приведены в таблице 8.

**Таблица** 8. Прецизионность между партиями антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), согласно выявленному клиническому статусу (неизмененная или потерянная)

| Точность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Между партиями | Неизменная | PPA | 45/45 | 100,0. | (92,1; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 45/45 | 100,0. | (92,1; 100,0) |
| | Всего | OPA | 90/90 | 100,0. | (95,9; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

### Исследование воспроизводимости результата между лабораториями

Исследование воспроизводимости результата между лабораториями для панели VENTANA MMR IHC Panel было проведено для демонстрации воспроизводимости каждого анализа панели VENTANA MMR IHC Panel для определения клинического статуса. В исследование было включено 6 образцов ткани KPP (3 с неизмененной экспрессией и 3 с потерянной экспрессией) для каждого белка MMR и 16 образцов ткани KPP (8 положительных и 8 отрицательных) для определения BRAF V600E. Циклы проводились на 3 аппаратах BenchMark ULTRA в каждый из 5



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

непоследовательных дней за 21-дневный период в трех независимых лабораториях. Каждое окрашенное антителом предметное стекло объединялось с H&E (гематоксилином и эозином) и предметными стеклами, окрашенными реагентом для отрицательного контроля, из того же образца. Все наборы предметных стекол были рандомизированы и оценены в общей сложности 6 экспертами (по 2 в каждом исследовательском центре), которые не знали заранее, каков клинический статус MMR в образцах набора исследования. Для каждого из 40 образцов в исследовании было проведено 30 наблюдений по всем дням, исследовательским центрам и экспертам. Эталонный статус модального образца был получен для каждого образца на основании наиболее часто наблюдаемого статуса в 30 наблюдениях. Всего в исследовании было проведено 1200 наблюдений для всех пяти белков. Для всех оцениваемых образцов уровень приемлемости в отношении морфологических структур и фона в данном исследовании составил 100 %. Сводные данные по объединенным (для всех пяти белков) статистическим показателям совпадений между эталонным статусом модального образца и индивидуальными наблюдениями приведены в таблице 9.

**Таблица** 9. Совпадения между панелью VENTANA MMR IHC Panel и эталонным статусом модального образца

| Межлабораторная повторяемость | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Все белки | Неизмененная/положительный | PPA | 598/600 | 99,8. | (98,7; 100,0) |
| | Потерянная/отрицательный | NPA | 593/600 | 98,9. | (97,4; 99,5) |
| | Всего | OPA | 1191/1200 | 99,4. | (98,6; 99,7) |

Примечание. Клинический статус определяется как «Неизмененная» или «Потерянная» для экспрессии белка MMR и «Положительный» или «Отрицательный» для белка BRAF V600E Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием подхода на основе обобщенной оценочной модели со смешанными эффектами (GLMM).

Кроме того, для антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) были проведены парные сравнения между исследовательскими центрами, межсуточными показателями и показателями между экспертами. Для MSH2 этот набор исследований включал в общем 180 наблюдений. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 10. Данные обозначают повторяемость анализа по 5 дням, 3 исследовательским центрам и 6 экспертам.

**Таблица** 10. Показатели парных совпадений межлабораторной воспроизводимости для антитела VENTANA anti-MSH2 (G219-1129), согласно выявленному клиническому статусу (неизмененная или потерянная)

| Межлабораторная повторяемость | | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Между исследовательскими центрами (3 исследовательских центра) | | APA | 360/364 | 98,9. | (96,8; 100,0) |
| | | ANA | 352/356 | 98,9. | (96,6; 100,0) |
| | | OPA | 356/360 | 98,9. | (96,7; 100,0) |
| Межсуточная (5 непоследовательных дней) | Лаборатория A | APA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | | ANA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | | OPA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | Лаборатория B | APA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | | ANA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | | OPA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |
| | Лаборатория C | APA | 120/124 | 96,8. | (90,9; 100,0) |
| | | ANA | 112/116 | 96,6. | (88,9; 100,0) |
| | | OPA | 116/120 | 96,7. | (90,0; 100,0) |
| Между экспертами (2 патоморфолога на исследовательский центр) | | APA | 90/91 | 98,9. | (96,8; 100,0) |
| | | ANA | 88/89 | 98,9. | (96,6; 100,0) |
| | | OPA | 89/90 | 98,9. | (96,7; 100,0) |

Примечание. Значения 95 % доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп; в случаях, где показатель точечной оценки составлял 100 %, использовался метод оценки Уилсона.

### Исследование точности: сравнение метода получения результатов с использованием панели VENTANA MMR IHC Panel и молекулярного тестирования (секвенирование ДНК и гиперметилирование промотора MLH1)

Исследование было проведено для сравнения эффективности использования панели VENTANA MMR IHC Panel и молекулярного тестирования, в том числе комплексной панели образцов тканей толстой кишки для секвенирования ДНК с целью идентификации КРР, который (i) характеризуется дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR) и (ii) содержит мутацию BRAF V600E. Панель образцов тканей толстой кишки для секвенирования ДНК включала геномный анализ вариаций, присутствующих в генах MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, EPCAM), BRAF и других генах, играющих важное значение при канцерогенезе (например PIK3CA, KRAS, NRAS, ERBB2 и т. д.). Секвенирование включало все экзоны, интронные и фланкирующие последовательности, а также значимые делеции, дупликации и мозаицизм.

Для исследования последовательности образцов КРР окрашивались H&E и оценивались на предмет надлежащей фиксации и морфологии, включая наличие клеточных элементов (опухоль и клетки внутренних контролей). Каждый образец оценивали, чтобы определить, состоит ли образец из опухолевых клеток как минимум на 50 %. Такая оценка была проведена для обеспечения достаточного количества опухолевых клеток в образце согласно рекомендациям для проведения молекулярного тестирования. После оценки в исследование было включено 105 образцов, соответствующих этим критериям. Кроме того, были включены 13 образцов КРР, демонстрирующих клинический статус «Потерянная» при исследовании методом IHC, чтобы гарантировать, что потеря экспрессии каждого маркера будет отражена в исследовании. Срезы всех образцов исследования были окрашены методом IHC с использованием панели VENTANA MMR IHC Panel и соответствующих реагентов для отрицательного контроля. Дополнительные срезы были обработаны с помощью панели образцов ткани толстой кишки для секвенирования ДНК. Гиперметилирование промотора MLH1 — один из механизмов, который может привести к потере экспрессии белка MLH1, и его связывают со спорадическим КРР, а не с потенциальным синдромом Линча. Поэтому все образцы с потерей экспрессии MLH1, идентифицированные методом IHC при проведении исследования, были проанализированы на предмет гиперметилирования промотора MLH1.

С окончательным набором исследования, состоящим из 118 образцов, в анализ были включены показатели PPA и NPA для всех объединенных маркеров (т. е. все объединенные наблюдаемые значения), при этом молекулярное тестирование выступало в качестве эталона для сравнения IHC. Анализ включал в себя сравнение статуса белка MMR (неизмененная/потерянная) с молекулярным статусом, определенным как «нормальный» (нет патогенных мутаций, отрицателен в отношении гиперметилирования промотора MLH1 и BRAF дикого типа (отсутствие мутации V600E)) или «аномальный» (наличие патогенных мутаций, положителен в отношении гиперметилирования промотора MLH1 и (или) положителен в отношении мутации BRAF V600E). Показатели точечной оценки составили 99,4 % PPA, 93,5 % NPA и 98,8 % OPA, как показано в таблице 11.



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

Также был проведен сводный анализ для сравнения четырех IHC маркеров MMR (без антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) с результатами молекулярного тестирования. Показатели точечной оценки составили 99,3 % PPA, 89,7 % NPA и 98,5 % OPA, как показано в таблице 12.

В рамках дополнительного анализа сравнили результаты исследования методом IHC для четырех маркеров MMR с результатами молекулярного тестирования генов MMR на уровне одного образца, чтобы включить в исследование статус всех маркеров и получить результат dMMR/pMMR при использовании двух методов. Результаты данного анализа представлены в таблице 13, OPA при применении двух методов составляет 97,4 %.

В рамках исследования было выполнено сравнение статуса MMR при исследовании методом IHC и статуса молекулярного тестирования генов MMR для отдельных маркеров MMR. Показатель OPA для каждого маркера MMR при сравнении с объединенными результатами панели образцов ткани толстой кишки для секвенирования ДНК и анализа гиперметилирования промотора MLH1 составлял 100,0 % для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), 99,1 % для VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, 98,3 % для VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody и 96,6 % для антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

Клинический статус BRAF V600E в образцах КРР, полученных методом IHC с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), также сравнивался с результатами оценки мутационного статуса BRAF, определенными с помощью секвенирования ДНК. Показатели PPA, NPA и OPA IHC тестирования с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и применением метода секвенирования ДНК в качестве эталона составили 100 % (таблица 14). Было проведено дополнительное тестирование для подтверждения способности антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) к четкому определению образцов КРР, демонстрирующих потерю экспрессии белка MLH1. Из 23 образцов, положительных в отношении BRAF V600E, в 20 методом IHC была выявлена потеря экспрессии белка MLH1, и они были положительны в отношении гиперметилирования промотора MLH1. Эти данные указывают на тесную связь положительного статуса BRAF V600E и статуса гиперметилирования промотора MLH1. Оставшиеся образцы представляли собой образцы с pMMR (неизмененная экспрессия для всех белков MMR). Все образцы, положительные на BRAF V600E, идентифицировали как образцы со спорадическим КРР. Результаты подтвердили, что антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) правильно идентифицирует образцы КРР, имеющие мутацию BRAF V600E. Также данные подтвердили возможность использования антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) для дифференциации спорадического КРР и вероятного синдрома Линча при отсутствии экспрессии белка MLH1.

**Таблица** 11. Совокупный анализ для совпадений панели VENTANA MMR IHC Panel между IHC и молекулярным тестированием

| **Статус*** (**Молекулярное тестирование**/IHC) | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| Нормальный/неизменненная | PPA | 523/526 | 99,4. | (98,7; 100,0) |
| Аномальный/потерянная | NPA | 58/62 | 93,5. | (87,1; 98,6) |
| Всего | OPA | 581/588 | 98,8. | (98,0; 99,7) |

* При использовании метода IHC статус экспрессии белка системы MMR — неизмененная или потерянная. Для этого анализа отрицательные и положительные на BRAF V600E образцы были включены в категории «Неизмененная» или «Потерянная» соответственно. Молекулярное тестирование указывает на отсутствие (нормальный) или присутствие (аномальный) потенциальных патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп.

**Таблица** 12. Совокупный анализ совпадений четырех IHC маркеров MMR (без антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) между IHC и молекулярным тестированием

| **Статус*** (**Молекулярное тестирование**/IHC) | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| Нормальный/неизмененная | PPA | 428/431 | 99,3. | (98,4; 100,0) |
| Аномальный/потерянная | NPA | 35/39 | 89,7. | (79,4; 97,7) |
| Всего | OPA | 463/470 | 98,5. | (97,3; 99,6) |

* При использовании метода IHC статус экспрессии белка — неизмененная или потерянная. Молекулярное тестирование указывает на отсутствие (нормальный) или присутствие (аномальный) потенциальных патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп.

**Таблица** 13. Совпадения четырех маркеров MMR при исследовании методом IHC и результатов молекулярного тестирования для определения статуса MMR (dMMR/pMMR)

| **Статус** MMR* | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| pMMR | PPA | 79/80 | 98,8. | (93,3; 99,8) |
| dMMR | NPA | 35/37 | 94,6. | (82,3; 98,5) |
| Всего | OPA | 114/117 | 97,4. | (92,7; 99,1) |

* При использовании метода IHC статус pMMR образца формулируется как «Неизмененная» для всех MMR-белков, в то время как при статусе dMMR наблюдается потеря экспрессии одного или нескольких MMR-белков. В рамках молекулярного тестирования статус pMMR представляет собой отсутствие патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1, в то время как статус dMMR представляет собой наличие патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

**Таблица** 14. Совпадения между методом IHC с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и молекулярным тестированием

| BRAF V600E **Статус** (**Молекулярное тестирование**/IHC) | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| Положительный/аномальный | PPA | 23/23 | 100,0. | (85,7; 100,0) |
| Отрицательный/нормальный | NPA | 95/95 | 100,0. | (96,1; 100,0) |
| Всего | OPA | 118/118 | 100,0. | (96,8; 100,0) |

Статус для BRAF V600E был определен как «положительный» или «отрицательный» по результатам IHC и «аномальный» (присутствие мутации V600E) или «нормальный» (BRAF дикого типа) по результатам молекулярного тестирования. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ


1. Yuan L, Chi Y, Chen W, Chen X, Wei P, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. Int J Clin Exp Med. 2015;8(11):20988-21000.





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

2. Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. Arch Pathol Lab Med. 2011;135(10):1269-1277.
3. Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. Am J Surg Pathol. 2003;27(11):1393-1406.
4. Tiwari AK, Roy HK, Lynch HT. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. QJM. 2016;109(3):151-158.
5. Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. Expert Rev Mol Diagn. 2016;16(5):591-604.
6. Silva FCC, Torrezan GT, Ferreira JRO, Oliveira LP, Begnami M, et al. Germline Mutations in MLH1 Leading to Isolated Loss of PMS2 Expression in Lynch Syndrome: Implications for Diagnostics in the Clinic. Am J Surg Pathol. 2017;41(6):861-864.
7. Boyer JC, Umar A, Risinger JI, Lipford JR, Kane M, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. Cancer Res. 1995;55(24):6063-6070.
8. Lawes DA, Pearson T, Sengupta S, Boulos PB. The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. Br J Cancer. 2005;93(4):472-477.
9. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med. 2003;348(10):919-932.
10. Peltomaki P. Role of ДНК mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. J Clin Oncol. 2003;21(6):1174-1179.
11. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. Cancer. 1996;78(6):1149-1167.
12. Caldes T, Godino J, Sanchez A, Corbacho C, De la Hoya M, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. Oncol Rep. 2004;12(3):621-629.
13. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, et al. Value of immunohistochemical detection of ДНК mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. Am J Surg Pathol. 2005;29(1):96-104.
14. Cunningham JM, Tester DJ, Thibodeau SN. Mutation detection in colorectal cancers : direct sequencing of ДНК mismatch repair genes. Methods Mol Med. 2001;50:87-98.
15. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. J Med Genet. 2004;41(9):664-668.
16. Jin M, Hampel H, Zhou X, Schunemann L, Yearsley M, et al. BRAF V600E mutation analysis simplifies the testing algorithm for Lynch syndrome. Am J Clin Pathol. 2013;140(2):177-183.
17. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2004;10(1 Pt 1):191-195.
18. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, et al. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. Diseases of the Colon & Rectum. 2014;57(8):1025-1048.
19. Egoavil C, Alenda C, Castillejo A, Paya A, Peiro G, et al. Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers. PLoS One. 2013;8(11):e79737.
20. Connell LC, Mota JM, Braghiroli MI, Hoff PM. The Rising Incidence of Younger Patients With Colorectal Cancer: Questions About Screening, Biology, and Treatment. Curr Treat Options Oncol. 2017;18(4):23.
21. Provenzale D, Gupta S, Ahnen DJ, Bray T, Cannon JA, et al. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2016;14(8):1010-1030.
22. Balmana J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D, Group EGW. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. Ann Oncol. 2013;24 Suppl 6:vi73-80.
23. Evaluation of Genomic Applications in P, Prevention Working G. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. Genet Med. 2009;11(1):35-41.
24. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst. 2004;96(4):261-268.
25. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. J Med Genet. 2012;49(3):151-157.
26. Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting ДНК mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. Semin Diagn Pathol. 2015;32(5):352-361.
27. Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, Gylling A, Lahtinen L, et al. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. Virchows Arch. 2013;463(5):613-621.
28. Toon CW, Chou A, DeSilva K, Chan J, Patterson J, et al. BRAFV600E immunohistochemistry in conjunction with mismatch repair status predicts survival in patients with colorectal cancer. Mod Pathol. 2014;27(5):644-650.
29. Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. Int J Cancer. 2004;108(2):237-242.
30. Carson FL, Hladik C, Cappellano CH, Pathology ASfC. Histotechnology: A Self-Instructional Text: American Society for Clinical Pathology; 2015.
31. CSLI. Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
32. Roche PC, Hsi ED, Firfer BL. Immunohistochemistry: Principles and AdvancesLManual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology, 7th Edition: American Society of Microbiology; 2006.
33. Rabinovitch A. The College of American Pathologists laboratory accreditation program. Accreditation and Quality Assurance. 2002;7(11):473-476.

## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW и логотип VENTANA являются товарными знаками Roche.

Все остальные товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

© 2019 Ventana Medical Systems, Inc. и Roche Diagnostics International, Inc.

## КОНТАКТЫ

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

www.ventana.com

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.



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

# VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody

Для использования с панелью VENTANA MMR IHC Panel

REF 760-5094

08033692001

IVD Σ 50

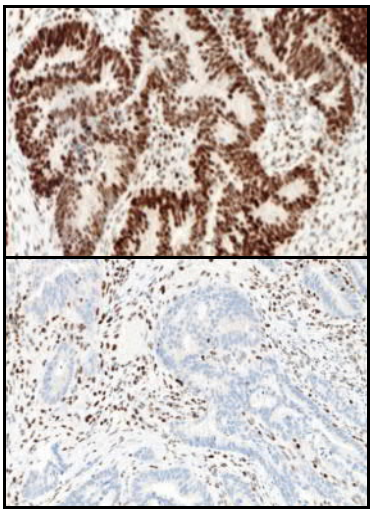


**Рисунок** 1. **Окрашивание антителом** VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody **с неизмененной экспрессией (сверху) или потерянной экспрессией (снизу) в раковой ткани толстой кишки**

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-PMS2 (A16 4)) предназначено для качественного обнаружения белка PMS2 в фиксированных формалином и залитых в парафин срезах ткани. Антитело VENTANA anti-PMS2 (A16-4) готово к применению на аппаратах серии BenchMark ULTRA, XT и GX с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit, OptiView Amplification Kit и вспомогательных реагентов.

Антитело VENTANA anti-PMS2 (A16 4) является частью панели VENTANA MMR IHC Panel, в состав которой входят VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody и VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody. Панель VENTANA MMR IHC Panel предназначена для обнаружения недостатка белка, участвующего в репарации неспаренных оснований ДНК, в качестве теста для идентификации лиц, находящихся под угрозой развития синдрома Линча, среди пациентов, которым диагностирован колоректальный рак (КРР), а также у которых выявлена мутация V600E в гене BRAF, в качестве вспомогательного средства для различения спорадического КРР и вероятного синдрома Линча в условиях отсутствия экспрессии белка MLH1.

Результаты анализов, выполненных с использованием данных продуктов, должны интерпретироваться квалифицированным патоморфологом с учетом результатов гистологического исследования, клинической картины и соответствующих контролей.

Предназначено для диагностики in vitro (IVD).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ

Колоректальный рак является третьим наиболее распространенным видом рака и четвертой по распространенности причиной смерти в мире.[1] В большинстве случаев КРР наблюдается хромосомная нестабильность, однако примерно в 15 % случаев рак развивается по альтернативному пути, характеризуемому дефектом функции системы репарации неспаренных оснований ДНК (MMR). Вследствие дефекта функции репарации неспаренных оснований (MMR) в опухолях наблюдается микросателлитная нестабильность (MSI), обусловленная неспособностью белков-репараторов (белки MMR) устранять ошибки репликации ДНК.

КРР с дефектами системы MMR обозначается как опухоль с дефицитом белков MMR (dMMR). и наоборот, КРР без дефектов системы MMR обозначается как опухоль с избытком белков MMR (pMMR). Колоректальный рак с дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR) в большинстве случаев имеет низкую дифференцировку и часто демонстрирует гистологические признаки преобладания в проксимальном отделе толстой кишки, а также муцинозного, медуллярного или перстневидноклеточного рака.. Кроме того, он характеризуется увеличением числа лимфоцитов, инфильтрующих опухоли.[2,3] В общем, дефицит репарации неспаренных оснований может быть вызван мутациями зародышевой линии в одном из генов MMR с последующей утратой соответствующей нормальной аллели посредством генетических или эпигенетических механизмов, соматическими мутациями в аллелях или эпигенетической инактивацией белка MLH1 посредством метилирования.[4]

Наиболее часто мутациям подвержены следующие четыре гена MMR: MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6. В нормальных клетках белок MLH1 формирует комплекс (гетеродимер) с белком PMS2, в то время как белок MSH2 формирует комплекс с белком MSH6.[5,6] При возникновении неспаренных оснований ДНК гетеродимер MSH2/MSH6 связывается с неспаренным основанием ДНК, провоцируя конформационное изменение. Гетеродимер MLH1/PMS2 связывается с ДНК связанным комплексом MSH2/MSH6, вызывая эксцизионную репарацию поврежденной ДНК.

Белки MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6 являются клинически значимыми белками MMR, кодируемыми генами, которые могут мутировать у пациентов, имеющих в семейном анамнезе синдром Линча.[7,8] Носители этих мутаций имеют высокий пожизненный риск развития колоректального и других форм рака ввиду накопления ошибок репликации ДНК в пролиферирующих клетках. Синдром Линча составляет 1–6 % всех случаев КРР. Такие опухоли образуются по причине наследования аутосомно-доминантной мутации зародышевой линии в одном из четырех генов MMR; при этом для большинства случаев КРР, связанного с синдромом Линча, характерна потеря экспрессии белка MLH1.[5,9,10] У пациентов с синдромом Линча было выявлено более 300 различных мутаций в семействе белков MMR. Фенотип опухоли, связанной с синдромом Линча, обычно характеризуется иммуногистохимической потерей экспрессии в белках MMR, в частности в белках MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6.[10-13] Исследование MMR методом IHC (иммуногистохимии) продемонстрировало эффективность при идентификации специфичного гена MMR, имеющего наибольшую вероятность обнаружения в нем изменения зародышевой линии или соматического изменения.[14]

Являясь частью панели VENTANA MMR IHC Panel, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) помогает дифференцировать спорадический КРР и вероятный синдром Линча при отсутствии экспрессии белка MLH1.[15,16] При КРР потеря экспрессии белка MLH1 зачастую является результатом гиперметилирования промотора MLH1 и указывает на спорадический характер заболевания.[17] Наличие белка BRAF V600E тесно связано с гиперметилированием промотора MLH1. В итоге положительный результат окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) указывает на спорадический КРР.

## КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

В 1960-х годах был впервые описан синдром Линча и была установлена связь между потерей функции MMR и развитием рака.[18] Потеря экспрессии белков MMR (MLH1, PMS2, MSH2 или MSH6) может привести к MSI и повышенному пожизненному риску развития не только КРР, но также и рака желудка, мозга, поджелудочной железы, кожи, эндометрия и яичников. Пациенты с синдромом Линча имеют 50–80 % пожизненного риска развития КРР.[5,19,20] Синдром Линча уникальным образом отличается от других наследственных раковых синдромов, поскольку проведение прямого исследования опухолевой ткани помогает в идентификации пациентов, находящихся в группе риска развития синдрома Линча, и делает последующий генетический анализ зародышевой линии более информативным. Применение расширенных протоколов скрининга онкологических заболеваний имеет благоприятное значение для семей с синдромом Линча.

Различные руководства, в том числе руководства Национальной комплексной сети онкологических учреждений (NCCN), рекомендуют проводить скрининг всех случаев КРР на предмет потенциального наличия синдрома Линча для идентификации пациентов и семей, которые получат пользу от дальнейшего генетического анализа и консультирования.[18,21-24] Использование панель VENTANA MMR IHC Panel будет способствовать определению статуса MMR КРР посредством классификации случаев КРР как имеющих неизмененную или потерянную экспрессию белка MMR. Обнаружение всех четырех белков MMR в опухоли указывает на нормальную или неизмененную функцию системы MMR. Потеря экспрессии MLH1 или MSH2 почти неизменно сопровождается потерей гетеродимерного белка-партнера PMS2 или MSH6 соответственно. Тем не менее, потеря экспрессии PMS2 или MSH6 не приводит к потере экспрессии MLH1 или MSH2. Потеря экспрессии PMS2, MSH2 и (или) MSH6 соотносится с вероятным синдромом Линча, поэтому пациентов



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

следует направлять на дополнительное тестирование и консультацию согласно клинической практике.

Потеря экспрессии белка MLH1 может указывать на спорадическое возникновение рака или потенциальный синдром Линча. В 15 % или более случаев спорадического КРР потеря экспрессии белка MLH1 происходит ввиду гиперметилирования промотора MLH1.[5,25,26] Важно отметить, что мутация BRAF V600E наблюдается приблизительно в двух третях случаев опухолей, характеризующихся потерей экспрессии MLH1 по причине гиперметилирования промотора MLH1. и напротив, мутация BRAF V600E очень редко наблюдается при опухолях, вызванных синдромом Линча.[25] Таким образом, если результат окрашивания антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-MLH1 (M1)) указывает на потерю экспрессии белка MLH1, антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) может четко определить опухоль как спорадическую или вызванную вероятным синдромом Линча.[5,27] При КРР потеря экспрессии белка MLH1 с положительным статусом BRAF V600E однозначно указывает на то, что опухоль имеет спорадический характер, фактически исключая синдром Линча из списка первопричин возникновения злокачественного новообразования.[17,28] Когда потеря экспрессии белка MLH1 сопровождается отрицательным статусом BRAF V600E, это указывает на высокую вероятность наличия синдрома Линча.[29]

## ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-PMS2 (A16-4)) представляет собой мышиное моноклональное антитело, вырабатываемое против рекомбинантного белка PMS2. Антитело VENTANA anti-PMS2 (A16-4) связывается с белком PMS2 в фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) срезах ткани. Антитело может быть обнаружено посредством гаптенированного вторичного антитела с последующей обработкой мультимерным конъюгатом HRP (пероксидазы хрена) с антителом к гаптену (OptiView DAB IHC Detection Kit, № по каталогу 760-700 / 06396500001) и OptiView Amplification Kit (№ по каталогу 760-099 / 06396518001 (50 тестов) или 860-099 / 06718663001 (250 тестов)) После этого специфический комплекс антитела и фермента визуализируется путем осаждения продукта ферментативной реакции. Каждый этап процедуры включает инкубацию в течение строго определенного промежутка времени при заданной температуре. В конце каждой инкубации каждый аппарат BenchMark ULTRA, XT и GX промывает срезы, чтобы остановить реакцию и удалить несвязавшиеся вещества, которые могут препятствовать протеканию необходимых реакций на последующих этапах. с помощью данного аппарата также наносится ULTRA LCS (ULTRA LCS (Predilute), № по каталогу 650-210 / 05424534001) или LCS (LCS predilute, № по каталогу 650-010 / 05264839001), который позволяет свести к минимуму испарение водных реагентов с поверхности предметного стекла, содержащего образец.

Помимо окраски антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4), второе предметное стекло следует окрасить мышиным моноклональным реагентом для отрицательного контроля, Negative Control (Monoclonal) (№ 760-2014 / 05266670001). Реагент для отрицательного контроля используется для оценки фонового окрашивания.

## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

Антитело VENTANA anti-PMS2 (A16-4) содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 50 анализов.

Один 5 мл дозатор с антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4) содержит приблизительно 5 мкг мышиного моноклонального антитела.

Антитело разведено в 0,08 М фосфатно-буферном солевом растворе с 3% белка-носителя и 0,05% ProClin300, в качестве консерванта.

Общая концентрация белка в реагенте составляет приблизительно 3 мг/мл. Концентрация специфических антител составляет около 1 мкг/мл. Неспецифической реактивности антител у данного продукта не обнаружено.

Антитело VENTANA anti-PMS2 (A16-4) является мышиным моноклональным антителом, полученным из супернатанта клеточной культуры.

См. соответствующую часть листка-вкладыша в упаковке набора для обнаружения VENTANA, чтобы ознакомиться с более подробным описанием: 1) принципов действия; 2) необходимых материалов и реагентов, не входящих в комплект; 3) сбора образцов тканей и подготовки к анализу; 4) процесса контроля качества; 5) принципов поиска и устранения проблем; 6) результатов; 7) общих ограничений.

## НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ МАТЕРИАЛЫ

В комплект поставки не входят красящие реагенты, например наборы для обнаружения VENTANA, а также вспомогательные компоненты, в том числе отрицательные и положительные тканевые контроли.

Для окрашивания требуются следующие реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки.

1. Дополнительные антитела панели VENTANA MMR IHC Panel:
   - VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№по каталогу 760-5091 / 08033668001)
   - VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№по каталогу 760-5093 / 08033684001)
   - VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (№по каталогу 760-5092 / 08033676001)
   - VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№по каталогу 760-5095 / 08033706001)
2. Negative Control (Monoclonal) (№ 760-2014 / 05266670001)
3. Предметные стекла для микроскопа (с положительным зарядом)
4. Этикетки со штрих-кодами (соответствующие реагенту для отрицательного контроля и используемому первичному антителу)
5. Ксилол (гистологической степени очистки)
6. Этанол или спиртосодержащий реагент (гистологической степени очистки)
   - 100%-й раствор: неразбавленный этанол или спиртосодержащий реагент.
   - 95%-й раствор: смешать 95 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 5 частями деионизированной воды.
   - 80%-й раствор: смешать 80 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 20 частями деионизированной воды.
7. Деионизированная или дистиллированная вода
8. OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700 / 06396500001)
9. OptiView Amplification Kit (№ по каталогу 760-099 / 06396518001 или № 860-099 / 06718663001)
10. EZ Prep Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-102 / 05279771001)
11. Reaction Buffer Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-300 / 05353955001)
12. ULTRA LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-210 / 05424534001) или LCS (LCS predilute № по каталогу 650-010 / 05264839001)
13. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (№ по каталогу 950-224 / 05424569001) или Cell Conditioning 1 (CC1) № по каталогу 950-124 / 05279801001)
14. Hematoxylin II (№ по каталогу 790-2208 / 05277965001)
15. Bluing Reagent (№ по каталогу 760-2037 / 05266769001)
16. Постоянная гистологическая среда для заливки образцов (Permount Fisher № по каталогу SP15-500 или эквивалентная)
17. Покровное стекло (размера, достаточного для закрытия образцов ткани, например VWR, № по каталогу 48393-060)
18. Автоматический аппарат для заключения под покровное стекло (например, Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
19. Световой микроскоп
20. Гигроскопические салфетки

## ХРАНЕНИЕ

После получения реагента и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживать.

Для обеспечения надлежащей сохранности реагента и стабильности антител после каждого использования необходимо закрывать флакон-дозатор крышкой и сразу ставить его в холодильник в вертикальном положении.

На каждом флаконе-дозаторе с раствором антител указан срок годности. При соблюдении условий хранения реагент остается стабильным до даты, указанной на этикетке. Не использовать реагент после истечения срока годности.



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

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Данное первичное антитело можно применять для окрашивания подготовленных стандартным образом, фиксированных формалином и залитых в парафин тканей, при условии использования OptiView DAB IHC Detection Kit, а также аппаратов серии BenchMark ULTRA, XT и GX.

Необходимо получить срезы толщиной приблизительно 4 мкм и нанести их на положительно заряженные предметные стекла. Для окрашивания следует использовать свежие срезы тканей, поскольку антигенность тканевых срезов со временем может уменьшаться. Одновременно с исследованием неизвестных образцов рекомендуется провести исследование на положительном и отрицательном тканевых контролях.

При использовании панели VENTANA MMR IHC Panel рекомендуется, чтобы ткань в течение 6 часов после иссечения была зафиксирована в 10 % нейтральном забуференном формалине (NBF) на 6–24 часа из расчета окрашивания в миндалинах. Приемлемое окрашивание также достигалось при фиксации цинк-формалином и фиксаторами Z-5 в течение 6–24 часов. С панелью VENTANA MMR IHC Panel не рекомендуется использовать спиртовой раствор формалина (AFA), 95 % этиловый спирт и фиксаторы PREFER, поскольку в этих случаях ткани демонстрируют нестабильные результаты окрашивания или полное их отсутствие.

Используемое количество фиксатора должно составлять от 15 до 20 объемов ткани. За 24 часа фиксатор проникает в плотную ткань не более чем на 2–3 мм, а в пористую ткань — не более чем на 5 мм. Фиксирование следует проводить при комнатной температуре (15–25 °C).[30,31]

Одновременно с исследованием неизвестных образцов рекомендуется провести исследование на положительном и отрицательном тканевых контролях.

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Устойчивость антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4) к транспортировке в условиях высоких температур и его характеристики стабильности после вскрытия упаковки в настоящее время не установлены, поэтому пользователям следует контролировать изменения стабильности при проведении окрашивания (например, усиление фонового окрашивания или снижение интенсивности окрашивания) после нескольких использований антитела.
2. Для диагностики in vitro (IVD).
3. Только для профессионального использования.
4. Раствор ProClin 300 используется в данном реагенте в качестве консерванта. Он относится к раздражающим средствам и при контакте с кожей может стать причиной сенсибилизации. При работе с реагентом соблюдайте меры предосторожности. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. Используйте защитную одежду и перчатки.
5. Материалы человеческого или животного происхождения следует считать биологически опасными материалами и утилизировать, соблюдая все необходимые меры предосторожности.
6. Избегайте контакта реагентов с глазами и слизистыми оболочками. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды.
7. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.
8. Проконсультируйтесь с местными и (или) государственными органами в отношении рекомендованного способа утилизации.
9. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Антитело VENTANA anti-PMS2 (A16-4) предназначено для использования на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX в комбинации с OptiView DAB IHC Detection Kit, OptiView Amplification Kit и вспомогательными реагентами. В таблице 1 приведен протокол окрашивания для применения с антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4). Сведения о влиянии других значений времени и температуры при демаскировке антигена на устойчивость анализа к возникновению ошибок отсутствуют. Поэтому отклонение от рекомендуемых условий для демаскировки антигена, представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными. Следует использовать и документировать надлежащие контроли. Пользователи, которые отклоняются от указанного протокола, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

Параметры автоматических процедур могут быть отображены на экране, напечатаны и отредактированы согласно процедуре, описанной в руководстве пользователя, прилагаемом к соответствующим приборам. Для получения более подробной информации об этапах процедуры иммуногистохимического окрашивания см. листок-вкладыш в упаковке OptiView DAB IHC Detection Kit.

**Таблица** 1. Рекомендуемый протокол окрашивания для антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4) с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit и OptiView Amplification Kit на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX.

| **Тип процедуры** | **Метод** | | |
|---|---|---|---|
| | BenchMark ULTRA **Аппарат** | BenchMark XT **Аппарат** | BenchMark GX **Аппарат** |
| **Депарафинирование** | Выбрано | Выбрано | Выбрано |
| **Кондиционирование клеток (демаскирование антигена)** | Cell Conditioning 1, 92 мин, 100°C | Cell Conditioning 1, 92 мин | Cell Conditioning 1, 92 мин |
| Pre-Primary Peroxidase Inhibitor | Выбрано | Выбрано | Выбрано |
| **Антитела (первичные)** | 32 минут, 36°C | 44 минут, 37 °C | 52 минут, 37 °C |
| OptiView HQ Linker | 8 мин (по умолчанию) | | |
| OptiView HRP Multimer | 8 мин (по умолчанию) | | |
| OV AMP H2O2/ OV Amplifier | 4 минуты | | |
| OV AMP Multimer | 4 минуты | | |
| **Контрастное окрашивание** | Hematoxylin II, 4 минуты | | |
| **Обработка после контрокрашивания** | Bluing, 4 минуты | | |

Отклонение от рекомендуемых условий (особенно для демаскировки антигена), представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными. Тем не менее, в связи с различиями в фиксации и обработке тканей, а также в лабораторном оборудовании и внешних условиях, может потребоваться увеличение или уменьшение времени инкубации первичных антител в зависимости от отдельных образцов и предпочтений эксперта. Подробную информацию о различиях в методиках фиксации см. в разделе Immunohistochemistry: Principles and Advances (Иммуногистохимический анализ: принципы и достижения).[32]

## ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

### Реагент для отрицательного контроля

Ventana Medical Systems, Inc. настоятельно рекомендует использовать реагент для отрицательного контроля для окрашивания смежного среза образца ткани пациента на отдельном предметном стекле, а не на предметном стекле, где образец был окрашен антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4). Мышиный моноклональный реагент для отрицательного контроля (Negative Control (Monoclonal), № по каталогу 760-2014 / 05266670001) рекомендуется для использования вместо первичного антитела для оценки неспецифического окрашивания. Параметры окрашивания антитела, используемого с реагентом для отрицательного контроля, должны соответствовать параметрам окрашивания первичного антитела.

### Положительный тканевый контроль

При выполнении каждой процедуры окрашивания необходимо проводить положительный тканевый контроль. Оптимальная лабораторная практика — помещение среза для положительного контроля на одно стекло с образцом ткани пациента. Такая практика позволяет распознать случаи, когда первичное антитело или другой важный реагент не оказывают должного эффекта на образец ткани пациента. Для оптимального контроля качества лучше всего подойдет образец



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

ткани, в норме показывающий слабое положительное окрашивание. Положительно окрашиваемые компоненты ткани служат подтверждением того, что антитела нанесены и что прибор работает надлежащим образом. Данная ткань может содержать как положительно, так и отрицательно окрашиваемые клетки или компоненты ткани и использоваться в качестве как положительного, так и отрицательного тканевого контроля. В качестве контроля следует использовать свежие образцы тканей, полученные в ходе вскрытия, биопсии или хирургических операций. Образцы следует как можно скорее подготовить или зафиксировать по процедуре, используемой для исследуемых образцов. С использованием таких образцов должен контролироваться весь процесс исследования, начиная от подготовки ткани и заканчивая окрашиванием. Использование среза ткани, фиксированного или обработанного по процедуре, отличной от процедуры тестируемого образца, позволяет обеспечить контроль всех реагентов и этапов метода, кроме фиксации и обработки ткани.

Заведомо положительные тканевые контроли следует использовать только для контроля правильности работы с обработанными тканями и тестирования реагентов, а не в качестве вспомогательного средства при постановке конкретного диагноза на основании образцов пациента. Если не наблюдается положительного окрашивания положительных тканевых контролей, результаты окрашивания тестовых образцов следует считать неверными.

Ткань КРР с белком PMS2, имеющим клинический статус «неизмененная», или нормальной тканью толстой кишки после предварительной обработки антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4), может использоваться в качестве положительного тканевого контроля. Окрашивание нормальной ткани толстой кишки антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4) будет иметь результат «неизмененная экспрессия» в отношении белка PMS2. Положительный тканевый контроль должен демонстрировать однозначное ядерное окрашивание в жизнеспособной опухоли и (или) элементах здоровой ткани толстой кишки. Внутренние клетки положительных контролей (например, лимфоциты, фибробласты или здоровый эпителий вблизи опухоли) для всех тканей должны иметь положительный результат окрашивания в ядре.

### Отрицательный тканевый контроль

Так как белки MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6 экспрессируются во всех тканях, для данных биомаркеров не существует нормального отрицательного тканевого контроля. Однако ткань КРР, в которой белок PMS2 имеет клинический статус как «потерянная», после предварительной обработки антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4), может использоваться в качестве отрицательного тканевого контроля. Отрицательный тканевый контроль следует использовать только для проверки точности характеристик обработанных тканей, исследуемых реагентов и аппаратов, но не для формулировки конкретного диагноза на основании образцов пациента.

### Верификация анализа

Перед начальным использованием антитела или системы окрашивания в диагностической процедуре следует верифицировать специфичность антитела. Для этого выполняется тестирование антитела на серии тканей с известными характеристиками эффективности IHC, представляющими статус белка PMS2 в тканях как «неизмененная». (См. «Процедуры контроля качества», описанные ранее в этом разделе листка-вкладыша, а также рекомендации по контролю качества Программы лабораторной аккредитации коллегии американских патологов (College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program), контрольной карты по патологической анатомии[33] или CLSI Approved Guideline.[31])

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОКРАШИВАНИЯ/ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Схема клеточного окрашивания для антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4) имеет ядерный характер в активно пролиферирующих клетках. Квалифицированный патоморфолог присваивает клинический статус образцам КРР, окрашенным с помощью антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4), на основании собственной оценки наличия или отсутствия специфичного ядерного окрашивания в опухолевой ткани. Клинический статус «Неизмененная» присваивается образцам с однозначным ядерным окрашиванием в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии приемлемых внутренних положительных контролей (ядерное окрашивание в лимфоцитах, фибробластах или здоровом эпителии вблизи опухоли). Клинический статус «Потерянная» присваивается образцам с однозначной потерей ядерного окрашивания или с фокальным слабым неоднозначным ядерным окрашиванием в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии внутренних положительных контролей, как показано в таблице 2.

Если во внутренних положительных контролях однозначное ядерное окрашивание отсутствует и (или) фоновое окрашивание мешает интерпретации, анализ следует считать неприемлемым. При этом необходимо провести анализ повторно. Точечное ядерное окрашивание опухолевых клеток следует считать отрицательным (потерянная экспрессия). В образцах с фокальным окрашиванием опухолевых клеток интенсивность ядерного окрашивания по меньшей мере должна быть аналогична интенсивности окрашивания внутренних положительных контролей наряду со сливающимся/непрерывным характером окрашивания ядер в нескольких эпителиальных железах или эпителиальных жемчужинах, чтобы образцу был присвоен клинический статус «Неизмененная». При отсутствии указанных условий образцу присваивается клинический статус «Потерянная».

**Таблица** 2. Интерпретация окрашивания для антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4)

| Клинический статус | Описание |
|---|---|
| **Неизмененная экспрессия** PMS2 | Однозначное ядерное окрашивание в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии внутренних положительных контролей (ядерное окрашивание в лимфоцитах, фибробластах или здоровом эпителии толстой кишки вблизи опухоли). |
| **Потерянная экспрессия** PMS2 | Однозначная потеря ядерного окрашивания или фокальное слабое неоднозначное ядерное окрашивание в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии внутренних положительных контролей. |

Образцы, окрашенные антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4), классифицируются как «неизмененная» или «потерянная» в зависимости от наличия или отсутствия специфического окрашивания в опухолевой ткани.

## ОСОБЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

Антитела и реагенты компании Ventana Medical Systems, Inc. имеют оптимальную концентрацию для применения в соответствии с прилагающейся инструкцией. Отклонение от рекомендуемых условий для демаскировки антигена, представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными. Следует использовать и документировать надлежащие контроли. Пользователи, которые отклоняются от указанного протокола, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

При использовании панели VENTANA MMR IHC Panel рекомендуется, чтобы образцы ткани были зафиксированы в 10 % нейтральном забуференном формалине на 6–24 часа в течение 6 часов после иссечения. Приемлемое окрашивание наблюдается после фиксации цинк-формалином и фиксатором Z-5 в течение 6–24 часов. Не рекомендуется фиксировать ткани в 95 % спирте, спиртовом растворе формалина с уксусной кислотой (AFA) или фиксаторах PREFER.

Анализ некоторых образцов может быть особенно сложным в связи со следующими проблемами:

- Неспецифическое фоновое окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать неспецифическое фоновое окрашивание по недостаточно понятным причинам. По этой причине оценка предметного стекла с антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4) должна включать в себя сравнение предметного стекла с срезом ткани, окрашенным реагентом для отрицательного контроля для определения уровня неспецифичного фонового окрашивания. Цитоплазматическое окрашивание (при наличии) должно игнорироваться при IHC интерпретации результатов окрашивания антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4).
- Фокальное окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать фокальное окрашивание в опухолевых клетках; интенсивность окрашивания может варьировать от слабой до сильной. На основании IHC алгоритма оценивания антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4), фокальное слабое неоднозначное ядерное окрашивание в жизнеспособных опухолевых клетках в присутствии внутренних положительных контролей должно квалифицироваться как «потерянная». Окрашивание может варьироваться в зависимости от уровня интенсивности, которая, в свою очередь, может варьироваться в зависимости от опухоли; однако интенсивность не влияет на клинический статус MMR.
- Точечное окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать дискретное точечное окрашивание в нескольких ядрах опухоли; интенсивность



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

окрашивания может варьировать от слабой до сильной. Такой характер окрашивания следует игнорировать, и если образец имеет только этот тип характера окрашивания, ему следует присвоить клинический статус «Потерянная».

- Тканевые артефакты или артефакты, вызванные окрашиванием. Гистологические артефакты, возникающие в ходе обработки образцов и микротомии, также могут осложнить определение IHC клинического статуса антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4). К таким артефактам относятся, кроме прочего, градиенты фиксации и краевые эффекты, захват DAB, образование пузырьков в ядре, недостаточное окрашивание на некоторых участках ткани, разрыв или складки ткани и потеря среза ткани. В некоторых случаях может потребоваться повторное окрашивание новых срезов или получение нового образца.

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИТЕЛА VENTANA ANTI-PMS2 (A16-4)

### Аналитическая чувствительность/специфичность

Аналитическая чувствительность и специфичность были определены посредством окрашивания множественных образцов нормальных и опухолевых тканей человека антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4). Результаты приведены в Таблица 3 и таблице 4. Положительное окрашивание является ядерным, если не указано иное. В результате окрашивания нормальных и опухолевых тканей антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4) непредвиденных результатов получено не было. Как и ожидалось, поскольку репарация неспаренных оснований присутствует во всех активно пролиферирующих клетках, большинство здоровых и опухолевых тканей продемонстрировали положительное окрашивание.

**Таблица** 3. Аналитическая чувствительность/специфичность окрашивания FFPE нормальных тканей антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4)

| Ткань | Кол-во положительных случаев/ общее кол-во случаев | Ткань | Кол-во положительных случаев/ общее кол-во случаев |
|---|---|---|---|
| Надпочечник | 3/3 | Легкое | 3/3 |
| Мочевой пузырь | 3/3 | Лимфоузлы | 3/3 |
| Костный мозг | 3/3 | Мезотелий | 2/3 |
| Яичник | 4/4 | Поджелудочная железа | 3/3 |
| Молочная железа | 3/3 | Паращитовидная железа | 3/3 |
| Мозжечок | 3/3 | Периферический нерв | 4/4 |
| Головной мозг | 3/3 | Простата | 3/3 |
| Шейка матки | 3/3 | Скелетная мышца | 2/3 |
| Толстая кишка | 3/3 | Кожа | 3/3 |
| Эндометрий | 3/3 | Селезенка | 3/3 |
| Пищевод | 3/3 | Желудок | 3/3 |
| Сердце | 2/3 | Яичко | 3/3 |
| Гипофиз | 3/3 | Тимус | 3/3 |
| Стенка кишечника | 3/3 | Щитовидная железа | 4/4 |
| Почка | 3/3 | Язык/слюнная железа | 3/3 |
| Печень | 3/3 | Миндалины | 3/3 |

Примечание. Белки репарации неспаренных оснований, такие как PMS2, присутствуют во всех клетках с активной пролиферацией. Для всех тканей положительное/отрицательное окрашивание определялось для тканеспецифичных элементов при наличии положительного окрашивания в здоровых контрольных клетках (лимфоцитах, фибробластах и эпителиальных клетках).

**Таблица** 4. Аналитическая чувствительность/специфичность окрашивания различных FFPE опухолевых тканей антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4)

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Глиобластома (головной мозг) | 1/1 |
| Эпендимома (головной мозг) | 1/1 |
| Олигодендроглиома (головной мозг) | 1/1 |
| Серозная аденокарцинома (яичник) | 1/1 |
| Аденокарцинома (яичник) | 1/1 |
| Панкреато-нейроэндокринное новообразование (поджелудочная железа) | 1/1 |
| Семинома (яичко) | 2/2 |
| Медуллярная карцинома (щитовидная железа) | 1/1 |
| Папиллярная карцинома (щитовидная железа) | 1/1 |
| Протоковая карцинома in situ (молочная железа) | 1/1 |
| Микроинвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 1/1 |
| Инвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 1/1 |
| Мелкоклеточная карцинома (легкое) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (легкое) | 1/1 |
| Нейроэндокринная карцинома (пищевод) | 1/1 |
| Перстневидноклеточная карцинома (желудок) | 1/1 |
| Аденокарцинома (тонкая кишка) | 1/1 |
| Стромальная саркома (тонкая кишка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (толстая кишка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (прямая кишка) | 1/1 |
| Гастроинтестинальная стромальная опухоль (GIST) (прямая кишка) | 1/1 |
| Гепатобластома (печень) | 1/1 |
| Светлоклеточная карцинома (почка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (предстательная железа) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (шейка матки) | 1/1 |



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

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Эмбриональная рабдомиосаркома (поперечно-полосатая мускулатура) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (кожа) | 1/1 |
| Нейробластома (забрюшинное пространство) | 1/1 |
| Мезотелиома (брюшина) | 1/1 |
| В-клеточная лимфома, неуточненная (лимфатический узел) | 2/2 |
| Лимфома Ходжкина (Hodgkin) (лимфатический узел) | 1/1 |
| Лейомиосаркома (мочевой пузырь) | 1/1 |
| Остеосаркома | 1/1 |
| Лейомиосаркома (гладкая мускулатура) | 1/1 |

Примечание. Белки репарации неспаренных оснований, такие как PMS2, присутствуют во всех клетках с активной пролиферацией. Для всех тканей положительное/отрицательное окрашивание определялось для опухолевых клеток при наличии положительного окрашивания в здоровых контрольных клетках (лимфоцитах, фибробластах и эпителиальных клетках).

### Внутрисуточная повторяемость и межсуточная прецизионность

Повторяемость и прецизионность окрашивания антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4) оценивались на аппарате BenchMark ULTRA в сочетании с OptiView DAB IHC Detection Kit и OptiView Amplification Kit.

Внутрисуточная повторяемость оценивалась с использованием 10 образцов КРР (5 с неизмененной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией PMS2). Пять реплицированных предметных стекол каждого из образцов КРР окрашивались антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4) на одном аппарате BenchMark ULTRA в один день. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им статус «Неизмененная» или «Потерянная».

Межсуточная прецизионность также оценивалась с использованием 10 образцов КРР (5 с неизмененной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией PMS2). Реплицированные предметные стекла каждого из образцов КРР окрашивались антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4) на аппарате BenchMark ULTRA в каждый из 5 непоследовательных дней. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им статус «Неизмененная» или «Потерянная».

Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5. На основании объединенных данных всех возможных парных сочетаний исследования внутрисуточной повторяемости и межсуточной прецизионности продемонстрировали 100%-е совпадение положительных результатов (PPA), 100%-е совпадение отрицательных результатов (NPA) и общее 100%-е совпадение результатов (OPA). Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 5.

**Таблица** 5. Внутрисуточная повторяемость и межсуточная прецизионность окрашивания антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4), согласно выявленному клиническому статусу (неизмененная или потерянная)

| Повторяемость/ Точность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Внутрисуточная повторяемость | Неизмененная | PPA | 25/25 | 100,0 | (86,7; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 25/25 | 100,0 | (86,7; 100,0) |
| | Всего | OPA | 50/50 | 100,0 | (92,9; 100,0) |
| Межсуточная прецизионность | Неизмененная | PPA | 50/50 | 100,0 | (92,9; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 50/50 | 100,0 | (92,9; 100,0) |
| | Всего | OPA | 100/100 | 100,0 | (96,3; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

### Прецизионность между разными аппаратами BenchMark

Прецизионность между разными аппаратами BenchMark ULTRA для антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4) определялась методом окрашивания реплицированных предметных стекол с 10 образцами КРР (5 с неизмененной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией PMS2) на 3 аппаратах BenchMark ULTRA с применением антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4) и использованием OptiView DAB IHC Detection Kit и OptiView Amplification Kit. Реплицированные предметные стекла каждого из образцов КРР окрашивались антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4) на 3 аппаратах BenchMark ULTRA.

Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел оценку их клинического статуса («Неизмененная» или «Потерянная»). Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5.

При определении прецизионности между разными аппаратами BenchMark ULTRA был проведен сравнительный анализ пар клинического статуса предметных стекол для каждого образца между аппаратами и продемонстрированными 100% PPA, NPA и OPA. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 6.

**Таблица** 6. Прецизионность между разными аппаратами BenchMark ULTRA для антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4), согласно выявленному клиническому статусу (неизмененная или потерянная)

| Точность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Между разными аппаратами | Неизмененная | PPA | 30/30 | 100,0 | (88,6; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 30/30 | 100,0 | (88,6; 100,0) |
| | Всего | OPA | 60/60 | 100,0 | (94,0; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

Кроме того, прецизионность между разными аппаратами для антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4) определялась методом окрашивания реплицированных предметных стекол с 6 образцами КРР (4 с неизмененной экспрессией и 2 с потерянной экспрессией PMS2) на 3 аппаратах BenchMark XT и 3 аппаратах BenchMark GX с применением антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4) и использованием OptiView DAB IHC Detection Kit.

Было проведено 15 наблюдений на каждый образец при объединении 3 аппаратов; медиана для каждого образца определялась по этим 15 наблюдениям. Индивидуальные наблюдения одного и того же образца считались согласующимися с медианной интенсивностью сигнала образца, если их интенсивность находилась в пределах 0,5. При определении прецизионности между аппаратами BenchMark XT



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

и BenchMark GX для каждого образца был выполнен сравнительный анализ пар по уровню интенсивности окрашивания опухолевой ткани. Результаты были следующими: 100 % OPA между 3 аппаратами BenchMark XT и 100 % OPA между 3 аппаратами BenchMark GX. Для всех предметных стекол уровень фонового окрашивания был приемлемым (≤ 0,5) как на аппаратах BenchMark XT, так и на аппаратах GX.

### Конкордантность платформы BenchMark

Конкордантность между аппаратами BenchMark ULTRA, XT и GX для антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4) была определена методом окрашивания образцов КРР антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4) с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit. Клинический статус всех предметных стекол (неизмененная/потерянная) оценивался одним и тем же патоморфологом.

Между платформами было проведено парное сравнение образцов КРР, в том числе сравнение GX с ULTRA (135 образцов с неизмененной экспрессией и 32 с потерянной экспрессией); сравнение GX с XT (126 образцов с неизмененной экспрессией и 30 с потерянной экспрессией); и сравнение ULTRA с XT (135 образцов с неизмененной экспрессией и 31 с потерянной экспрессией). Все парные сравнения, выполненные между платформами, продемонстрировали 100%-е среднее совпадение положительных результатов (APA), среднее совпадение отрицательных результатов (ANA) и OPA.

### Исследования прецизионности оценок эксперта

Прецизионность по каждому эксперту и между экспертами оценивалась по 20 образцам КРР (13 с неизмененной экспрессией и 7 с потерянной экспрессией), окрашенным антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4) и OptiView DAB IHC Detection Kit с OptiView Amplification Kit. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца.

Все пары предметных стекол были рандомизированы и оценивались 3 патоморфологами на предмет клинического статуса PMS2 «неизмененная» или «потерянная». Патоморфологам был неизвестен диагноз образцов. После четырехнедельного отмывочного периода окрашенные антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4) предметные стекла были повторно рандомизированы для проведения второй оценки клинического статуса PMS2 каждым из 3 патоморфологов. Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5.

Для определения прецинзионности по каждому эксперту сравнивали исходную и итоговую оценки слайда, полученные от одного и того же патоморфолога. Всего было выполнено сравнение 20 предметных стекол (20 образцов КРР) на каждого патоморфолога. Сравнения 3 патоморфологов были объединены и продемонстрировали 100% APA, 100% ANA и 100% OPA для прецинзионности по каждому эксперту. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 7.

Для определения прецизионности между экспертами сравнивали все оценки предметных стекол (20 КРР x 2 оценки/образец x 3 патоморфолога = 120 оценок предметных стекол) со статусом модального образца для каждого образца КРР. Результаты демонстрируют 100 % PPA, NPA и OPA для прецизионности между экспертами. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 7.

**Таблица** 7. Прецизионность по каждому эксперту и между экспертами антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4) для образцов КРР, согласно выявленному клиническому статусу PMS2 (неизмененная/потерянная)

| Точность | Клинический Статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| По каждому эксперту | Неизмененная | APA | 78/78 | 100,0 | (95,3; 100,0) |
| | Потерянная | ANA | 42/42 | 100,0 | (91,2;100,0) |
| | Всего | OPA | 60/60 | 100,0 | (94,0; 100,0) |
| Между экспертами | Неизмененная | PPA | 78/78 | 100,0 | (95,3; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 42/42 | 100,0 | (91,6;100,0) |
| | Всего | OPA | 120/120 | 100,0 | (96,9; 100,0) |

Примечание. Для оценки по каждому эксперту 95% доверительные интервалы для APA и ANA были рассчитаны по методу Клоппера-Пирсона; 95% доверительный интервал для OPA 95% CI был рассчитан по методу бутстреп. Для оценки между экспертами 95% доверительные интервалы были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

### Прецизионность между партиями

Прецизионность между партиями антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4) была определена методом анализа 3 производственных партий антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4), каждая с использованием строенных предметных стекол из 10 образцов КРР (5 с неизмененной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией PMS2) на аппарате BenchMark ULTRA с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit и OptiView Amplification Kit.

Каждое окрашенное VENTANA anti-PMS2 (A16-4) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Пары предметных стекол были рандомизированы, а затем их оценку провел один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов и номер партии антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4). Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5.

При определении прецизионности между партиями антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4) все оценки предметных стекол сравнивались со статусом модального образца для каждого образца КРР. Показатель OPA для статусов между партиями антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4) составил 100 %, продемонстрировав, что окрашивание антителом VENTANA anti-PMS2 (A16-4) является воспроизводимым между партиями антитела.

Сводные данные полученных результатов для анализа прецизионности между партиями антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4) приведены в таблице 8.

**Таблица** 8. Прецизионность между партиями антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4), согласно выявленному клиническому статусу (неизмененная или потерянная)

| Точность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Между партиями | Неизмененная | PPA | 44/44 | 100,0 | (92,0; 100,0) |
| | Потерянная | NPA | 43/43 | 100,0 | (91,8;100,0) |
| | Всего | OPA | 87/87 | 100,0 | (95,8;100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

### Исследование воспроизводимости результата между лабораториями

Исследование воспроизводимости результата между лабораториями для панели VENTANA MMR IHC Panel было проведено для демонстрации воспроизводимости каждого анализа панели VENTANA MMR IHC Panel для определения клинического статуса. В исследование было включено 6 образцов ткани КРР (3 с неизмененной экспрессией и 3 с потерянной экспрессией) для каждого белка MMR и 16 образцов ткани КРР (8 положительных и 8 отрицательных) для определения BRAF V600E. Циклы проводились на 3 аппаратах BenchMark ULTRA в каждый из 5 непоследовательных дней за 21-дневный период в трех независимых лабораториях. Каждое окрашенное антителом предметное стекло объединялось с H&E (гематоксилином и эозином) и предметным стеклом, окрашенным реагентом для отрицательного контроля, из того же образца. Все наборы предметных стекол были рандомизированы и оценены в общей сложности 6 экспертами (по 2 в каждом исследовательском центре), которые не знали заранее, каков клинический статус



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

MMR в образцах набора исследования. Для каждого из 40 образцов в исследовании было проведено 30 наблюдений по всем дням, исследовательским центрам и экспертам. Эталонный статус модального образца был получен для каждого образца на основании наиболее часто наблюдаемого статуса в 30 наблюдениях. Всего в исследовании было проведено 1200 наблюдений для всех пяти белков. Для всех оцениваемых образцов уровень приемлемости в отношении морфологических структур и фона в данном исследовании составил 100 %. Сводные данные по объединенным (для всех пяти белков) статистическим показателям совпадений между эталонным статусом модального образца и индивидуальными наблюдениями приведены в таблице 9.

**Таблица** 9. Совпадения между панелью VENTANA MMR IHC Panel и эталонным статусом модального образца

| Межлабораторная повторяемость | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Все белки | Неизмененная/ положительный | PPA | 598/600 | 99,8 | (98,7; 100,0) |
| | Потерянная/ отрицательный | NPA | 593/600 | 98,9 | (97,4; 99,5) |
| | Всего | OPA | 1191/1200 | 99,4 | (98,6; 99,7) |

Примечание. Клинический статус определяется как «неизмененная» или «потерянная» для экспрессии белка MMR или «положительный» или «отрицательный» для белка BRAF V600E Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием подхода на основе обобщенной оценочной модели со смешанными эффектами (GLMM).

Кроме того, для антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4) были проведены парные сравнения между исследовательскими центрами, межсуточными показателями и показателями между экспертами. Для PMS2 этот набор исследований включал в общем 180 наблюдений. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 10. Данные обозначают повторяемость анализа по 5 дням, 3 исследовательским центрам и 6 экспертам.

**Таблица** 10. Показатели парных совпадений межлабораторной воспроизводимости для антитела VENTANA anti-PMS2 (A16-4), согласно выявленному клиническому статусу (неизмененная или потерянная)

| Межлабораторная повторяемость | | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Между исследовательскими центрами (3 исследовательских центра) | | APA | 344/360 | 95,6 | (90,7; 100,0) |
| | | ANA | 344/360 | 95,6 | (90,7; 100,0) |
| | | OPA | 344/360 | 95,6 | (91,1;100,0) |
| Межсуточная (5 непоследовательных дней) | Лаборатория A | APA | 120/120 | 100,0 | (96,9; 100,0) |
| | | ANA | 120/120 | 100,0 | (96,9; 100,0) |
| | | OPA | 120/120 | 100,0 | (96,9; 100,0) |
| | Лаборатория B | APA | 120/120 | 100,0 | (96,9; 100,0) |
| | | ANA | 120/120 | 100,0 | (96,9; 100,0) |
| | | OPA | 120/120 | 100,0 | (96,9; 100,0) |
| | Лаборатория C | APA | 104/120 | 86,7 | (69,2; 100,0) |
| | | ANA | 104/120 | 86,7 | (69,2; 100,0) |
| | | OPA | 104/120 | 86,7 | (73,3;100,0) |
| | | APA | 90/90 | 100,0 | (95,9; 100,0) |
| | | ANA | 90/90 | 100,0 | (95,9; 100,0) |

| Межлабораторная повторяемость | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Между экспертами (2 патоморфолога на исследовательский центр) | OPA | 90/90 | 100,0 | (95,9; 100,0) |

Примечание. Значения 95 % доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп; в случаях, где показатель точечной оценки составлял 100 %, использовался метод оценки Уилсона.

### Исследование точности: сравнение метода получения результатов с использованием панели VENTANA MMR IHC Panel и молекулярного тестирования (секвенирование ДНК и гиперметилирование промотора MLH1)

Исследование было проведено для сравнения эффективности использования панели VENTANA MMR IHC Panel и молекулярного тестирования, в том числе комплексной панели образцов тканей толстой кишки для секвенирования ДНК с целью идентификации КРР, который (i) характеризуется дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR) и (ii) содержит мутацию BRAF V600E. Панель образцов тканей толстой кишки для секвенирования ДНК включала геномный анализ вариаций, присутствующих в генах MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, EPCAM), BRAF и других генах, играющих важное значение при канцерогенезе (например PIK3CA, KRAS, NRAS, ERBB2 и т. д.). Секвенирование включало все экзоны, интронные и фланкирующие последовательности, а также значимые делеции, дупликации и мозаицизм.

Для исследования последовательности образцов КРР окрашивались H&E и оценивались на предмет надлежащей фиксации и морфологии, включая наличие клеточных элементов (опухоль и клетки внутренних контролей). Каждый образец оценивали, чтобы определить, состоит ли образец из опухолевых клеток как минимум на 50 %. Такая оценка была проведена для обеспечения достаточного количества опухолевых клеток в образце согласно рекомендациям для проведения молекулярного тестирования. После оценки в исследование было включено 105 образцов, соответствующих этим критериям. Кроме того, были включены 13 образцов КРР, демонстрирующих клинический статус «Потерянная» при исследовании методом IHC, чтобы гарантировать, что потеря экспрессии каждого маркера будет отражена в исследовании. Срезы всех образцов исследования были окрашены методом IHC с использованием панели VENTANA MMR IHC Panel и соответствующих реагентов отрицательного контроля. Дополнительные срезы были обработаны с помощью панели образцов ткани толстой кишки для секвенирования ДНК. Гиперметилирование промотора MLH1 — один из механизмов, который может привести к потере экспрессии белка MLH1, и его связывают со спорадическим КРР, а не с потенциальным синдромом Линча. Поэтому все образцы с потерей экспрессии MLH1, идентифицированные методом IHC при проведении исследования, были проанализированы на предмет гиперметилирования промотора MLH1.

С окончательным набором исследования, состоящим из 118 образцов, в анализ были включены показатели PPA и NPA для всех объединенных маркеров (т. е. все объединенные наблюдаемые значения), при этом молекулярное тестирование выступало в качестве эталона для сравнения IHC. Анализ включал в себя сравнение статуса белка MMR (неизмененная/потерянная) с молекулярным статусом, определенным как «нормальный» (нет патогенных мутаций, отрицателен в отношении гиперметилирования промотора MLH1 и BRAF дикого типа (отсутствие мутации V600E)) или «аномальный» (наличие патогенных мутаций, положителен в отношении гиперметилирования промотора MLH1 и (или) положителен в отношении мутации BRAF V600E). Показатели точечной оценки составили 99,4 % PPA, 93,5 % NPA и 98,8 % OPA, как показано в таблице 11.

Также был проведен сводный анализ для сравнения четырех IHC маркеров MMR (без антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) с результатами молекулярного тестирования. Показатели точечной оценки составили 99,3 % PPA, 89,7 % NPA и 98,5 % OPA, как показано в таблице 12.

В рамках дополнительного анализа сравнили результаты исследования методом IHC для четырех маркеров MMR с результатами молекулярного тестирования генов MMR на уровне одного образца, чтобы включить в исследование статус всех маркеров и получить результат dMMR/pMMR при использовании двух методов.



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

Результаты данного анализа представлены в таблице 13, OPA при применении двух методов составляет 97,4 %.

В рамках исследования было выполнено сравнение статуса MMR при исследовании методом IHC и статуса молекулярного тестирования генов MMR для отдельных маркеров MMR. Показатель OPA для каждого маркера MMR при сравнении с объединенными результатами панели образцов ткани толстой кишки для секвенирования ДНК и анализа гиперметилирования промотора MLH1 составлял 100,0 % для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), 99,1 % для VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, 98,3 % для VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody и 96,6 % для VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

Клинический статус BRAF V600E в образцах КРР, полученных методом IHC с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), также сравнивался с результатами оценки мутационного статуса BRAF, определенными с помощью секвенирования ДНК. Показатели PPA, NPA и OPA IHC тестирования с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и применением метода секвенирования ДНК в качестве эталона составили 100 % (таблица 14). Было проведено дополнительное тестирование для подтверждения способности антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) к четкому определению образцов КРР, демонстрирующих потерю экспрессии белка MLH1. Из 23 образцов, положительных в отношении BRAF V600E, в 20 методом IHC была выявлена потеря экспрессии белка MLH1, и они были положительны в отношении гиперметилирования промотора MLH1. Эти данные указывают на тесную связь положительного статуса BRAF V600E и статуса гиперметилирования промотора MLH1. Оставшиеся образцы представляли собой образцы с pMMR (неизмененная экспрессия для всех белков MMR). Все образцы, положительные на BRAF V600E, идентифицировали как образцы со спорадическим КРР. Результаты подтвердили, что антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) правильно идентифицирует образцы КРР, имеющие мутацию BRAF V600E. Также данные подтвердили возможность использования антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) для дифференциации спорадического КРР и вероятного синдрома Линча при отсутствии экспрессии белка MLH1.

**Таблица** 11. Совокупный анализ для совпадений панели VENTANA MMR IHC Panel между IHC и молекулярным тестированием

| **Статус*** (**Молекулярное тестирование**/IHC) | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| Нормальныйя/ неизмененная | PPA | 523/526 | 99,4 | (98,7; 100,0) |
| Аномальный/ потерянная | NPA | 58/62 | 93,5 | (87,1; 98,6) |
| Всего | OPA | 581/588 | 98,8 | (98,0; 99,7) |

* При использовании метода IHC статус экспрессии белка системы MMR — неизмененная или потерянная. Для этого анализа отрицательные и положительные на BRAF V600E образцы были включены в категории «Неизмененная» или «Потерянная» соответственно. Молекулярное тестирование указывает на отсутствие (нормальный) или присутствие (аномальный) потенциальных патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп.

**Таблица** 12. Совокупный анализ совпадений четырех IHC маркеров MMR (без антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) между IHC и молекулярным тестированием

| **Статус*** (**Молекулярное тестирование**/IHC) | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| Нормальныйя/ неизмененная | PPA | 428/431 | 99,3 | (98,4; 100,0) |
| Аномальный/ потерянная | NPA | 35/39 | 89,7 | (79,4; 97,7) |
| Всего | OPA | 463/470 | 98,5 | (97,3; 99,6) |

* При использовании метода IHC статус экспрессии белка — неизмененная или потерянная. Молекулярное тестирование указывает на отсутствие (нормальный) или присутствие (аномальный) потенциальных патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп.

**Таблица** 13. Совпадения четырех маркеров MMR при исследовании методом IHC и результатов молекулярного тестирования для определения статуса MMR (dMMR/pMMR)

| **Статус** MMR* | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| pMMR | PPA | 79/80 | 98,8 | (93,3; 99,8) |
| dMMR | NPA | 35/37 | 94,6 | (82,3; 98,5) |
| Всего | OPA | 114/117 | 97,4 | (92,7; 99,1) |

* При использовании метода IHC статус pMMR образца формулируется как «Неизмененная» для всех MMR-белков, в то время как при статусе dMMR наблюдается потеря экспрессии одного или нескольких MMR-белков. В рамках молекулярного тестирования статус pMMR представляет собой отсутствие патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1, в то время как статус dMMR представляет собой наличие патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

**Таблица** 14. Совпадения между методом IHC с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и молекулярным тестированием

| BRAF V600E **Статус** (**Молекулярное тестирование**/IHC) | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| Положительный/ аномальный | PPA | 23/23 | 100,0 | (85,7; 100,0) |
| Отрицательный/ нормальный | NPA | 95/95 | 100,0 | (96,1; 100,0) |
| Всего | OPA | 118/118 | 100,0 | (96,8; 100,0) |

Статус для BRAF V600E был определен как «положительный» или «отрицательный» по результатам IHC и «аномальный» (присутствие мутации V600E) или «нормальный» (BRAF дикого типа) по результатам молекулярного тестирования. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ


1. Yuan L, Chi Y, Chen W, Chen X, Wei P, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. Int J Clin Exp Med. 2015;8(11):20988-21000.
2. Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. Arch Pathol Lab Med. 2011;135(10):1269-1277.
3. Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. Am J Surg Pathol. 2003;27(11):1393-1406.
4. Tiwari AK, Roy HK, Lynch HT. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. QJM. 2016;109(3):151-158.
5. Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. Expert Rev Mol Diagn. 2016;16(5):591-604.
6. Silva FCC, Torrezan GT, Ferreira JRO, Oliveira LP, Begnami M, et al. Germline Mutations in MLH1 Leading to Isolated Loss of PMS2 Expression in Lynch Syndrome: Implications for Diagnostics in the Clinic. Am J Surg Pathol. 2017;41(6):861-864.





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

7. Boyer JC, Umar A, Risinger JI, Lipford JR, Kane M, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. Cancer Res. 1995;55(24):6063-6070.
8. Lawes DA, Pearson T, Sengupta S, Boulos PB. The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. Br J Cancer. 2005;93(4):472-477.
9. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med. 2003;348(10):919-932.
10. Peltomaki P. Role of ДНК mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. J Clin Oncol. 2003;21(6):1174-1179.
11. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. Cancer. 1996;78(6):1149-1167.
12. Caldes T, Godino J, Sanchez A, Corbacho C, De la Hoya M, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. Oncol Rep. 2004;12(3):621-629.
13. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, et al. Value of immunohistochemical detection of ДНК mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. Am J Surg Pathol. 2005;29(1):96-104.
14. Cunningham JM, Tester DJ, Thibodeau SN. Mutation detection in colorectal cancers : direct sequencing of ДНК mismatch repair genes. Methods Mol Med. 2001;50:87-98.
15. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. J Med Genet. 2004;41(9):664-668.
16. Jin M, Hampel H, Zhou X, Schunemann L, Yearsley M, et al. BRAF V600E mutation analysis simplifies the testing algorithm for Lynch syndrome. Am J Clin Pathol. 2013;140(2):177-183.
17. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2004;10(1 Pt 1):191-195.
18. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, et al. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. Diseases of the Colon & Rectum. 2014;57(8):1025-1048.
19. Egoavil C, Alenda C, Castillejo A, Paya A, Peiro G, et al. Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers. PLoS One. 2013;8(11):e79737.
20. Connell LC, Mota JM, Braghiroli MI, Hoff PM. The Rising Incidence of Younger Patients With Colorectal Cancer: Questions About Screening, Biology, and Treatment. Curr Treat Options Oncol. 2017;18(4):23.
21. Provenzale D, Gupta S, Ahnen DJ, Bray T, Cannon JA, et al. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2016;14(8):1010-1030.
22. Balmana J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D, Group EGW. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. Ann Oncol. 2013;24 Suppl 6:vi73-80.
23. Evaluation of Genomic Applications in P, Prevention Working G. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. Genet Med. 2009;11(1):35-41.
24. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst. 2004;96(4):261-268.
25. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. J Med Genet. 2012;49(3):151-157.
26. Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting DNA mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. Semin Diagn Pathol. 2015;32(5):352-361.
27. Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, Gylling A, Lahtinen L, et al. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. Virchows Arch. 2013;463(5):613-621.
28. Toon CW, Chou A, DeSilva K, Chan J, Patterson J, et al. BRAFV600E immunohistochemistry in conjunction with mismatch repair status predicts survival in patients with colorectal cancer. Mod Pathol. 2014;27(5):644-650.
29. Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. Int J Cancer. 2004;108(2):237-242.
30. Carson FL, Hladik C, Cappellano CH, Pathology ASfC. Histotechnology: A Self-Instructional Text: American Society for Clinical Pathology; 2015.
31. CSLI. Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
32. Roche PC, Hsi ED, Firfer BL. Immunohistochemistry: Principles and Advances. Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology, 7th Edition: American Society of Microbiology; 2006.
33. Rabinovitch A. The College of American Pathologists laboratory accreditation program. Accreditation and Quality Assurance. 2002;7(11):473-476.

## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW и логотип VENTANA являются товарными знаками Roche.

Все остальные товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

© 2019 Ventana Medical Systems, Inc. и Roche Diagnostics International, Inc.

## КОНТАКТЫ

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

www.ventana.com

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.



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

# VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody

Для использования с панелью VENTANA MMR IHC Panel

REF 760-5095

08033706001

IVD Σ 50

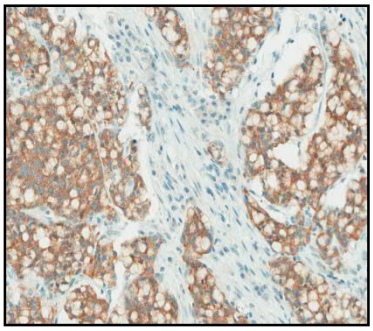


**Рисунок** 1. **Окрашивание опухолевых клеток в раковой ткани толстой кишки антителом** VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)антитело) предназначено для качественного обнаружения V600E в белке BRAF в фиксированных формалином и залитых в парафином срезах ткани. Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) готово к применению на аппаратах серии BenchMark ULTRA, XT и GX с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit и вспомогательных реагентов.

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) является частью панели VENTANA MMR IHC Panel, в состав которой входят VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody и VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody. Панель VENTANA MMR IHC Panel предназначена для обнаружения недостатка белка, участвующего в репарации неспаренных оснований ДНК, в качестве теста для идентификации лиц, находящихся под угрозой развития синдрома Линча, среди пациентов, которым диагностирован колоректальный рак (КРР), а также у которых выявлена мутация V600E в гене BRAF, в качестве вспомогательного средства для различения спорадического КРР и вероятного синдрома Линча в условиях отсутствия экспрессии белка MLH1.

Результаты анализов, выполненных с использованием данных продуктов, должны интерпретироваться квалифицированным патоморфологом с учетом результатов гистологического исследования, клинической картины и соответствующих контролей.

Предназначено для диагностики in vitro (IVD).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

Колоректальный рак является третьим наиболее распространенным видом рака и четвертой по распространенности причиной смерти в мире.[1] В большинстве случаев КРР наблюдается хромосомная нестабильность, однако примерно в 15 % случаев рак развивается по альтернативному пути, характеризуемому дефектом функции системы репарации неспаренных оснований ДНК (MMR). Вследствие дефекта функции репарации неспаренных оснований (MMR) в опухолях наблюдается микросателлитная нестабильность (MSI), обусловленная неспособностью белков-репараторов (белки MMR) устранять ошибки репликации ДНК.

КРР с дефектами системы MMR обозначается как опухоль с дефицитом белков MMR (dMMR). И наоборот, КРР без дефектов системы MMR обозначается как опухоль с избытком белков MMR (pMMR). Колоректальный рак с дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR) в большинстве случаев имеет низкую дифференцировку и часто демонстрирует гистологические признаки преобладания в проксимальном отделе толстой кишки, а также муцинозного, медуллярного или перстневидноклеточного рака. Кроме того, он характеризуется увеличением числа лимфоцитов, инфильтрующих опухоли.[2,3] В общем, дефицит репарации неспаренных оснований может быть вызван мутациями зародышевой линии в одном из генов MMR с последующей утратой соответствующей нормальной аллели посредством генетических или эпигенетических механизмов, соматическими мутациями в аллелях или эпигенетической инактивацией белка MLH1 посредством метилирования.[4]

Наиболее часто мутациям подвержены следующие четыре гена MMR: MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6. В нормальных клетках белок MLH1 формирует комплекс (гетеродимер) с белком PMS2, в то время как белок MSH2 формирует комплекс с белком MSH6.[5,6] При возникновении неспаренных оснований ДНК гетеродимер MSH2/MSH6 связывается с неспаренным основанием ДНК, провоцируя конформационное изменение. Гетеродимер MLH1/PMS2 связывается с ДНК-связанным комплексом MSH2/MSH6, вызывая эксцизионную репарацию поврежденной ДНК.

Белки MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6 являются клинически значимыми белками MMR, кодируемыми генами, которые могут мутировать у пациентов, имеющих в семейном анамнезе синдром Линча.[7,8] Носители этих мутаций имеют высокий пожизненный риск развития колоректального и других форм рака ввиду накопления ошибок репликации ДНК в пролиферирующих клетках. Синдром Линча составляет 1–6 % всех случаев КРР. Такие опухоли образуются по причине наследования аутосомно-доминантной мутации зародышевой линии в одном из четырех генов MMR; при этом для большинства случаев КРР, связанного с синдромом Линча, характерна потеря экспрессии белка MLH1.[5,9,10] У пациентов с синдромом Линча было выявлено более 300 различных мутаций в семействе белков MMR. Фенотип опухоли, связанной с синдромом Линча, обычно характеризуется иммуногистохимической потерей экспрессии в белках MMR, в частности в белках MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6.[10-13] Исследование MMR методом IHC (иммуногистохимии) продемонстрировало эффективность при идентификации специфичного гена MMR, имеющего наибольшую вероятность обнаружения в нем изменения зародышевой линии или соматического изменения.[14]

Ген BRAF расположен на хромосоме 7q34, кодирующей цитоплазматическую серин-треонин киназу, которая действует после сигнального пути митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK). Онкогенные мутации в гене BRAF, происходящие исключительно в домене киназы, постоянно активируют сигнальный путь MAPK. Это приводит к усилению пролиферации клеток и повышению устойчивости к апоптозу. Наиболее распространенная из всех активирующих мутаций BRAF (точечная мутация T1799A) приводит к замещению валина (V) на глутаминовую кислоту (E) в положении 600 аминокислотной последовательности и обнаруживается в 12% всех случаев КРР.[15,16]

Являясь частью панели VENTANA MMR IHC Panel, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) помогает дифференцировать спорадический КРР и вероятный синдром Линча при отсутствии экспрессии белка MLH1.[17,18] При КРР отсутствие белка MLH1 зачастую является результатом гиперметилирования промотора MLH1 и указывает на спорадический характер заболевания.[19] Наличие белка BRAF V600E тесно связано с гиперметилированием промотора MLH1. В итоге положительный результат окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) указывает на спорадический КРР.

Помимо роли в стратификации КРР мутация BRAF V600E обнаруживается примерно в 8 % всех плотных опухолей, в том числе в меланомах (43 %), папиллярных карциномах (щитовидная железа) (39 %), серозных карциномах яичников (12 %), раковых образований в легком (2 %) и других раковых образованиях.[16] Кроме того, мутация BRAF V600E в недавнем времени была описана как молекулярный маркер волосатоклеточного лейкоза.[20]

## КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

В 1960-х годах был впервые описан синдром Линча и была установлена связь между потерей функции MMR и развитием рака.[21] Потеря экспрессии белков MMR (MLH1, PMS2, MSH2 или MSH6) может привести к MSI и повышенному пожизненному риску развития не только КРР, но также и рака желудка, мозга, поджелудочной железы, кожи, эндометрия и яичников. Пациенты с синдромом Линча имеют 50–80 % пожизненного риска развития КРР.[5,22,23] Синдром Линча уникальным образом отличается от других наследственных раковых синдромов, поскольку проведение прямого исследования опухолевой ткани помогает в идентификации пациентов, находящихся в группе риска потенциального развития синдрома Линча, и делает последующий генетический анализ зародышевой линии более информативным. Применение расширенных



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

протоколов скрининга онкологических заболеваний имеет благоприятное значение для семей с синдромом Линча.

Различные руководства, в том числе руководства Национальной комплексной сети онкологических учреждений (NCCN), рекомендуют проводить скрининг всех случаев КРР на предмет потенциального наличия синдрома Линча для идентификации пациентов и семей, которые получат пользу от дальнейшего генетического анализа и консультирования.[21,24-27] Использование панели VENTANA MMR IHC Panel будет способствовать определению статуса MMR КРР посредством классификации случаев КРР как имеющих неизмененную или отсутствующую экспрессию белка MMR. Обнаружение всех четырех белков MMR в опухоли указывает на нормальную или неизмененную функцию системы MMR. Потеря экспрессии MLH1 или MSH2 почти неизменно сопровождается потерей гетеродимерного белка-партнера PMS2 или MSH6 соответственно. Тем не менее, потеря экспрессии PMS2 или MSH6 не приводит к потере экспрессии MLH1 или MSH2. Потеря экспрессии PMS2, MSH2 и (или) MSH6 соотносится с вероятным синдромом Линча, поэтому пациентов следует направлять на дополнительное тестирование и консультацию согласно клинической практике.

Потеря экспрессии белка MLH1 может указывать на спорадическое возникновение рака или потенциальный синдром Линча. В 15 % или более случаев спорадического КРР потеря белка MLH1 происходит ввиду гиперметилирования промотора MLH1.[5,28,29] Важно отметить, что мутация BRAF V600E наблюдается приблизительно в двух третях случаев опухолей, характеризующихся потерей экспрессии MLH1 по причине гиперметилирования промотора MLH1 . И напротив, мутация BRAF V600E очень редко наблюдается в опухолях, вызванных синдромом Линча.[28] Таким образом, если результат окрашивания антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-MLH1 (M1)) указывает на потерю экспрессии белка MLH1, антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) может четко определить опухоль как спорадический КРР или вероятный синдром Линча.[5,30] При КРР потеря экспрессии белка MLH1 с положительным статусом BRAF V600E однозначно указывает на то, что опухоль имеет спорадический характер, фактически исключая синдром Линча из списка первопричин возникновения злокачественного новообразования.[21,31] Когда потеря экспрессии белка MLH1 сопровождается отрицательным статусом BRAF V600E, это указывает на высокую вероятность наличия синдрома Линча.[32]

## ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) является мышиным моноклональным антителом (клон VE1) к синтетическому пептиду, представляющему аминокислотную последовательность после мутации BRAF от аминокислоты 596 до 606 (GLATEKSRWSG). Окрашивание этим специфическим к мутации антителом имеет цитоплазматический характер. При помощи этого антитела осуществляется дифференциальная диагностика мутации V600E в белке BRAF и белка BRAF дикого типа, а также остальных белков с мутацией BRAF.[33, 34]

При исследовании MMR методом IHC для определения потенциального синдрома Линча идентификация мутации BRAF V600E в образцах с потерей экспрессии MLH1 свидетельствует о спорадическом колоректальном раке (КРР).[32]

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) связывается с белком мутации BRAF V600E в фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) срезах ткани. Антитело может быть обнаружено посредством гаптенированного вторичного антитела с последующей обработкой мультимерным конъюгатом HRP (пероксидазы хрена) с антителом к гаптену (OptiView DAB IHC Detection Kit, № по каталогу 760-700 / 06396500001). После этого специфический комплекс антитела и фермента визуализируется путем осаждения продукта ферментативной реакции. Каждый этап процедуры включает инкубацию в течение строго определенного промежутка времени при заданной температуре. В конце каждой инкубации каждый аппарат BenchMark ULTRA, XT и GX промывает срезы, чтобы остановить реакцию и удалить несвязавшиеся вещества, которые могут препятствовать протеканию необходимых реакций на последующих этапах. С помощью данного аппарата также наносится ULTRA LCS (ULTRA LCS (Predilute), № по каталогу 650-210 / 05424534001) или LCS (LCS predilute, № по каталогу 650-010 / 05264839001), который позволяет свести к минимуму испарение водных реагентов с поверхности предметного стекла, содержащего образец.

Помимо окраски антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), второе предметное стекло следует окрасить мышиным моноклональным реагентом для отрицательного контроля, Negative Control (Monoclonal) (№ 760-2014 / 05266670001). Реагент для отрицательного контроля используется для оценки фонового окрашивания.

## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 50 анализов.

Один 5 мл дозатор с антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) содержит приблизительно 60 мкг мышиного моноклонального антитела.

Антитело разведено в растворе фосфатного буфера 0,1 M (pH 7,3), содержащем 0,3% белка-носителя, 0,05% Brij 35 и 0,05% ProClin300 в качестве консерванта.

Общая концентрация белка в реагенте составляет приблизительно 3 мг/мл. Концентрация специфических антител составляет приблизительно 12 мкг/мл.

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) является мышиным моноклональным антителом, полученным из очищенного супернатанта клеточной культуры.

См. соответствующую часть листка-вкладыша в упаковке набора для обнаружения VENTANA, чтобы ознакомиться с более подробным описанием: 1) принципов действия; 2) необходимых материалов и реагентов, не входящих в комплект; 3) сбора образцов тканей и подготовки к анализу; 4) процесса контроля качества; 5) принципов поиска и устранения проблем; 6) результатов; 7) общих ограничений.

## НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

В комплект поставки не входят красящие реагенты, например наборы для обнаружения VENTANA, а также вспомогательные компоненты, в том числе отрицательные и положительные тканевые контроли.

Для окрашивания требуются следующие реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки.

1. Дополнительные антитела панели VENTANA MMR IHC Panel:
   - VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№ по каталогу 760-5091 / 08033668001)
   - VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№ по каталогу 760-5094 / 08033692001)
   - VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№ по каталогу 760-5093 / 08033684001)
   - VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (№ по каталогу 760-5092 / 08033676001)
2. Negative Control (Monoclonal) (№ по каталогу 760-2014 / 05266670001)
3. Предметные стекла для микроскопа (с положительным зарядом)
4. Этикетки со штрих-кодами (соответствующие реагенту для отрицательного контроля и используемому первичному антителу)
5. Ксилол (гистологической степени очистки)
6. Этанол или спиртосодержащий реагент (гистологической степени очистки)
   - 100%-й раствор: неразбавленный этанол или спиртосодержащий реагент.
   - 95%-й раствор: смешать 95 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 5 частями деионизированной воды.
   - 80%-й раствор: смешать 80 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 20 частями деионизированной воды.
7. Деионизированная или дистиллированная вода
8. OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700 / 06396500001)
9. Для VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, OptiView Amplification Kit (№ По каталогу 760-099 / 06396518001 или № по каталогу 860-099 / 06718663001)
10. EZ Prep Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-102 / 05279771001)
11. Reaction Buffer Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-300 / 05353955001)
12. ULTRA LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-210 / 05424534001) или LCS (LCS predilute № по каталогу 650-010 / 05264839001)
13. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (№ по каталогу 950-224 / 05424569001) или Cell Conditioning 1 (CC1) № по каталогу 950-124 / 05279801001)
14. Hematoxylin II (№ по каталогу 790-2208 / 05277965001)
15. Bluing Reagent (№ по каталогу 760-2037 / 05266769001)
16. Постоянная гистологическая среда для заливки образцов (Permount Fisher № по каталогу SP15-500 или эквивалентная)
17. Покровное стекло (размера, достаточного для закрытия образцов ткани, например VWR, № по каталогу 48393-060)



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

18. Автоматический аппарат для заключения под покровное стекло (например, Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
19. Световой микроскоп
20. Гигроскопические салфетки

## ХРАНЕНИЕ

После получения реагента и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживать.

Для обеспечения надлежащей сохранности реагента и стабильности антител после каждого использования необходимо закрывать флакон-дозатор крышкой и сразу ставить его в холодильник в вертикальном положении.

На каждом флаконе-дозаторе с раствором антител указан срок годности. При соблюдении условий хранения реагент остается стабильным до даты, указанной на этикетке. Не использовать реагент после истечения срока годности.

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Необходимо получить срезы толщиной приблизительно 4 мкм и нанести их на положительно заряженные предметные стекла. Для окрашивания следует использовать свежие срезы тканей, поскольку антигенность тканевых срезов со временем может уменьшаться.

Данное первичное антитело можно применять для окрашивания подготовленных стандартным образом, фиксированных формалином и залитых в парафин тканей, при условии использования OptiView DAB IHC Detection Kit, а также аппарата BenchMark ULTRA. В качестве фиксатора ткани рекомендуется нейтральный формалиновый буфер 10 %.[35]

При использовании VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) рекомендуется, чтобы ткань в течение 2 часов после иссечения была зафиксирована в 10 % нейтральном забуференном формалине (NBF) на 12 часов на основе моделей ксенотрансплантата, полученных из клеточной линии человека A2058 (меланома) и LS411N (KPP), которые демонстрируют положительный результат на экспрессию BRAF V600E. Однако фиксация до 72 часов в 10 % NBF дала эквивалентные результаты окрашивания BRAF V600E. Приемлемое окрашивание антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) также достигалось при фиксации цинк-формалином в течение 12–72 часов.

С VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) не рекомендуется использовать спиртовой раствор формалина (AFA), 95 % этиловый спирт, Z-5, и фиксаторы PREFER. Ткани ксенотрансплантата, зафиксированные в спиртовой растворе формалина, демонстрируют нестабильные результаты окрашивания или полное их отсутствие.

Используемое количество фиксатора должно составлять от 15 до 20 объемов ткани. За 24 часа фиксатор проникает в плотную ткань не более чем на 2–3 мм, а в пористую ткань — не более чем на 5 мм. Фиксацию следует проводить при комнатной температуре (15—25 °C).[14]

Необходимо получить залитые в парафин срезы толщиной приблизительно 4 мкм и нанести их на положительно заряженные предметные стекла. Срезы тканей следует окрашивать немедленно после среза с блока парафина, поскольку антигенность тканевых срезов может уменьшаться со временем. Тем не менее, неокрашенные предметные стекла с тканями KPP при хранении при 5±3 °C или 30±5 °C в течение 8 недель демонстрировали аналогичную интенсивность окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) в сравнении с образцами ткани, полученными из того же блока и окрашенных антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) в 1-й день.

Одновременно с исследованием неизвестных образцов рекомендуется провести исследование на положительном и отрицательном тканевых контролях.

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики in vitro (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. Раствор ProClin 300 используется в данном реагенте в качестве консерванта. Он относится к раздражающим средствам и при контакте с кожей может стать причиной сенсибилизации. При работе с реагентом соблюдайте меры предосторожности. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. Используйте защитную одежду и перчатки.
4. Материалы человеческого или животного происхождения следует считать биологически опасными материалами и утилизировать, соблюдая все необходимые меры предосторожности.
5. Избегайте контакта реагентов с глазами и слизистыми оболочками. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды.
6. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.
7. Проконсультируйтесь с местными и (или) государственными органами в отношении рекомендованного способа утилизации.
8. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) предназначено для использования на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX в комбинации с OptiView DAB IHC Detection Kit и вспомогательными реагентами. В таблице 1 приведен протокол окрашивания для применения с антителом VENTANA anti- BRAF V600E (VE1). Сведения о влиянии других значений времени и температуры при демаскировке антигена на устойчивость анализа к возникновению ошибок отсутствуют. Поэтому отклонение от рекомендуемых условий для демаскировки антигена, представленных в указанном протоколе окрашивания, неизвестно и может сделать ожидаемые результаты недействительными. Следует использовать и документировать надлежащие контроли. Пользователи, которые отклоняются от указанного протокола, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

Параметры автоматических процедур могут быть отображены на экране, напечатаны и отредактированы согласно процедуре, описанной в руководстве пользователя, прилагаемом к соответствующим приборам. Для получения более подробной информации об этапах процедуры иммуногистохимического окрашивания см. листок-вкладыш в упаковку OptiView DAB IHC Detection Kit.

**Таблица** 1. Протокол окрашивания для VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) антитела с применением OptiView DAB IHC Detection Kit на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX.

| **Тип процедуры** | **Метод** | | |
|---|---|---|---|
| | BenchMark ULTRA **Аппарат** | BenchMark XT **Аппарат** | BenchMark GX **Аппарат** |
| **Депарафинирование** | Выбрано | Выбрано | Выбрано |
| **Кондиционирование клеток (демаскирование антигена)** | Cell Conditioning 1 64 минут, 100°C | Cell Conditioning 1 64 минуты | Cell Conditioning 1 64 минуты |
| Pre-Primary Peroxidase Inhibitor | Выбрано | Выбрано | Выбрано |
| **Антитела (первичные)** | 16 минут, 36°C | 16 минут, 37°C | 28 минут, 37°C |
| OptiView HQ Linker | 8 мин (по умолчанию) | | |
| OptiView HRP Multimer | 8 мин (по умолчанию) | | |
| **Контрастное окрашивание** | Hematoxylin II, 4 минуты | | |
| **Обработка после контрокрашивания** | Bluing, 4 минуты | | |

Отклонение от рекомендуемых условий (особенно для демаскировки антигена), представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными. Тем не менее, в связи с различиями в фиксации и обработке тканей, а также в лабораторном оборудовании и внешних условиях может потребоваться увеличение или уменьшение времени инкубации первичных антител в зависимости от отдельных образцов и предпочтений эксперта. Подробную информацию о различиях в методиках фиксации см. в разделе Immunohistochemistry: Principles and Advances (Иммуногистохимический анализ: принципы и достижения).[36]



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

## ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

### Реагент для отрицательного контроля

Ventana Medical Systems, Inc. настоятельно рекомендует использовать реагент для отрицательного контроля для окрашивания смежного среза образца ткани пациента на отдельном предметном стекле, а не на предметном стекле, где образец был окрашен антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Мышиный моноклональный реагент для отрицательного контроля (Negative Control (Monoclonal), № по каталогу 760-2014 / 05266670001) рекомендуется для использования вместо первичного антитела для оценки неспецифического окрашивания. Протокол окрашивания антитела, используемого с реагентом для отрицательного контроля, должен соответствовать параметрам окрашивания первичного антитела.

### Положительный тканевый контроль

При выполнении каждой процедуры окрашивания необходимо проводить положительный тканевый контроль. Оптимальная лабораторная практика — помещение среза для положительного контроля на одно стекло с образцом ткани пациента. Такая практика позволяет распознать случаи, когда первичное антитело или другой важный реагент не оказывают должного эффекта на образец ткани пациента. Для оптимального контроля качества лучше всего подойдет образец ткани, в норме показывающий слабое положительное окрашивание. Положительно окрашиваемые компоненты ткани служат подтверждением того, что антитела нанесены и что прибор работает надлежащим образом. Данная ткань может содержать как положительно, так и отрицательно окрашиваемые клетки или компоненты ткани и использоваться в качестве как положительного, так и отрицательного тканевого контроля. В качестве контроля следует использовать свежие образцы тканей, полученные в ходе вскрытия, биопсии или хирургических операций. Образцы следует как можно скорее подготовить или зафиксировать по процедуре, используемой для исследуемых образцов. С использованием таких образцов должен контролироваться весь процесс исследования, начиная от подготовки ткани и заканчивая окрашиванием. Использование среза ткани, фиксированного или обработанного по процедуре, отличной от процедуры тестируемого образца, позволяет обеспечить контроль всех реагентов и этапов метода, кроме фиксации и обработки ткани.

Заведомо положительные тканевые контроли следует использовать только для контроля правильности работы с обработанными тканями и тестирования реагентов, а не в качестве вспомогательного средства при постановке конкретного диагноза на основании образцов пациента. Если не наблюдается положительного окрашивания положительных тканевых контролей, результаты окрашивания тестовых образцов следует считать неверными.

Соответствующий положительный тканевый контроль по предварительным анализам будет представлять собой случай КРР с положительным результатом на антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Положительный тканевый контроль должен демонстрировать цитоплазматическое окрашивание любой интенсивности в жизнеспособной опухоли, показатели интенсивности при этом должны превышать показатели фонового окрашивания.

### Отрицательный тканевый контроль

Отрицательный тканевый контроль по предварительным анализам будет представлять собой случай КРР, с отрицательными результатами на антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Отрицательный тканевый контроль следует использовать только для проверки характеристик обработанных тканей, исследуемых реагентов и аппаратов, но не для формулировки конкретного диагноза на основании образцов пациента.

### Верификация анализа

Перед начальным использованием антитела или системы окрашивания в диагностической процедуре следует верифицировать специфичность антитела. Для этого выполняется тестирование антитела на серии тканей с известными характеристиками эффективности IHC, представляющими клинический статус мутации BRAF V600E как в ткани с положительными и отрицательными результатами. (См. «Процедуры контроля качества», описанные ранее в этом разделе листка-вкладыша, а также рекомендации по контролю качества Программы лабораторной аккредитации коллегии американских патологов (College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program), контрольной карты по патологической анатомии[37] или CLSI Approved Guideline.[38])

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОКРАШИВАНИЯ/ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Характер окрашивания с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) в опухолевых клетках — цитоплазматический. Квалифицированный патоморфолог присваивает клинический статус образцам КРР, окрашенным с помощью антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), на основании собственной оценки наличия или отсутствия специфичного цитоплазматического окрашивания в опухолевой ткани. Положительный клинический статус присваивается случаям с однозначным цитоплазматическим окрашиванием любой интенсивности в жизнеспособной опухоли, показатели интенсивности при этом должны превышать показатели фонового окрашивания. Отрицательный клинический статус присваивается образцам, когда цитоплазматическое окрашивание в жизнеспособной опухоли отсутствует или является слабым неоднозначным. Ядерное окрашивание (слабой или сильной интенсивности) изолированных жизнеспособных опухолевых клеток и (или) скопления опухолей следует считать отрицательным.

## ОСОБЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

Антитела и реагенты компании Ventana Medical Systems, Inc. имеют оптимальную концентрацию для применения в соответствии с прилагающейся инструкцией. Отклонение от условий протокола окрашивания неизвестно и может сделать ожидаемые результаты недействительными. Пользователи советуют воздержаться от использования кислотных буферов для демаскировки антигена, поскольку эти буферы могут привести к получению неоптимального окрашивания, которое трудно интерпретировать.[39] Пользователи, которые отклоняются от указанного протокола, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

Образцы ткани должны быть зафиксированы в течение 2 часов после забора на протяжении не менее 12 часов в 10 % нейтральном забуференном формалине. Не рекомендуется использование для фиксации тканей 95% спирта, фиксатора PREFER, фиксатора Z-5 или спиртового раствора формалина с уксусной кислотой (AFA).

Образцы, окрашенные антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), классифицируются как образцы с положительным результатом или отрицательным результатом в зависимости от наличия или отсутствия окрашивания во всей области опухолевой ткани. Окрашивание может варьироваться в зависимости от уровня интенсивности, которая, в свою очередь, может варьироваться в зависимости от опухоли; однако интенсивность не влияет на клинический статус BRAF V600E.

Анализ некоторых образцов может быть особенно сложным в связи со следующими проблемами:

- Было обнаружено, что антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) иногда вызывает слабое цитоплазматическое и ядерное окрашивание в гладких мышцах, клетках Пуркинье мозжечка, нормальных эпителиальных клетках кишечника, энтероцитах, интерстициальных клетках яичка, надпочечнике, гипофизе, ацинарных структурах поджелудочной железы, железистых клетках кишечника и некоторых опухолевых клетках. Однако такие образцы не следует рассматривать как положительные на BRAF V600.[40] Кроме того, это антитело вызывало умеренное окрашивание в нейроэндокринных клетках гипофиза. Кроме того, этот реагент окрашивает реснички респираторного эпителия легких.
- Неспецифическое фоновое окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать неспецифическое фоновое окрашивание по недостаточно понятным причинам. По этой причине оценка предметного стекла, окрашенного антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), должна включать в себя сравнение предметного стекла, окрашенного срезом ткани, окрашенным реагентом для отрицательного контроля, для определения уровня неспецифичного фонового окрашивания. В отдельных случаях наблюдается окрашивание ядер клеток опухоли, однако значение этого не изучено.
- Тканевые артефакты или артефакты, вызванные окрашиванием. Гистологические артефакты, возникающие в ходе обработки образцов и микротомии, также могут осложнить определение клинического статуса антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). К таким артефактам относятся, кроме прочего, градиенты фиксации и краевые эффекты, захват DAB, образование пузырьков в ядре, недостаточное окрашивание на некоторых участках ткани, разрыв или складки ткани и потеря среза ткани. В некоторых случаях может потребоваться повторное окрашивание новых срезов или получение нового образца.



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

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИТЕЛА VENTANA ANTI-BRAF V600E (VE1)

### Аналитическая чувствительность/специфичность

Аналитическая чувствительность и специфичность были определены посредством окрашивания множественных образцов нормальных и опухолевых тканей человека антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Результаты приведены в Таблица 2 и Таблица 3. В результате окрашивания нормальных и опухолевых тканей антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) непредвиденных результатов получено не было. Исключение составили образцы, указанные в разделе «ОСОБЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ».

**Таблица** 2. Аналитическая чувствительность/специфичность окрашивания FFPE нормальных тканей антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)

| Ткань | Кол-во положительных случаев/ общее кол-во случаев | Ткань | Кол-во положительных случаев/ общее кол-во случаев |
|---|---|---|---|
| Надпочечник | 0/3 | Легкое | 0/3 |
| Мочевой пузырь | 0/3 | Лимфоузлы | 0/3 |
| Костный мозг | 0/3 | Мезотелий | 0/3 |
| Яичник | 0/3 | Поджелудочная железа | 2/3 * |
| Молочная железа | 0/3 | Паращитовидная железа | 0/3 |
| Мозжечок | 1/3 * | Периферический нерв | 0/5 |
| Головной мозг | 0/3 | Простата | 0/3 |
| Шейка матки | 0/3 | Скелетная мышца | 0/3 |
| Толстая кишка | 5/12 * | Кожа | 0/3 |
| Эндометрий | 0/3 | Селезенка | 0/3 |
| Пищевод | 0/3 | Желудок | 0/3 |
| Сердце | 0/3 | Яичко | 2/3 * |
| Гипофиз | 3/3 ** | Тимус | 0/3 |
| Стенка кишечника | 2/4 * | Щитовидная железа | 0/3 |
| Почка | 0/3 | Язык/слюнная железа | 0/3 |
| Печень | 0/3 | Миндалины | 0/3 |

Примечание. *Цитоплазматическое и ядерное окрашивание слабой интенсивности в клетках Пуркинье мозжечка, гладких мышц и нормальных эпителиальных клетках толстой кишки, железистых клеток кишечника, ацинарных структур поджелудочной железы и интерстициальных клеток яичка.

** Умеренное окрашивание в нейроэндокринных клетках гипофиза.

При анализе всех тканей положительный или отрицательный результат окрашивания определяли при наличии специфических для тканей элементов, клинический статус BRAF V600E таких образцов не следует считать положительным.[16]

**Таблица** 3. Аналитическая чувствительность/специфичность окрашивания различных FFPE опухолевых тканей антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)

| Патология | Кол-во положительных случаев/ общее кол-во случаев |
|---|---|
| Глиобластома (головной мозг) | 0/1 |
| Менингиома (головной мозг) | 0/1 |
| Эпендимома (головной мозг) | 0/1 |
| Олигодендроглиома (головной мозг) | 0/1 |
| Серозная аденокарцинома (яичник) | 0/1 |
| Аденокарцинома (яичник) | 0/1 |
| Панкреато-нейроэндокринное новообразование (поджелудочная железа) | 0/1 |
| Семинома (яичко) | 0/2 |
| Медуллярная карцинома (щитовидная железа) | 0/1 |
| Папиллярная карцинома (щитовидная железа) | 21/28 |
| Протоковая карцинома in situ (молочная железа) | 0/1 |
| Микроинвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 0/1 |
| Инвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 3/131 |
| В-клеточная лимфома, неуточненная (селезенка) | 0/1 |
| Аденокарцинома (легкое) | 1/73 |
| Мелкоклеточная карцинома (легкое) | 0/7 |
| Плоскоклеточная карцинома (легкое) | 0/90 |
| Нейроэндокринная карцинома (пищевод) | 0/1 |
| Аденокарцинома (пищевод) | 0/1 |
| Перстневидноклеточная карцинома (желудок) | 0/1 |
| Аденокарцинома (тонкая кишка) | 0/1 |
| Стромальная саркома (тонкая кишка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (толстая кишка) | 64/234 |
| Гастроинтестинальная стромальная опухоль (GIST) (толстая кишка) | 0/1 |
| Аденокарцинома (прямая кишка) | 0/1 |
| Гастроинтестинальная стромальная опухоль (GIST) (прямая кишка) | 0/1 |
| Меланома (прямая кишка) | 0/1 |
| Гепатоцеллюлярная карцинома (печень) | 0/1 |
| Гепатобластома (печень) | 0/1 |
| Светлоклеточная карцинома (почка) | 0/1 |
| Аденокарцинома (предстательная железа) | 0/2 |
| Лейомиома (матка) | 0/0 |



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

| Патология | Кол-во положительных случаев/ общее кол-во случаев |
|---|---|
| Аденокарцинома (матка) | 0/1 |
| Светлоклеточная карцинома (матка) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (шейка матки) | 0/2 |
| Эмбриональная рабдомиосаркома (поперечно-полосатая мускулатура) | 0/1 |
| Злокачественная меланома | 10/24 |
| Базальноклеточная карцинома (кожа) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (кожа) | 0/1 |
| Нейрофиброма (поясница) | 0/0 |
| Нейробластома (забрюшинное пространство) | 0/1 |
| Мезотелиома (брюшина) | 0/1 |
| В-клеточная лимфома, неуточненная (лимфатический узел) | 0/2 |
| Лимфома Ходжкина (Hodgkin) (лимфатический узел) | 1/1 |
| Переходноклеточная карцинома (мочевой пузырь) | 0/1 |
| Лейомиосаркома (мочевой пузырь) | 0/1 |
| Остеосаркома | 0/1 |
| Веретеноклеточная рабдомиосаркома (брюшина) | 0/1 |
| Лейомиосаркома (гладкая мускулатура) | 0/1 |

### Внутрисуточная повторяемость и межсуточная прецизионность

Повторяемость и прецизионность окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) оценивались на аппарате BenchMark ULTRA в сочетании с OptiView DAB IHC Detection Kit.

Внутрисуточная повторяемость также оценивалась с использованием 10 образцов КРР (5 положительных и 5 отрицательных для определения клинического статуса мутации BRAF V600E). Пять реплицированных предметных стекол каждого из образцов КРР окрашивались антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) на одном аппарате BenchMark ULTRA в один день. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им статус «Положительный» или «Отрицательный».

Межсуточная прецизионность также оценивалась с использованием 10 образцов КРР (5 положительных и 5 отрицательных для определения клинического статуса мутации BRAF V600E). Реплицированные предметные стекла каждого из образцов КРР окрашивались антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) на аппарате BenchMark ULTRA в каждый из 5 непоследовательных дней. Кроме того, одно предметное стекло из каждого образца было окрашено реагентом для отрицательного контроля. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им статус «Положительный» или «Отрицательный».

Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5. На основании объединенных данных всех возможных парных сочетаний исследования внутрисуточной повторяемости и межсуточной прецизионности продемонстрировали 100%-е совпадение положительных результатов (PPA), 100%-е совпадение отрицательных результатов (NPA) и общее 100%-е совпадение результатов (OPA). Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 4.

**Таблица** 4. Внутрисуточная повторяемость и межсуточная прецизионность окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), согласно выявленному клиническому статусу (положительный или отрицательный)

| Повторяемость/ Точность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Внутрисуточная повторяемость | Положительный | PPA | 25/25 | 100,0. | (86,7; 100,0) |
| | Отрицательный | NPA | 25/25 | 100,0. | (86,7; 100,0) |
| | Всего | OPA | 50/50 | 100,0. | (92,9; 100,0) |
| Межсуточная прецизионность | Положительный | PPA | 50/50 | 100,0. | (92,9; 100,0) |
| | Отрицательный | NPA | 50/50 | 100,0. | (92,9; 100,0) |
| | Всего | OPA | 100/100 | 100,0. | (96,3; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

### Прецизионность между разными аппаратами BenchMark

Прецизионность между разными аппаратами BenchMark ULTRA для антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) определялась методом окрашивания реплицированных предметных стекол с 10 образцами КРР (5 с положительным и 5 с отрицательным клиническим статусом BRAF V600E) на 3 аппаратах BenchMark ULTRA с применением антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и использованием OptiView DAB IHC Detection Kit. Кроме того, одно предметное стекло из каждого образца было окрашено реагентом для отрицательного контроля.

Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им клинический статус «Положительный» или «Отрицательный». Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5.

При определении прецизионности между разными аппаратами BenchMark ULTRA был проведен сравнительный анализ пар клинического статуса предметных стекол для каждого образца между аппаратами и продемонстрированными 100% PPA, NPA и OPA. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 5.

**Таблица** 5. Прецизионность между разными аппаратами BenchMark ULTRA для антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), согласно выявленному клиническому статусу (положительный или отрицательный)

| Точность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Между разными аппаратами | Положительный | PPA | 30/30 | 100,0. | (88,6; 100,0) |
| | Отрицательный | NPA | 30/30 | 100,0. | (88,6; 100,0) |
| | Всего | OPA | 60/60 | 100,0. | (94,0; 100,0) |



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

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

Кроме того, прецизионность между разными аппаратами для антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) определялась методом окрашивания реплицированных предметных стекол с 6 образцами КРР (2 образца, отрицательные на КРР, 2 образца КРР и 2 образца, положительные на рак щитовидной железы для определения клинического статуса BRAF V600E) на 3 аппаратах BenchMark XT и 3 аппаратах BenchMark GX с применением антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и использованием OptiView DAB IHC Detection Kit.

Было проведено 15 наблюдений на каждый образец при объединении 3 аппаратов; медиана для каждого образца определялась по этим 15 наблюдениям. Индивидуальные наблюдения одного и того же образца считались согласующимися с медианной интенсивностью сигнала образца, если их интенсивность находилась в пределах 0,5. При определении прецизионности между аппаратами BenchMark XT и BenchMark GX для каждого образца был выполнен сравнительный анализ пар по уровню интенсивности окрашивания предметного стекла. Результаты были следующими: 98,9 % OPA между 3 аппаратами BenchMark XT и 100 % OPA между 3 аппаратами BenchMark GX. Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5 на обоих аппаратах BenchMark XT или GX.

### Конкордантность платформы BenchMark

Конкордантность между аппаратами BenchMark ULTRA, XT и GX для антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) была определена методом окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) образцов КРР, образцов с раком щитовидной железы и образцов с меланомой с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit. Клинический статус всех предметных стекол (положительный/отрицательный) оценивался одним и тем же патоморфологом.

Сравнение клинического статуса 228 образцов (177 образцов КРР, 27 образцов рака щитовидной железы и 24 образцов меланомы) было выполнено между GX и ULTRA, а также XT и ULTRA. Сравнения, выполненные на платформах BenchMark GX и ULTRA, продемонстрировали 98,0 %-е среднее совпадение положительных результатов (APA), 99,0 %-е среднее совпадение отрицательных результатов (ANA) и 98,7 %-е общее совпадение результатов (OPA). Сравнения, выполненные на платформах BenchMark XT и ULTRA, продемонстрировали 96,6 %-е среднее совпадение положительных результатов (APA), 98,4 %-е среднее совпадение отрицательных результатов (ANA) и 97,8 %-е OPA. Сравнение 230 образцов (179 образцов КРР, 27 образцов рака щитовидной железы и 24 образцов меланомы) для BenchMark GX и XT было выполнено на разных платформах. Сравнения, выполненные на платформах BenchMark GX и XT, продемонстрировали 98,7%-е среднее совпадение положительных результатов (APA), 99,4%-е среднее совпадение отрицательных результатов (ANA) и 99,1%-е OPA.

### Исследования прецизионности оценок эксперта

Прецизионность по каждому эксперту и между экспертами оценивалась по 20 образцам КРР (10 положительных на мутацию BRAF V600E и 10 отрицательных на мутацию BRAF V600E), окрашенным антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) при использовании OptiView DAB IHC Detection Kit на аппарате BenchMark ULTRA. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца.

Все пары предметных стекол были рандомизированы и оценивались 3 патоморфологами на предмет положительного или отрицательного клинического статуса BRAF V600E. Патоморфологам был неизвестен диагноз образцов. После четырехнедельного отмывочного периода окрашенные антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) предметные стекла были повторно рандомизированы для проведения второй оценки клинического статуса BRAF V600E каждым из 3 патоморфологов. Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5.

Для определения прецинзионности по каждому эксперту сравнивали исходную и итоговую оценки слайда, полученные от одного и того же патоморфолога. Всего было выполнено сравнение 20 предметных стекол с срезом КРР на каждого патоморфолога. Сравнения 3 патоморфологов были объединены и продемонстрировали 100 % APA, 100 % ANA и общее 100 %-е совпадение результатов (OPA) для прецизионности по каждому эксперту. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 6.

Для определения прецизионности между экспертами сравнивали все оценки предметных стекол (20 КРР x 2 оценки/образец x 3 патоморфолога = 120 оценок предметных стекол) со статусом модального образца для каждого образца КРР. Результаты демонстрируют 100 % PPA, NPA и OPA для прецизионности между экспертами. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 6.

**Таблица** 6. Прецизионность по каждому эксперту и между экспертами антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) для образцов КРР, согласно выявленному клиническому статусу BRAF V600E (положительный/отрицательный)

| Точность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| По каждому эксперту | Положительный | APA | 60/60 | 100,0. | (93,9; 100,0) |
| | Отрицательный | ANA | 60/60 | 100,0. | (93,9; 100,0) |
| | Всего | OPA | 60/60 | 100,0. | (94,0; 100,0) |
| Между экспертами | Положительный | PPA | 60/60 | 100,0. | (94,0; 100,0) |
| | Отрицательный | NPA | 60/60 | 100,0. | (94,0; 100,0) |
| | Всего | OPA | 120/120 | 100,0. | (96,9; 100,0) |

Примечание. Для оценки по каждому эксперту 95% доверительные интервалы для APA и ANA были рассчитаны по методу Клоппера-Пирсона; 95% доверительный интервал для OPA 95% CI был рассчитан по методу бутстреп. Для оценки между экспертами 95% доверительные интервалы были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

### Прецизионность между партиями

Прецизионность между партиями антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) была определена методом анализа 3 производственных партий антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), каждая с использованием строенных предметных стекол из 10 образцов КРР (5 с положительным и 5 с отрицательным результатом на мутацию BRAF V600E) на аппарате BenchMark ULTRA с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit.

Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем их оценку провел один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов и номер партии антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило ≤ 0,5.

При определении прецизионности между партиями антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) клинический статус BRAF V600E, полученный при оценке каждого предметного стекла, сравнивался со статусом модального образца для каждого образца. Показатели OPA, PPA, и NPA между партиями антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) составили 100 %, продемонстрировав, что окрашивание антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) является воспроизводимым между партиями антитела.

Сводные данные полученных результатов прецизионности между партиями антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) приведены в таблице 7.



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

**Таблица** 7. Прецизионность между партиями для антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), согласно выявленному клиническому статусу (положительный или отрицательный)

| Точность | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Между партиями | Положительный | PPA | 45/45 | 100,0. | (92,1; 100,0) |
| | Отрицательный | NPA | 45/45 | 100,0. | (92,1; 100,0) |
| | Всего | OPA | 90/90 | 100,0. | (95,9; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

### Исследование воспроизводимости результата между лабораториями

Исследование воспроизводимости результата между лабораториями для панели VENTANA MMR IHC Panel было проведено для демонстрации воспроизводимости каждого анализа панели VENTANA MMR IHC Panel для определения клинического статуса. В исследование было включено 6 образцов ткани КРР (3 с неизмененной экспрессией и 3 с потерянной экспрессией) для каждого белка MMR и 16 образцов ткани КРР (8 положительных и 8 отрицательных) для определения BRAF V600E. Циклы проводились на 3 аппаратах BenchMark ULTRA в каждый из 5 непоследовательных дней за 21-дневный период в трех независимых лабораториях. Каждое окрашенное антителом предметное стекло объединялось с H&E (гематоксилином и эозином) и предметным стеклом, окрашенным реагентом для отрицательного контроля, из того же образца. Все наборы предметных стекол были рандомизированы и оценены в общей сложности 6 экспертами (по 2 в каждом исследовательском центре), которые не знали заранее, каков клинический статус MMR в образцах набора исследования. Для каждого из 40 образцов в исследовании было проведено 30 наблюдений по всем дням, исследовательским центрам и экспертам. Эталонный статус модального образца был получен для каждого образца на основании наиболее часто наблюдаемого статуса в 30 наблюдениях. Всего в исследовании было проведено 1200 наблюдений для всех пяти белков. Для всех оцениваемых образцов уровень приемлемости в отношении морфологических структур и фона в данном исследовании составил 100 %. Сводные данные по объединенным (для всех пяти белков) статистическим показателям совпадений и индивидуальных наблюдений приведены в таблице 8.

**Таблица** 8. Совпадения между панелью VENTANA MMR IHC Panel и эталонным статусом модального образца

| Межлабораторная повторяемость | Клинический статус | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Все белки | Неизмененная/положительный | PPA | 598/600 | 99,8. | (98,7; 100,0) |
| | Потерянная/отрицательный | NPA | 593/600 | 98,9. | (97,4; 99,5) |
| | Всего | OPA | 1191/1200 | 99,4. | (98,6; 99,7) |

Примечание. Клинический статус определяется как «Неизмененная» или «Потерянная» для экспрессии белка MMR и «Положительный» или «Отрицательный» для белка BRAF V600E Значения 95 % доверительного интервала были рассчитаны с использованием подхода на основе обобщенной оценочной модели (GLMM).

Кроме того, для антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) были проведены парные сравнения между исследовательскими центрами, межсуточными показателями и показателями между экспертами. Для BRAF V600E этот набор исследований включал в общем 480 наблюдений. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 9. Данные обозначают повторяемость анализа по 5 дням, 3 исследовательским центрам и 6 экспертам.

**Таблица** 9. Показатели парных совпадений межлабораторной повторяемости для антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), согласно выявленному клиническому статусу (положительный или отрицательный)

| Межлабораторная повторяемость | | Совпадение | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95% CI |
| Между исследовательскими центрами (3 исследовательских центра) | | APA | 960/972 | 98,8. | (97,2; 100,0) |
| | | ANA | 936/948 | 98,7. | (97,0; 100,0) |
| | | OPA | 948/960 | 98,8. | (97,1; 100,0) |
| Межсуточная (5 непоследовательных дней) | Лаборатория A | APA | 320/320 | 100,0. | (98,8; 100,0) |
| | | ANA | 320/320 | 100,0. | (98,8; 100,0) |
| | | OPA | 320/320 | 100,0. | (98,8; 100,0) |
| | Лаборатория B | APA | 320/320 | 100,0. | (98,8; 100,0) |
| | | ANA | 320/320 | 100,0. | (98,8; 100,0) |
| | | OPA | 320/320 | 100,0. | (98,8; 100,0) |
| | Лаборатория C | APA | 320/332 | 96,4. | (92,0; 100,0) |
| | | ANA | 296/308 | 96,1. | (90,4; 100,0) |
| | | OPA | 308/320 | 96,3. | (91,3; 100,0) |
| Между экспертами (2 патоморфолога на исследовательский центр) | | APA | 242/243 | 99,6. | (98,8; 100,0) |
| | | ANA | 236/237 | 99,6. | (98,7; 100,0) |
| | | OPA | 239/240 | 99,6. | (98,8; 100,0) |

Примечание. Значения 95 % доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп; в случаях, где показатель точечной оценки составлял 100 %, использовался метод оценки Уилсона.

### Исследование точности: сравнение метода получения результатов с использованием панели VENTANA MMR IHC Panel и молекулярного тестирования (секвенирование ДНК и гиперметилирование промотора MLH1)

Исследование было проведено для сравнения эффективности использования панели VENTANA MMR IHC Panel и молекулярного тестирования, в том числе комплексной панели образцов тканей толстой кишки для секвенирования ДНК с целью идентификации КРР, который (i) характеризуется дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR) и (ii) содержит мутацию BRAF V600E. Панель образцов тканей толстой кишки для секвенирования ДНК включала геномный анализ вариаций, присутствующих в генах MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, EPCAM), BRAF и других генах, играющих важное значение при канцерогенезе (например PIK3CA, KRAS, NRAS, ERBB2 и т. д.). Секвенирование включало все экзоны, интронные и фланкирующие последовательности, а также значимые делеции, дупликации и мозаицизм.

Для исследования последовательности образцов КРР окрашивались H&E и оценивались на предмет надлежащей фиксации и морфологии, включая наличие клеточных элементов (опухоль и клетки внутренних контролей). Каждый образец оценивали, чтобы определить, состоит ли образец из опухолевых клеток как минимум на 50 %. Такая оценка была проведена для обеспечения достаточного количества опухолевых клеток в образце согласно рекомендациям для проведения молекулярного тестирования. После оценки в исследование было включено 105 образцов, соответствующих этим критериям. Кроме того, были включены 13 образцов КРР, демонстрирующих клинический статус «Потерянная», установленный методом IHC, чтобы гарантировать, что потеря экспрессии каждого маркера будет отражена в исследовании. Срезы всех образцов исследования были окрашены методом IHC с использованием панели VENTANA MMR IHC Panel и соответствующих реагентов для отрицательного контроля. Дополнительные срезы были обработаны с помощью панели образцов ткани толстой кишки для секвенирования ДНК. Гиперметилирование



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

промотора MLH1 — один из механизмов, который может привести к потере экспрессии белка MLH1, и его связывают со спорадическим КРР, а не с потенциальным синдромом Линча. Поэтому все образцы с потерей экспрессии MLH1, идентифицированные методом IHC при проведении исследования, были проанализированы на предмет гиперметилирования промотора MLH1.

С окончательным набором исследования, состоящим из 118 образцов, в анализ были включены показатели PPA и NPA для всех объединенных маркеров (т. е. все объединенные наблюдаемые значения), при этом молекулярное тестирование выступало в качестве эталона для сравнения IHC. Анализ включал в себя сравнение статуса белка MMR (неизмененная/потерянная) с молекулярным статусом, определенным как «нормальный» (нет патогенных мутаций, отрицателен в отношении гиперметилирования промотора MLH1 и BRAF дикого типа (отсутствие мутации V600E)) или «аномальный» (наличие патогенных мутаций, положителен в отношении гиперметилирования промотора MLH1 и (или) положителен в отношении мутации BRAF V600E). Показатели точечной оценки составили 99,4 % PPA, 93,5 % NPA и 98,8 % OPA, как показано в таблице 10.

Также был проведен сводный анализ для сравнения четырех IHC маркеров MMR (без антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) с результатами молекулярного тестирования. Показатели точечной оценки составили 99,3 % PPA, 89,7 % NPA и 98,5 % OPA, как показано в таблице 11.

В рамках дополнительного анализа сравнили результаты исследования методом IHC для четырех маркеров MMR с результатами молекулярного тестирования генов MMR на уровне одного образца, чтобы включить в исследование статус всех маркеров и получить результат dMMR/pMMR при использовании двух методов. Результаты данного анализа представлены в таблице 12, OPA при применении двух методов составляет 97,4 %.

В рамках исследования было выполнено сравнение статуса MMR при исследовании методом IHC и статуса молекулярного тестирования генов MMR для отдельных маркеров MMR. Показатель OPA для каждого маркера MMR при сравнении с объединенными результатами панели образцов ткани толстой кишки для секвенирования ДНК и анализа гиперметилирования промотора MLH1 составлял 100,0 % для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), 99,1 % для VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, 98,3 % для VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody и 96,6 % для антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

Клинический статус BRAF V600E в образцах КРР, полученных методом IHC с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), также сравнивался с результатами оценки мутационного статуса BRAF, определенными с помощью секвенирования ДНК. Показатели PPA, NPA и OPA IHC тестирования с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и применением метода секвенирования ДНК в качестве эталона составили 100 % (таблица 13). Было проведено дополнительное тестирование для подтверждения способности антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) к четкому определению образцов КРР, демонстрирующих потерю экспрессии белка MLH1. Из 23 образцов, положительных в отношении BRAF V600E, в 20 методом IHC была выявлена потеря экспрессии белка MLH1, и они были положительны в отношении гиперметилирования промотора MLH1. Эти данные указывают на тесную связь положительного статуса BRAF V600E и статуса гиперметилирования промотора MLH1. Оставшиеся образцы представляли собой образцы с pMMR (неизмененная экспрессия для всех белков MMR). Все образцы, положительные на BRAF V600E, идентифицировали как образцы со спорадическим КРР. Результаты подтвердили, что антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) правильно идентифицирует образцы КРР, имеющие мутацию BRAF V600E. Также данные подтвердили возможность использования антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) для дифференциации спорадического КРР и вероятного синдрома Линча при отсутствии экспрессии белка MLH1.

**Таблица** 10. Совокупный анализ для совпадений панели VENTANA MMR IHC Panel между IHC и молекулярным тестированием

| **Статус*** (**Молекулярное тестирование**/IHC) | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| Нормальный/неизмененная | PPA | 523/526 | 99,4 | (98,7; 100,0) |
| Аномальный/потерянная | NPA | 58/62 | 93,5 | (87,1; 98,6) |
| Всего | OPA | 581/588 | 98,8 | (98,0; 99,7) |

* При использовании метода IHC статус экспрессии белка системы MMR — неизмененная или потерянная. Для этого анализа отрицательные и положительные на BRAF V600E образцы были включены в категории «Неизмененная» или «Потерянная» соответственно. Молекулярное тестирование указывает на отсутствие (нормальный) или присутствие (аномальный) потенциальных патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп.

**Таблица** 11. Совокупный анализ совпадений четырех маркеров MMR (без антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) между IHC и молекулярным тестированием

| **Статус*** (**Молекулярное тестирование**/IHC) | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| Нормальный/неизмененная | PPA | 428/431 | 99,3 | (98,4; 100,0) |
| Аномальный/потерянная | NPA | 35/39 | 89,7 | (79,4; 97,7) |
| Всего | OPA | 463/470 | 98,5 | (97,3; 99,6) |

* При использовании метода IHC статус экспрессии белка — неизмененная или потерянная. Молекулярное тестирование указывает на отсутствие (нормальный) или присутствие (аномальный) потенциальных патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп.

**Таблица** 12. Совпадения четырех маркеров MMR и результатов молекулярного тестирования для определения статуса MMR (dMMR/pMMR)

| **Статус** MMR* | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| pMMR | PPA | 79/80 | 98,8 | (93,3; 99,8) |
| dMMR | NPA | 35/37 | 94,6 | (82,3; 98,5) |
| Всего | OPA | 114/117 | 97,4 | (92,7; 99,1) |

* При использовании метода IHC статус pMMR образца формулируется как «Неизмененная» для всех MMR-белков, в то время как при статусе dMMR наблюдается потеря экспрессии одного или нескольких MMR-белков. В рамках молекулярного тестирования статус pMMR представляет собой отсутствие патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1, в то время как статус dMMR представляет собой наличие патогенных мутаций или гиперметилирования промотора MLH1. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

**Таблица** 13. Совпадения между методом IHC с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и молекулярным тестированием

| BRAF V600E **Статус** (**Молекулярное тестирование**/IHC) | **Совпадение** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Тип** | n/N | % | 95% CI |
| Положительный//аномальный | PPA | 23/23 | 100,0 | (85,7; 100,0) |
| Отрицательный/ нормальный | NPA | 95/95 | 100,0 | (96,1; 100,0) |
| Всего | OPA | 118/118 | 100,0 | (96,8; 100,0) |

Статус для BRAF V600E был определен как «положительный» или «отрицательный» по результатам IHC и «аномальный» (присутствие мутации V600E) или «нормальный» (BRAF дикого типа) по результатам молекулярного тестирования. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.



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

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ


1. Yuan L, Chi Y, Chen W, Chen X, Wei P, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. Int J Clin Exp Med. 2015;8(11):20988-21000.
2. Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. Arch Pathol Lab Med. 2011;135(10):1269-1277.
3. Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. Am J Surg Pathol. 2003;27(11):1393-1406.
4. Tiwari AK, Roy HK, Lynch HT. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. QJM. 2016;109(3):151-158.
5. Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. Expert Rev Mol Diagn. 2016;16(5):591-604.
6. Silva FCC, Torrezan GT, Ferreira JRO, Oliveira LP, Begnami M, et al. Germline Mutations in MLH1 Leading to Isolated Loss of PMS2 Expression in Lynch Syndrome: Implications for Diagnostics in the Clinic. Am J Surg Pathol. 2017;41(6):861-864.
7. Boyer JC, Umar A, Risinger JI, Lipford JR, Kane M, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. Cancer Res. 1995;55(24):6063-6070.
8. Lawes DA, Pearson T, Sengupta S, Boulos PB. The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. Br J Cancer. 2005;93(4):472-477.
9. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med. 2003;348(10):919-932.
10. Peltomaki P. Role of ДНК mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. J Clin Oncol. 2003;21(6):1174-1179.
11. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. Cancer. 1996;78(6):1149-1167.
12. Caldes T, Godino J, Sanchez A, Corbacho C, De la Hoya M, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. Oncol Rep. 2004;12(3):621-629.
13. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, et al. Value of immunohistochemical detection of ДНК mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. Am J Surg Pathol. 2005;29(1):96-104.
14. Cunningham JM, Tester DJ, Thibodeau SN. Mutation detection in colorectal cancers : direct sequencing of ДНК mismatch repair genes. Methods Mol Med. 2001;50:87-98.
15. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002;417(6892):949-954.
16. Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. J Pathol. 2011;223(2):219-229.
17. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. J Med Genet. 2004;41(9):664-668.
18. Jin M, Hampel H, Zhou X, Schunemann L, Yearsley M, et al. BRAF V600E mutation analysis simplifies the testing algorithm for Lynch syndrome. Am J Clin Pathol. 2013;140(2):177-183.
19. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2004;10(1 Pt 1):191-195.
20. Tiacci E, Schiavoni G, Forconi F, Santi A, Trentin L, et al. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. Blood. 2012;119(1):192-195.
21. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, et al. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. Diseases of the Colon & Rectum. 2014;57(8):1025-1048.
22. Egoavil C, Alenda C, Castillejo A, Paya A, Peiro G, et al. Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers. PLoS One. 2013;8(11):e79737.
23. Connell LC, Mota JM, Braghiroli MI, Hoff PM. The Rising Incidence of Younger Patients With Colorectal Cancer: Questions About Screening, Biology, and Treatment. Curr Treat Options Oncol. 2017;18(4):23.
24. Provenzale D, Gupta S, Ahnen DJ, Bray T, Cannon JA, et al. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2016;14(8):1010-1030.
25. Balmana J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D, Group EGW. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. Ann Oncol. 2013;24 Suppl 6:vi73-80.
26. Evaluation of Genomic Applications in P, Prevention Working G. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. Genet Med. 2009;11(1):35-41.
27. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst. 2004;96(4):261-268.
28. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. J Med Genet. 2012;49(3):151-157.
29. Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting ДНК mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. Semin Diagn Pathol. 2015;32(5):352-361.
30. Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, Gylling A, Lahtinen L, et al. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. Virchows Arch. 2013;463(5):613-621.
31. Toon CW, Chou A, DeSilva K, Chan J, Patterson J, et al. BRAFV600E immunohistochemistry in conjunction with mismatch repair status predicts survival in patients with colorectal cancer. Mod Pathol. 2014;27(5):644-650.
32. Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. Int J Cancer. 2004;108(2):237-242.
33. Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, et al. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. Acta Neuropathol. 2011;122(1):11-19.
34. Capper D, Berghoff AS, Magerle M, Ilhan A, Wohrer A, et al. Immunohistochemical testing of BRAF V600E status in 1,120 tumor tissue samples of patients with brain metastases. Acta Neuropathol. 2012;123(2):223-233.
35. Carson FL, Hladik C, Cappellano CH, Pathology ASfC. Histotechnology: A Self-Instructional Text: American Society for Clinical Pathology; 2015.
36. Roche PC, Hsi ED, Firfer BL. Immunohistochemistry: Principles and Advances. Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology, 7th Edition: American Society of Microbiology; 2006.
37. Rabinovitch A. The College of American Pathologists laboratory accreditation program. Accreditation and Quality Assurance. 2002;7(11):473-476.
38. CSLI. Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
39. Kuan SF, Navina S, Cressman KL, Pai RK. Immunohistochemical detection of BRAF V600E mutant protein using the VE1 antibody in colorectal carcinoma is highly concordant with molecular testing but requires rigorous antibody optimization. Hum Pathol. 2014;45(3):464-472.
40. Day F, Muranyi A, Singh S, Shanmugam K, Williams D, et al. A mutant BRAF V600E-specific immunohistochemical assay: correlation with molecular mutation status and clinical outcome in colorectal cancer. Target Oncol. 2015;10(1):99-109.





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

## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW и логотип VENTANA являются товарными знаками Roche.

Все остальные товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

© 2019 Ventana Medical Systems, Inc. и Roche Diagnostics International, Inc.

## КОНТАКТЫ



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.

www.ventana.com



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

# VENTANA HA Assay

REF 790-6074

08289018001

IVD Σ 50

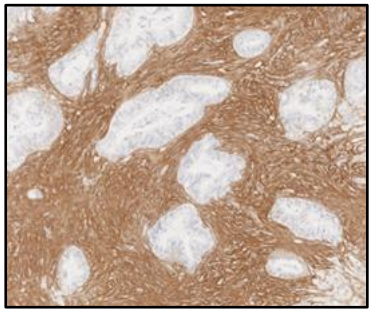


**Рисунок 1. Пример окрашивания ГК в аденокарциноме протоков поджелудочной железы.**

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Реагент VENTANA HA Assay предназначен для лабораторного применения с целью обнаружения гиалуронана в срезах фиксированных формалином и залитых в парафин тканей при окраске на аппаратах BenchMark IHC/ISH с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit и извлечении мишени с помощью Protease 1.

Интерпретацию результатов должен выполнять квалифицированный патоморфолог с учетом результатов гистологического исследования и необходимых клинических данных после сравнения с соответствующими контролями.

Данный продукт предназначен для диагностики *in vitro* (IVD).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

Гиалуронан, или гиалуроновая кислота (ГК), представляет собой линейный гликозаминогликан (ГАГ), состоящий из повторяющихся дисахаридных звеньев D-глюкуроновой кислоты β1,3-N-ацетилглюкозамин-β1-4 и преимущественно присутствующий в соединительных тканях.[1,2] В дополнение к структурным функциям ГК также участвует в передаче сигналов рецепторов клеточной поверхности, включая CD44 и RHAMM. Аномально высокая экспрессия ГК в опухолях была связана с повышенной инвазивностью и более агрессивным течением заболевания.[3,4,5] ГК может изменить микросреду опухоли путем увеличения давления интерстициальной жидкости, уменьшения межклеточного контактного стимулирования эпителиально-мезенхимального перехода и снижения реакции опухоли на стандартные методы лечения.

ГК является высококонсервативной среди позвоночных и, следовательно, обладает слабой иммуногенностью. Характеристика уровней ГК в опухолевой ткани в значительной степени была основана на экстрактах ГК-связывающего белка из хряща или других природных источников. ФНО-стимулированный ген 6 (TSG6) имеет модуль связывания с гиалуроновой связью, который специфически связывается с ГК. Этот модуль был клонирован и изменен с целью получения рекомбинантного ГК-связывающего белка с высокой аффинностью и специфичностью к ГК.[6]

VENTANA HA Assay предназначен для лабораторного использования и представляет собой аффинный гистохимический (АГХ) реагент, предназначенный для оценки уровней ГК в фиксированной формалином и залитой в парафин человеческой ткани.

## ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Реагент VENTANA HA Assay представляет собой рекомбинантный ГК-связывающий белок, который связывается с гиалуронаном в срезах фиксированной формалином и залитой в парафин ткани. Связанный белок можно визуализировать с помощью набора OptiView DAB IHC Detection Kit. Дополнительную информацию см. на листке-вкладыше в наборе OptiView DAB IHC Detection Kit.

См. листок-вкладыш набора OptiView DAB IHC Detection Kit, чтобы ознакомиться с более подробным описанием: 1) принципов действия; 2) необходимых материалов и реагентов, не входящих в комплект; 3) сбора образцов тканей и подготовки к анализу; 4) процесса контроля качества; 5) принципов поиска и устранения проблем; 6) интерпретации результатов; 7) общих ограничений.

## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

VENTANA HA Assay содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 50 тестов.

Один дозатор объемом 5 мл с реагентом VENTANA HA Assay содержит приблизительно 0,8 мкг рекомбинантного ГК-связывающего белка.

Реагент разбавляют в разбавителе Tris-HCl с 10 мг/мл белка-носителя, консерванта ProClin 300 и 0,17 % Brij-35.

Общая концентрация белка в реагенте составляет примерно 10 мг/мл. Концентрация специфических реагентов составляет приблизительно 0,16 мкг/мл.

## НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ МАТЕРИАЛЫ

В комплект поставки не входят красящие реагенты, например наборы для обнаружения VENTANA, а также вспомогательные компоненты, в том числе микропрепараты для отрицательного и положительного контроля.

Продукты, перечисленные в листке-вкладыше, могут быть недоступны в некоторых странах. Проконсультируйтесь с местным представителем службы поддержки.

В следующем списке перечислены важные для проведения анализа компоненты, но этот список не является исчерпывающим в отношении требуемых, но не входящих в комплект поставки материалов.

1. Рекомендуемые ткани с положительными и отрицательными контролями
2. Предметные стекла для микроскопа (с положительным зарядом)
3. OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700 / 06396500001)
4. Protease 1 (№ по каталогу 760-2018 / 05266688001)
5. Hematoxylin II (№ по каталогу 790-2208 / 05277965001)
6. Bluing Reagent (№ по каталогу 760-2037 / 05266769001)

## ХРАНЕНИЕ

После получения препарата и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживать.

Чтобы обеспечить надлежащую сохранность и стабильность реактива, после каждого использования дозатор необходимо сразу закрывать крышкой и ставить в холодильник в вертикальном положении.

На каждом флаконе-дозаторе указана дата окончания срока годности. При соблюдении условий хранения реагент остается стабильным до даты, указанной на этикетке. Не использовать реагент после истечения срока годности.

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Этот анализ можно применять для окрашивания подготовленных стандартным образом, фиксированных формалином и залитых в парафин тканей при условии использования наборов для обнаружения VENTANA и аппаратов для окрашивания BenchMark IHC/ISH. В качестве фиксатора ткани рекомендуется использовать 10 %-й раствор нейтрального забуференного формалина[7] в течение не более 72 часов. Фиксаторы с высокой концентрацией спирта (например, 95 %-й этанол) продемонстрировали неприемлемое окрашивание при любой испытанной продолжительности фиксации и не рекомендуются для использования с этим анализом. Рекомендуемая толщина срезов для использования с реагентом VENTANA HA Assay составляет приблизительно 5 микрон. Полученные срезы ткани необходимо поместить на положительно заряженные предметные стекла. Срезы, помещенные на предметные стекла, следует хранить при температуре 2–30 °C. Их окрашивание следует выполнить в течение 90 дней после микротомирования для получения оптимальных результатов окрашивания.

При анализе образцов ткани пациента рекомендуется одновременно проводить положительный и отрицательный контроль (в одном анализе).

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики *in vitro* (IVD).
2. **ВНИМАНИЕ!** Федеральное законодательство США разрешает продажу этой продукции только медицинским работникам или по их заказу. (Rx Only)
3. Только для профессионального использования.
4. В данном реагенте в качестве консерванта используется раствор ProClin 300. Он относится к раздражающим средствам и при контакте с кожей может стать причиной сенсибилизации. При работе с реагентом соблюдайте меры предосторожности. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. Используйте защитную одежду и перчатки.



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

5. Материалы человеческого или животного происхождения следует считать биологически опасными материалами и утилизировать, соблюдая все необходимые меры предосторожности.
6. Избегайте контакта реагентов с глазами и слизистыми оболочками. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды.
7. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.
8. Обратите внимание, что обладающие положительно заряженные предметные стекла могут быть подвержены неблагоприятным воздействиям со стороны окружающей среды, вследствие чего окрашивание при проведении любых АГХ анализов будет иметь неудовлетворительные результаты (например, вследствие недостаточного количества первичного рекомбинантного связывающего белка или контрастного окрашивания в тканях). Запросите у своего представителя компании Roche копию документа «Impacts of Environmental Stresses on IHC Positively Charged Slides» для того, чтобы лучше понять принцип использования стекол такого типа.
9. Проконсультируйтесь с местными и (или) государственными органами в отношении рекомендованного способа утилизации.
10. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Реагент VENTANA HA Assay предназначен для использования с автоматическим стейнером BenchMark IHC/ISH в сочетании с набором OptiView DAB IHC Detection Kit и дополнительными реактивами. Рекомендованные протоколы окрашивания представлены в Таблица 1.

Этот ГК-связывающий белок оптимизирован для инкубации в течение определенного времени, однако пользователь должен провести валидацию результатов, полученных с использованием данного реагента.

Параметры автоматизированных процедур можно отобразить на дисплее, распечатать и отредактировать в соответствии с процедурой, представленной в руководстве по эксплуатации аппарата. Подробная информация о процедурах гистохимического окрашивания содержится на листке-вкладыше соответствующего набора для обнаружения VENTANA.

**Таблица 1.** Рекомендуемый протокол окрашивания реагентом VENTANA HA Assay с набором OptiView DAB IHC Detection Kit на автоматическом стейнере BenchMark IHC/ISH.

| Тип процедуры | Метод |
|---|---|
| **Прогрев** | Не требуется |
| **Извлечение мишени*** | Protease I, 4 минуты |
| **ГК-связывающий белок или Protease Negative Reagent Control** | Автоматический стейнер BenchMark IHC/ISH 12 минут, 36 °C (по умолчанию) |
| **Контрастное окрашивание** | Hematoxylin II, 8 минут |
| **Обработка после контрокрашивания** | Bluing, 8 минут |

* Кондиционирование клеток (CC1) выполнять не рекомендуется.

## РЕАГЕНТ ДЛЯ ОТРИЦАТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ ПРОТЕАЗЫ

Соответствующий реагент для отрицательного контроля следует использовать при окрашивании каждого тестируемого образца ткани пациента, чтобы облегчить процедуру интерпретации результатов. Protease Negative Reagent Control (№ по кат. 790-6040) следует использовать вместо ГК-связывающего белка на определенных срезах для оценки неспецифического окрашивания. Для реагента Protease Negative Reagent Control должны использоваться те же параметры протокола, что и для VENTANA HA Assay. Окрашенный срез Protease Negative Reagent Control является критически важным компонентом реагента VENTANA HA Assay.

## ТКАНИ ДЛЯ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО И ОТРИЦАТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ

Примером ткани положительного контроля для этого реагента является здоровая кожа, которая демонстрирует высокое содержание ГК в дерме и низкое или умеренное содержание ГК в созревающих супрабазальных кератиноцитах.

Примером ткани отрицательного контроля для этого реагента является здоровая печень, которая демонстрирует нулевое содержание ГК в гепатоцитах и любое содержание ГК в портальных пространствах при окрашивании на предмет ГК любой интенсивности.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОКРАШИВАНИЯ/ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Окрашивания с использованием реагента VENTANA HA Assay в основном наблюдается во внеклеточном матриксе или строме. ГК повсеместно экспрессируется в различных типах здоровых и опухолевых тканей, перечисленных в таблице 2 и таблице 3. Окрашивание опухолевых клеток также может наблюдаться в цитоплазме и (или) мембране.

## ОСОБЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Применение реагента VENTANA HA Assay было оптимизировано на автоматическом стейнере BenchMark IHC/ISH в сочетании с набором OptiView DAB IHC Detection Kit при использовании параметров, перечисленных в таблице 1. Пользователь должен провести подтверждение корректности результатов, полученных с использованием реагента VENTANA HA Assay.
2. Гистохимический анализ — это многоэтапный диагностический процесс, который требует специальной подготовки при выборе надлежащих реагентов и тканей, фиксации, обработке и подготовке предметных стекол, а также интерпретации результатов окрашивания.
3. Окрашивание тканей зависит от обработки ткани перед окрашиванием. Ненадлежащее выполнение фиксации, замораживания, оттаивания, промывки, высушивания, нагрева или микротомирования, а также загрязнение образца другими тканями и жидкостями могут привести к появлению артефактов или получению ложноотрицательных результатов. Различия в методах фиксации и заливки могут стать причиной противоречивости получаемых результатов.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Результаты окрашивания тестовых препаратов с целью определения специфичности, чувствительности и воспроизводимости приведены в таблицах 2 и 3, а также в разделе «Воспроизводимость».

### Специфичность

**Таблица 2.** Аналитическую реакционную способность реагента VENTANA HA Assay определяли путем окрашивания фиксированных формалином и залитых в парафин здоровых тканей.

| Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев | Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|---|---|
| Головной мозг | 3/3 | Костный мозг | 0/3 |
| Мозжечок | 3/3 | Легкое | 3/3 |
| Надпочечник | 3/3 | Сердце | 3/3 |
| Яичник | 3/3 | Пищевод | 3/3 |
| Поджелудочная железа | 3/3 | Желудок | 3/3 |
| Лимфоузел | 3/3 | Стенка кишечника | 3/3 |
| Гипофиз | 3/3 | Толстая кишка | 3/3 |
| Яичко | 3/3 | Печень | 1/3 |
| Щитовидная железа | 3/3 | Язык | 3/3 |



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

| Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев | Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|---|---|
| Молочная железа | 3/3 | Почка | 3/3 |
| Селезенка | 1/3 | Простата | 3/3 |
| Миндалина | 3/3 | Мочевой пузырь | 3/3 |
| Вилочковая железа | 3/3 | Паращитовидная железа | 3/3 |

### Чувствительность

**Таблица 3.** Аналитическую чувствительность VENTANA HA Assay определяли путем окрашивания ряда фиксированных формалином и залитых в парафин препаратов опухолевых тканей.

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Глиобластома (головной мозг) | 1/1 |
| Менингиома (головной мозг) | 1/1 |
| Эпендимома (головной мозг) | 1/1 |
| Олигодендроглиома (головной мозг) | 1/1 |
| Серозная аденокарцинома (яичники) | 1/1 |
| Аденокарцинома (яичники) | 1/1 |
| Нейроэндокринное новообразование поджелудочной железы (поджелудочная железа) | 1/1 |
| Аденокарцинома (поджелудочная железа) | 1/1 |
| Семинома (яички) | 2/2 |
| Медуллярная карцинома (щитовидная железа) | 1/1 |
| Папиллярная карцинома (щитовидная железа) | 1/1 |
| Микроинвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 1/2 * |
| Инвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 1/1 |
| В-клеточная лимфома; неуточненная (селезенка) | 1/1 |
| Мелкоклеточная карцинома (легкое) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (легкое) | 1/1 |
| Аденокарцинома (легкое) | 1/1 |
| Нейроэндокринная карцинома (пищевод) | 1/1 |
| Аденокарцинома (пищевод) | 1/1 |
| Перстневидноклеточная карцинома (желудок) | 1/1 |
| Аденокарцинома (тонкая кишка) | 1/1 |
| Стромальная саркома (тонкая кишка) | 0/1 |
| Аденокарцинома (толстая кишка) | 1/1 |
| Желудочно-кишечная стромальная опухоль (ЖКСО) (толстая кишка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (прямая кишка) | 1/1 |
| Желудочно-кишечная стромальная опухоль (ЖКСО) (прямая кишка) | 0/1 |
| Гепатоцеллюлярная карцинома (печень) | 0/1 |
| Гепатобластома (печень) | 1/1 |
| Светлоклеточная карцинома (почки) | 1/1 |
| Аденокарцинома (простата) | 2/2 |
| Лейомиома (матка) | 0/1 * |
| Аденокарцинома (матка) | 1/1 |
| Светлоклеточная карцинома (матка) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (шейка матки) | 2/2 |
| Эмбриональная рабдомиосаркома (поперечно-полосатая мускулатура) | 1/1 |
| Меланома (прямая кишка) | 1/1 |
| Базальноклеточная карцинома (кожа) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (кожа) | 1/1 |
| Нейрофиброма (поясница) | 1/1 |
| Нейробластома (забрюшинное пространство) | 1/1 |
| Мезотелиома (брюшина) | 1/1 |
| В-клеточная лимфома; неуточненная (лимфатический узел) | 2/2 |
| Лимфома Ходжкина (Hodgkin) (лимфатический узел) | 1/1 |
| Переходноклеточная карцинома (мочевой пузырь) | 1/1 |
| Лейомиосаркома (мочевой пузырь) | 0/1 |
| Остеосаркома | 1/1 |
| Веретеноклеточная рабдомиосаркома (брюшина) | 1/1 |
| Лейомиосаркома (гладкая мускулатура) | 1/1 |

* Недопустимое фоновое окрашивание в 1 образце



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

### Воспроизводимость

Исследования воспроизводимости окрашивания реагентом VENTANA HA Assay проводились с целью определения следующих параметров:

- Воспроизводимости результатов между партиями рекомбинантного ГК-связывающего белка.
- Воспроизводимости в пределах одного цикла и между циклами на одном аппарате BenchMark IHC/ISH.
- Воспроизводимости внутри платформы с использованием аппаратов BenchMark IHC/ISH.
- Воспроизводимости между платформами с использованием аппаратов BenchMark XT и BenchMark ULTRA и аппаратов BenchMark GX и BenchMark ULTRA.

Все исследования соответствовали критериям приемлемости.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ


1. Evanko SP, Tammi MI, Tammi RH, Wight TN. Hyaluronan-dependent pericellular matrix. Adv Dr Del Rev. 2007;59:1351-1365.
2. Kogan G, Soltes L, Stern R, Gemeiner P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. Biotechnol Lett. 2007;29:17-25
3. Itano N, Zhuo L, Kimata K. Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression. Cancer Sci. 2008;99(9):1720-1725.
4. Toole BP. Hyaluronan-CD44 interactions in cancer: paradoxes and possibilities. Clin Cancer Res. 2009;15(24):7462-7468.
5. Kultti A, Li X, Jiang P, Thompson CB, Frost GI, Shepard HM. Therapeutic targeting of hyaluronan in the tumor stroma. Cancers (Basel). 2012;4(3):873-903.
6. Jadin L, Huang L, Wei G, Zhao Q, Gelb AB, Frost GI, Jiang P, Shepard HM. Characterization of a novel recombinant hyaluronan binding protein for tissue hyaluronan detection. J Histochem Cytochem. 2014;62(9):672-683.
7. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.


## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ


VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW и логотип VENTANA являются товарными знаками Roche.

Все остальные товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

© 2018 Ventana Medical Systems, Inc.


## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ


Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

www.ventana.com

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.





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

# VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

REF 800-6043

08314373001

IVD Σ 30

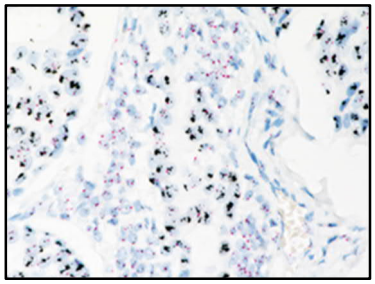


**Рисунок** 1. **Амплификация статуса гена** HER2 **с помощью анализа** HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail VENTANA, **карцинома молочной железы**.

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Анализ VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail предназначен для определения статуса гена HER2 путем подсчета отношения гена HER2 к хромосоме 17 (Chromosome 17) с помощью световой микроскопии. Зонды HER2 и хромосомы 17 обнаруживаются после окрашивания на аппарате BenchMark IHC/ISH с помощью двухцветной хромогенной in situ-гибридизации в фиксированных в формалине и залитых в парафин гистологических образцах рака молочной железы и желудка, включая рак области пищеводно-желудочного перехода.

Анализ VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail используется как вспомогательное средство при оценке целесообразности назначения препарата Herceptin (трастузумаб). Результаты должны интерпретироваться квалифицированным патоморфологом с учетом данных гистологического исследования, соответствующих клинических данных и сравнения с контрольными образцами.

Этот продукт предназначен для диагностики in vitro (IVD).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

Ген HER2/neu (HER2) относится к семейству, состоящему из четырех трансмембранных рецепторных тирозинкиназ, которые обеспечивают рост, дифференцировку и выживание клеток [1, 2]. Ген HER2 кодирует белок HER2 [2, 3]. Гиперэкспрессия белка HER2, амплификация гена HER2 или оба упомянутых процесса наблюдаются приблизительно в 15–25 % случаев рака молочной железы и сопровождаются агрессивным развитием опухоли [4, 5]. Анализ VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail содержит зонд HER2 (меченный динитрофенилом (DNP) в качестве гаптена) и зонд хромосомы 17 (меченный дигоксигенином (DIG) в качестве гаптена) в формамидном буфере. Эти зонды предназначены для выявления амплификации гена HER2 в клетках инвазивной карциномы молочной железы и желудка. ДНК-зонд HER2 представляет собой смесь олигозондов, специфично нацеленных на ген HER2 (который также известен под названиями ERBB2 и NEU). Данный ген находится на хромосоме 17 человека (17q12). Зонд к 17-й хромосоме представляет собой смесь олигозондов,специфично нацеленных к повторам центромерного участка хромосомы. Он служит для определения случаев анеусомии (т. е. увеличения количества копий 17-й хромосомы в клетках). Чтобы определить состояние амплификации HER2, в ядрах клеток опухоли подсчитывается количество копий обоих зондов и результаты представляются в виде отношения HER2/хромосома 17 (значение отношения HER2/хромосома 17 ≥2,0 соответствует наличию амплификации; если оно <2,0, то амплификация отсутствует).

В ходе многих клинических исследований показано, что амплификация и (или) гиперэкспрессия HER2 указывает на плохой клинический прогноз для пациентов с инвазивным раком молочной железы и коррелирует с несколькими другими негативными прогностическими показателями, в том числе с негативным статусом по эстрогенным рецепторам (estrogen receptor, ER), высокой фракцией S-фазы, вовлечением лимфоузлов, мутацией p53, а также высоким ядерным индексом [6, 7]. В ходе нескольких исследований показано, что при инвазивном раке молочной железы (с вовлечением лимфоузлов и без него) с амплификацией гена HER2 снижается выживаемость и повышается вероятность рецидивов [1, 8–11]. Исследования, в ходе которых иммуногистохимическими методами определялась гиперэкспрессия белка HER2, показали сходные результаты с амплификацией гена HER2 [9, 11–13]. Таким образом, определение статуса экспрессии и (или) амплификации HER2 при инвазивном раке молочной железы дает врачам ценную информацию для принятия решения о стратегии лечения.

Препарат трастузумаб (Herceptin) является гуманизированным моноклональным антителом к внеклеточному домену белка HER2. Он показал хорошие результаты при лечении рака молочной железы с положительным HER2-статусом [14–19]. Лечение трастузумабом показано только пациенткам, у которых обнаружена гиперэкспрессия белка и (или) амплификация гена HER2. Клинические исследования показали, что наилучшие результаты лечения трастузумабом наблюдаются у пациентов с высокой степенью гиперэкспрессии белка и (или) амплификации гена HER2 [20]. Определение амплификации гена HER2 и (или) гиперэкспрессии белка необходимо у пациенток с инвазивным раком молочной железы для терапии трастузумабом, которая считается эффективной у данной категории пациенток. Аналогичные результаты были обнаружены в клинических исследованиях, посвященных раку желудка [21]. Терапия трастузумабом показана пациентам с гиперэкспрессией или амплификацией HER2.

## ПРИНЦИП ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Анализ VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail подходит для использования с VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit, VENTANA Red ISH DIG Detection Kit и дополнительными реагентами на аппарате BenchMark IHC/ISH.

Диагностический набор содержит первичные антитела и меченные ферментами вторичные антитела, связанные с пероксидазой хрена (ПХ) или щелочной фосфатазой (ЩФ), используемой в качестве хромогенного фермента. Во время двойной гибридизации in situ (Dual in situ hybridization, Dual ISH) два типа зондов, меченных соответственно DNP и DIG, гибридизируются с соответствующими специфическими комплементарными участками ДНК (DNA) в клеточных ядрах. Обнаружение зонда HER2, меченного DNP, происходит в первую очередь с использованием VENTANA Silver ISH (SISH) DNP Detection Kit, который содержит следующие дозаторы: мышиное анти-DNP первичное антитело, меченное гидроксихиноксалином (HQ), мышиное анти-HQ вторичное антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP), Chromogen A (Silver A), Chromogen B (Silver B) и Chromogen C (Silver C). После инкубации с HQ-меченным мышиным анти-DNP первичным антителом, а затем с мышиным анти-HQ, конъюгированным с HRP вторичным антителом происходит реакция SISH. Описывая эту реакцию кратко, можно сказать, что она вызвана последовательным добавлением Chromogens A (ацетата серебра), B (гидроксихинона) и C ($H_2O_2$). При этом ионы серебра ($Ag^+$) восстанавливаются гидрохиноном до атомов металлического серебра ($Ag^0$). Источником энергии для протекания этой реакции является субстрат HRP — перекись водорода (Chromogen C). Преципитат серебра откладывается в ядре клетки, и единичная копия гена HER2 визуализируется в виде черного сигнала. Схема протекания реакции SISH показана на рис. 2.

После обнаружения гена HER2 с помощью реакции SISH обнаружение меченной DIG хромосомы 17 проводится с помощью VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Этот набор включает следующие дозаторы: мышиное анти-DIG первичное антитело, меченное нитропиразолом (NP), мышиное анти-NP вторичное антитело, конъюгированное с Alkaline Phosphatase (AP), pH Enhancer, Naphthol и Fast Red. После обнаружения сигнала SISH микропрепарат инкубируется с меченными NP мышиными первичными антителами к DIG (mouse anti-DIG primary antibody), которые связываются с гаптеном (hapten) DIG на зонде хромосомы 17. Первичное антитело антигаптен обнаруживается с помощью мышиных анти-NP антител, конъюгированных с ферментом AP. Микропрепарат инкубируется с раствором pH Enhancer, который обеспечивает необходимый состав и концентрацию солей, а также буферный pH для оптимальной активности фермента AP. Затем добавляют нафтол-фосфат, который служит в качестве субстрата для фермента AP (AP обеспечивает дефосфорилирование нафтола). Fast Red, который вносят следующим в микропрепарат, соединяется с дефосфорилированным нафтолом и образует красный осадок, который легко визуализируется с помощью световой микроскопии. Рисунок 3 иллюстрирует реакцию Red ISH. Затем препарат окрашивается контрастным красителем Hematoxylin II и исследуется под световым микроскопом.

Протокол окрашивания состоит из нескольких этапов, на которых реагенты инкубируются в течение предварительно установленного времени и при предварительно заданной температуре. После завершения каждого этапа инкубации аппарат BenchMark IHC/ISH промывает срезы, чтобы удалить несвязанный материал, и применяет жидкое покрытие, минимизирующее испарение со стекла водных растворов реактивов. Результаты интерпретируются с помощью светового микроскопа с увеличением объектива 20x, 40x и (или) 60x.



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

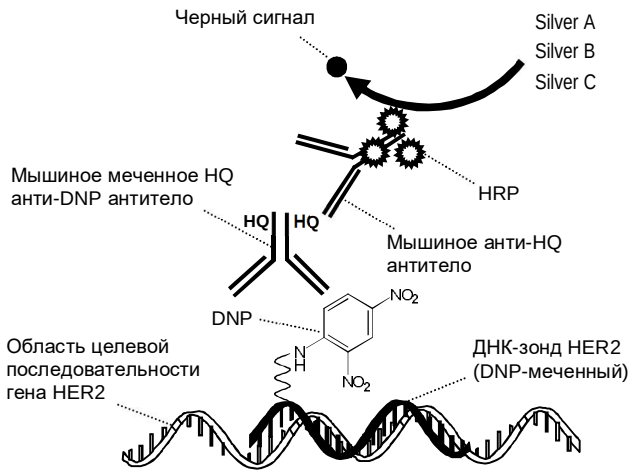



**Рисунок** 2. VENTANA Silver ISH DNP Detection **Для гена** HER2

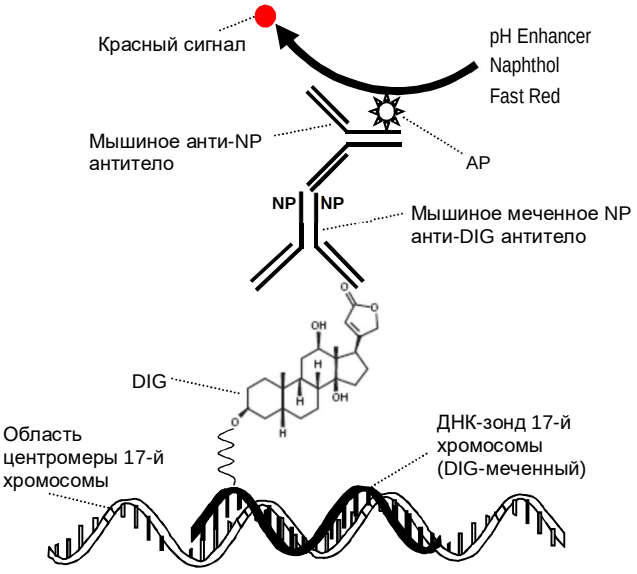



**Рисунок** 3. VENTANA Red ISH DIG Detection **хромосомы** 17

## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

Дозатор VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 30 анализов.

Один дозатор 6 мл VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail содержит приблизительно 14 мкг/мл меченного динитрофенилом (DNP) зонда HER2 и 0,24 мкг/мл зонда хромосомы 17, меченного дигоксигенином (DIG), в формамидном буферном растворе для реакции гибридизации. Оба зонда применяются для определения статуса гена HER2 (т. е. отношения HER2/хромосомы 17).

## ВОССТАНОВЛЕНИЕ, СМЕШИВАНИЕ, РАЗБАВЛЕНИЕ И ТИТРОВАНИЕ РЕАГЕНТОВ

Анализ VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail оптимизирован для использования с аппаратами BenchMark IHC/ISH. Восстановление, смешивание, разведение и титрование зонда не требуется.

## НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

Реагенты для окрашивания, например наборы для обнаружения VENTANA и дополнительные компоненты, в комплект поставки не входят.

Продукты, перечисленные в листке-вкладыше, могут быть недоступны в некоторых странах. Проконсультируйтесь с местным представителем службы поддержки.

Реагенты и материалы, необходимые для окрашивания, но не входящие в комплект поставки:

1. VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit (№ по каталогу 760-516 / 08318883001)
2. VENTANA Red ISH DIG Detection Kit (№ по каталогу 760-512 / 08318832001)
3. HybReady Solution (№ по каталогу 780-4409 / 05917557001)
4. ISH Protease 3 (№ по каталогу 780-4149 / 05273331001)
5. Hematoxylin II (№ по каталогу 790-2208 / 05277965001)
6. Bluing Reagent (№ по каталогу 760-2037 / 05266769001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-300 / 05353955001)
8. SSC (10X) (№ по каталогу 950-110 / 05353947001)
9. EZ Prep Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-102 / 05279771001)
10. uItraView Silver Wash II (Pre-dilute) (№ по каталогу 780-003 / 05446724001)
11. Нерасфасованные реагенты, специфичные для аппаратов BenchMark GX и XT:
    - Cell Conditioning Solution 1 (CC1) (Pre-dilute) (№ по каталогу 950-124 / 05279801001)
    - Cell Conditioning Solution 2 (CC2) (Pre-dilute) (№ по каталогу 950-123 / 05279798001)
    - Liquid Coverslip (LCS) (Pre-dilute) (№ по каталогу 650-010 / 05264839001)
12. Нерасфасованные реагенты, специфичные для аппарата BenchMark ULTRA:
    - ULTRA CC1 (Pre-dilute) (№ по каталогу 950-224 / 05424569001)
    - ULTRA CC2 (Pre-dilute) (№ по каталогу 950-223 / 05424542001)
    - ULTRA LCS (Pre-dilute) (№ по каталогу 650-210 / 05424534001)
13. Аппарат BenchMark IHC/ISH
14. Этикетки со штрихкодами
15. Предметные стекла для микроскопа с положительным зарядом (Superfrost Plus или эквивалентные)
16. Ксилол (гистологической степени очистки).
17. Деионизированная или дистиллированная вода
18. Постоянная гистологическая среда **
19. Покровное стекло для помещения образцов ткани под стекло
20. Автоматическое приспособление для накрывания препаратов покровным стеклом (например, Tissue-Tek SCA automated coverslipper)
21. Емкости или ванночки для окрашивания
22. Сушильный шкаф, способный поддерживать температуру 60 °C
23. Таймер
24. Световой микроскоп с объективом 20x, 40x и (или) 60x
25. Мягкое моющее средство
26. HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides (№ по каталогу 783-4422 / 05640300001): при необходимости возможно использование для устранения неполадок.

** Совместимые с данным реагентом гистологические среды для заливки перечислены в Таблица 24.

## ХРАНЕНИЕ

После получения препарата и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживать.

Чтобы обеспечить надлежащую подачу реагента и стабильность зонда, после каждого использования необходимо заменять колпачок дозатора. Дозатор следует немедленно ставить в холодильник в вертикальном положении.

На каждом дозаторе с образцом указан срок годности. При соблюдении условий хранения реагент остается стабильным до даты, указанной на этикетке. Не использовать реагент после истечения срока годности.

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Данный зонд пригоден для использования с подвергшимися стандартной обработке, фиксированными формалином и залитыми в парафин (FFPE) срезами тканей на аппарате BenchMark IHC/ISH. Рекомендуемый фиксатор ткани — это 10-процентный нейтральный буферный формалин с продолжительностью фиксации от 6 часов до



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

72 часов [22]. Помимо анализов, проведенных компанией VENTANA, исследования показали, что большинство «неубедительных» результатов исследования гена HER2 методом FISH связаны с преданалитическими факторами, в частности недостаточной или избыточной фиксацией [23], а также отсроченной фиксацией материала [24]. Строгое соблюдение условий фиксации (длительность которой не менее 6 часов) приводило к уменьшению «неубедительных» случаев на 68,5 %: с 10,8 до 3,4 %. В образцах, которые фиксировали <6 часов в формалине, может наблюдаться потеря сигнала или чрезмерное расщепление ядра, что характеризуется бледным/слабым окрашиванием. Фиксацию рекомендуется проводить в 10-процентном NBF, так как некоторые фиксаторы имеют вариабельное окрашивание на основе ISH-анализа (включая Bouin's и спирт-формалин-уксусную кислоту [AFA]) [21].

Препараты следует окрашивать немедленно, так как качество целевых нуклеиновых кислот в срезах ткани со временем может ухудшиться. Внутренние исследования показали, что образцы тканей молочных желез и желудка, хранящиеся при температуре 2–8 °C, сохраняют стабильность в течение 12 месяцев. Обладающие положительным электрическим зарядом предметные стекла могут быть подвержены неблагоприятным воздействиям со стороны окружающей среды, вследствие чего окрашивание любыми ISH-методами приведет к неудовлетворительным результатам, например вследствие недостаточного окрашивания или контрастного окрашивания в тканях. Запросите у своего представителя компании копию документа «Неблагоприятные воздействия со стороны окружающей среды на различные типы предметных стекол с гистологическими срезами» (Impact of environmental stress on various histology slide types) для того, чтобы лучше понять принцип использования предметных стекол.

Каждый срез следует приготовить соответствующей толщины (4 мкм), чтобы обеспечить проведение анализа и поместить на положительно заряженные предметные стекла (Superfrost Plus или эквивалент). Чтобы удалить избыток воды между стеклом и тканью, предметные стекла должны быть высушены.

Для срезов, толщина которых превышает 4 мкм, может потребоваться обработка протеазой интенсивнее рекомендованной. Ввиду избытка парафина в ткани может отмечаться большее количество пузырьков в ядрах, чем в более тонких срезах. Пузырьки в ядрах могут иметь большие и малые размеры. Также возможно наличие вакуолей. При возникновении ядерных пузырей часто наблюдается целый спектр эффектов SISH и сигналов Red ISH, которые характеризуются следующими признаками: 1) ядра с ядерными пузырями, в которых обнаруживаются сигналы SISH и Red ISH, обычно имеют центральное положение в ядре; 2) ядра с ядерными пузырями сдвигают сигналы SISH и Red ISH к периферии. Часто анализ можно засчитать как действительный в обоих случаях, если сигналы SISH и Red ISH четко различимы, не искажены и их возможно подсчитать. Однако иногда значительное количество ядерных пузырей может исказить сигналы SISH и Red ISH, что делает их неразличимыми. Выполнить подсчет в таком случае невозможно. Подобная ситуация чаще всего возникает, когда сигналы SISH и Red ISH сдвигаются на периферию ядра. При этом различимые ядра часто можно обнаружить в другом участке образца и засчитать такой анализ как действительный. Анализ не может быть засчитан как действительный при значительном количестве ядерных пузырей, которые не позволяют обнаружить достаточное количество различимых сигналов SISH и Red ISH. Ядерные пузыри могут проявляться вследствие недостаточной фиксации (1–3 часа в формалине): ядра при этом выглядят менее дискретными. Этот артефакт можно устранить изменением условий кондиционирования клеток и экспозиции с протеазой, если фиксация длилась 3 часа, но при фиксации в 1 час вероятность его устранения минимальна.

Для анализа VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail предусмотрены дополнительные возможности предварительной обработки, способствующие оптимизации анализа в различных лабораториях и последующему устранению недостатков отдельных образцов тканей/гистологических препаратов с субоптимальным окрашиванием. Компания Ventana Medical Systems, Inc. («Ventana») рекомендует каждой лаборатории выполнять первичный тест на репрезентативных контрольных образцах, которые были подготовлены в тех же условиях, что и предназначенные для тестирования клинические образцы. Такая практика способствует оптимизации условий специфического окрашивания в конкретных лабораториях, процедуры подготовки образцов в которых могут несколько различаться. При условии отклонения от рекомендуемых факторов преданалитической подготовки возможно получение вариабельных результатов. Образцы, прошедшие преданалитическую подготовку в условиях, отличных от рекомендованных компанией Ventana, в ходе анализа могут окрашиваться неправильно.

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики in vitro (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. **ОСТОРОЖНО!** Федеральное законодательство США разрешает продажу этой продукции только медицинским работникам или по их заказу. (Rx Only)
4. **Внимание**: **продукт содержит формамид**. Формамид токсичен при вдыхании и умеренно токсичен при приеме внутрь. Он оказывает раздражающее действие на кожу, глаза, слизистые оболочки и абсорбируется кожей. Вещество может оказывать вредное воздействие на плод. Обращаться с осторожностью! При обращении с предполагаемыми канцерогенами или токсичными материалами используйте одноразовые перчатки и защитную одежду.
5. Перед началом сеанса убедитесь, что контейнер для отходов пуст. В противном случае контейнер для отходов может переполниться, что приведет к риску для пользователя поскользнуться и упасть. На аппаратах BenchMark XT и GX цикл не начинается без предшествующего опорожнения контейнера для отходов.
6. Материалы животного или человеческого происхождения должны рассматриваться как потенциально биологически опасные и утилизироваться с соблюдением надлежащих мер предосторожности.
7. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды. Избегайте вдыхания реагентов.
8. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, т.к. это может стать причиной неверных результатов.
9. Относительно рекомендованного способа утилизации препарата проконсультируйтесь с местными или государственными органами власти.
10. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Зонды VENTANA предназначены для использования с аппаратом BenchMark IHC/ISH и в сочетании с диагностическими наборами и принадлежностями VENTANA. Процедуры окрашивания для аппарата BenchMark IHC/ISH с помощью VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit перечислены в Таблица 1. Рекомендуемые протоколы окрашивания приведены в Таблица 2.

Параметры автоматизированных процедур можно выводить на дисплей, распечатывать и редактировать в соответствии с процедурой, приведенной в руководстве по эксплуатации прибора.

**Таблица** 1. Используйте следующие процедуры окрашивания для проведения VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail анализа на аппарате BenchMark IHC/ISH.

| Аппаратная платформа | Процедура окрашивания |
|---|---|
| BenchMark GX | GX VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT |
| BenchMark XT | XT VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT |
| BenchMark ULTRA | U VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT |

**Таблица** 2. Рекомендованные условия окрашивания для проведения анализа VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail на аппаратах BenchMark IHC/ISH.

| Условие окрашивания | Молочная железа | Желудок |
|---|---|---|
| **Прогрев** | Не выбрано | Не выбрано |
| Cell Conditioning 1 | 16 мин | 16 мин |
| Cell Conditioning 2 | 24 мин | 16 мин |
| ISH Protease 3 | 20 мин | 16 мин |
| **Температура жесткой промывки** | 76 °C для аппаратов BenchMark GX/XT | 76 °C для аппаратов BenchMark GX/XT |
| | 74 °C для аппарата BenchMark ULTRA | 74 °C для аппарата BenchMark ULTRA |



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

В связи с различиями в фиксации и обработке тканей, а также в лабораторном оборудовании и внешних условиях может потребоваться увеличение или уменьшение времени кондиционирования клеток или предварительной обработки протеазой в зависимости от конкретных образцов.

### Начало исследования на аппаратах BenchMark IHC/ISH

1. Считайте штрихкод, соответствующий выполняемому протоколу использования зонда.
2. Загрузите анализ VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, реагенты из VENTANA Red ISH DIG и VENTANA Silver ISH DNP Detection Kits и необходимые вспомогательные реагенты в лоток (лотки) для реагентов или в карусель. Поместите лоток (лотки) для реагентов или карусель в аппарат.
3. Проверьте заполненность флаконов с жидкостями и состояние контейнеров для отходов.
4. Флаконы с раствором реакционного буфера должны быть заполнены.
5. Контейнер для отходов должен быть пустым до начала работы.
6. Поместите предметные стекла в аппарат.
7. Начните цикл окрашивания.
8. По завершении процесса извлеките стекла из прибора. Окрашенные покровные стекла будут иметь остатки буфера или раствор для защиты от высыхания на своей поверхности. Продолжайте промывать и проводить дегидратацию (см. ниже).

### Процедура дегидратации

Примечание. Хромоген Fast Red растворим в этиловом спирте и ацетоне. Если окрашенные срезы подвергаются воздействию спирта или ацетона, это может привести к исчезновению специфического сигнала.

1. Для удаления раствора для предметных стекол промойте микропрепараты в 2 последовательных растворах мягкого средства для мытья посуды (не используйте средства, предназначенные для автоматических моек).
2. Хорошо ополосните стекла дистиллированной водой примерно в течение 1 минуты. Стряхните излишки воды.
3. Поместите микропрепараты в сушилку (45–60°C) или высушите их на воздухе при комнатной температуре. В печи время сушки варьируется от 10 минут до одного часа (сушка окрашенных предметных стекол в течение более длительного периода времени не влияет на результаты окрашивания). Убедитесь, что предметные стекла полностью высохли перед помещением их под покровное стекло, так как невысохшая вода на может помешать и вызвать образование пузырьков.
4. Приблизительно на 30 секунд поместите их в ванночку с ксилолом.
5. Поместите гистологическую среду на предметное стекло.
6. Поместите покровное стекло на предметное стекло. Обратите внимание, что некоторые гистологические среды для заливки не совместимы с анализом и не должны использоваться (см. разделы «Ограничения» и «Устранение проблем»).

## ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

### Положительный контрольный образец

Нормальные сигналы HER2 и хромосомы 17 (1–2 копии на клетку) служат для внутреннего положительного контроля, они обязательно должны быть видны в образце с использованием объективов 20x, 40x и (или) 60x. Однако не все клетки будут демонстрировать одну копию гена из-за биологической гетерогенности. Специфическое ядерное окрашивание может располагаться в различных клетках, включая стромальные фибробласты, эндотелиальные клетки, лимфоциты и неопухолевые эпителиальные клетки. Если положительные контроли не способны продемонстрировать положительное окрашивание, это может указывать на проблему с реагентом или аппаратом. Поскольку для каждого образца есть внутренний положительный контроль (т. е. соответствующее окрашивание ISH в здоровых клетках), это служит достоверным «положительным контролем».

При выполнении каждой процедуры окрашивания можно использовать положительный гистологический контроль, соответствующий требованиям лаборатории. Контрольные образцы могут быть образцами, приготовленными способом, идентичным для образцов, взятых от пациентов. Эти контроли могут обеспечить мониторинг всех этапов процедуры, от подготовки образцов до окрашивания. Использование образца, приготовленного способом, отличным от способа приготовления исследуемых образцов, обеспечит контроль за реагентами, аппаратом и процедурами, но не за фиксацией и обработкой образцов. Результаты исследуемых образцов следует анализировать в ходе того же опыта.

**Образцы ксенографтов**

Препараты ксенографтов можно использовать для предварительной валидации метода окраски препаратов с помощью анализа VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Они также рекомендуются в качестве вспомогательных средств для выявления неисправностей при использовании в исследованиях, содержащих клинические образцы. Дополнительную информацию см. в соответствующем листке-вкладыше по микропрепарату ксенотрансплантата.

**Необъяснимые расхождения**

В случае необъяснимых различий контрольных образцов необходимо немедленно обратиться к представителю местной службы поддержки. Если результаты контроля качества не соответствуют спецификациям, результаты для пациента являются неверными. См. раздел «Поиск и устранение проблем» в данном вкладыше. Выявите и устраните проблему, после чего повторите работу с образцами пациента.

**Верификация анализа**

Перед первым использованием зонда или системы для окрашивания в диагностической процедуре специфичность зонда должна быть верифицирована испытанием на серии образцов с установленными характеристиками эффективности гибридизации in situ (см. прилагаемый к зонду листок-вкладыш и рекомендации по контролю качества College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist [25], или CLSI Approved Guideline [26], или оба документа). Процедуры контроля качества следует повторять для каждой новой серии реагента и при каждом изменении параметров исследования.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Характер окрашивания VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail носит ядерный характер.

Патологоанатом, обладающий опытом в микроскопической интерпретации патологоанатомических образцов, проведении ISH-процедур и распознавании единичных и амплифицированных копий гена HER2 и хромосомы 17 (Chr17) (которые требуют микроскопического исследования с помощью объектива с увеличением 20x, 40x и (или) 60x), должен определить качество контролей перед интерпретацией результатов.

Примечание. Не рекомендуется использовать объектив с увеличением 100x. Все образцы тканей были исследованы в течение проверки и валидации с увеличением объектива 20x, 40x и (или) 60x.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail необходимо использовать вместе с Interpretation Guide VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail [P/N 1018386] для оценки предметного стекла.

В следующих разделах описывается, как проводить интерпретацию и оценку препаратов. Таблица 3 иллюстрирует, как вести подсчет дискретных сигналов.

**Определения**

1. Статус гена HER2. Статус гена HER2 — это функция отношения количества копий гена HER2 к количеству копий хромосомы 17 (Chr17) на одну клетку в образце инвазивной карциномы молочной железы или желудка. Статус гена HER2 классифицируется по следующим принципам.
   a. Отношение HER2/Chr17 ≥2,0 определяется как «с амплификацией».
   b. Отношение HER2/Chr17 <2,0 определяется как «без амплификации».
2. Пригодность микропрепаратов. Стекло при анализе VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail должно соответствовать трем критериям, которые будут считаться достаточными для проведения подсчета; если стекло не соответствует этим критериям, подсчет произвести нельзя, а результат будет считаться неудовлетворительным.
3. Внутренний положительный контроль. Нормальные сигналы HER2 или Chr17 (1–2 копии на клетку) служат для внутреннего положительного контроля; они обязательно должны быть видны в образце. Ядерное окрашивание может располагаться в различных неопухолевых клетках, включая: стромальные фибробласты, эндотелиальные клетки, лимфоциты и неопухолевые эпителиальные клетки.
4. Неопухолевые клетки. При использовании объектива с увеличением 20x, 40x и (или) 60x инвазивная часть опухоли должна демонстрировать поле с поддающимися подсчету сигналами SISH и Red ISH.



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

5. Фоновое окрашивание. Любое окрашивание фона, полученное с помощью систем детекции SISH или Red ISH, необходимо будет оценить, чтобы определить, не мешает ли оно подсчету специфических сигналов SISH или Red ISH. Фоновое окрашивание SISH обычно по внешнему виду напоминает «пыль» SISH, которая отличима от специфического сигнала. Красное окрашивание может выглядеть как красная дымка или редко встречающиеся неспецифические сигналы, которые выглядят слабее, чем специфические сигналы.
6. Рабочие области для подсчета сигналов. Приемлемая рабочая область в пределах инвазивной карциномы служит полем зрения для подсчета сигналов SISH и Red ISH. Подсчет сигналов не следует проводить в тех областях, где сигнал SISH или Red ISH ослаблен, ядра сплюснуты или растянуты или наблюдается некроз. Если одна рабочая область представляется непригодной для подсчета, часто на том же срезе можно найти другие рабочие области, вполне пригодные для этой цели. Об этом можно судить по присутствию здоровых клеток, демонстрирующих удовлетворительное окрашивание SISH и Red ISH в пределах или поблизости от рабочей области.

**Дополнительные наблюдения для** HER2 **и хромосомы** 17

Другие наблюдения могут быть отмечены как комментарии в заключении патоморфолога.

1. Неоднородность: в некоторых случаях ткань может содержать области карциномы, которые являются генетически неоднородными в отношении числа копий гена HER2 (*т. е.* здесь может располагаться смесь неамплифицированных и амплифицированных ядер или смесь ядер, содержащих различные копии HER2). Это различие можно наблюдать как между раковыми клетками в пределах одной рабочей (целевой) области, так и между различными рабочими областями.
2. Анеусомия — это любое состояние, при котором организм имеет дополнительные специфические хромосомы или же меньшее их число, чем обычно, *т. е.* число конкретной хромосомы (в данном случае хромосомы 17) не является диплоидным. При полисомии возможны три или более копий хромосомы вместо ожидаемых двух копий. При моносомии в опухолевых клетках может обнаруживаться только одна копия хромосомы 17. Об очевидной «амплификации», кластерах или полисомии хромосомы 17 (с SISH-кластерами HER2 или без них) не сообщалось [27]. В случаях с кластерами HER2 и хромосомы 17 следует соблюдать осторожность, чтобы не рассматривать их отношение как ~1,0. В таких случаях специалисту следует пользоваться методом иммуногистохимического исследования (IHC) для анализа гиперэкспрессии белка HER2, так как в большинстве случаев экспрессия белка стремится к значению 3+.
3. Моноаллельная делеция: делеция гена HER2 из хромосомы 17 в опухолевых клетках дает отношение HER2/Chr17 <1,0.

**Визуализация сигнала**

Сигналы SISH и Red ISH визуализируются как:

1. Единичная копия. Дискретная черная точка (SISH) считается одной копией HER2. Дискретные единичные точки, которые проявляются в ядрах при внутреннем контроле (неопухолевом), дают представление о размере отдельной копии гена в клетках инвазивных форм рака для SISH (черного) сигнала. Для сигналов Red ISH каждый дискретный сигнал считается как одна копия. Следует отметить, что красный ISH-сигнал от Chr17 может оказаться большего размера, чем сигналы SISH, а иногда быть удлиненным по форме. Может наблюдаться розовая размытость, которую не следует принимать за сигнал. Красные сигналы, очень светлые по цвету по сравнению с сигналом в ядрах внутреннего положительного контроля и в ядрах по всему рисунку окрашивания, не должны подсчитываться, поскольку они могут быть неспецифическими. Специфические красные сигналы имеют прерывистые края, как показано в Таблица 3.
2. Совокупности копий. Дискретные единичные SISH-сигналы, которые визуализируются в ядрах внутреннего положительного контроля, дают представление о размере единичной копии гена HER2 в клетках инвазивной карциномы. Размеры единичных сигналов SISH служат меркой для определения относительного числа амплифицированных копий в ядрах раковой клетки. Для сигналов Red ISH каждый дискретный сигнал считается как одна копия.
3. Кластеры. Наличие в ядрах совокупности перекрывающихся сигналов, подсчитать которые невозможно. Кластер определяется как многочисленные перекрывающиеся SISH-сигналы в ядрах, которые невозможно различить по отдельности. Кластеры HER2 могут быть оценены только специалистом. Например крупный кластер нескольких SISH-сигналов может быть оценен как 12 копий, в то время как мелкие кластеры могут быть оценены как 6 копий. Расчет выполняется с помощью единичных SISH-копий, присутствующих во внутреннем положительном контроле клеток в качестве образца. Наличие HER2-кластеров указано в оценочном листе.
4. Перекрывающиеся ядра и ядра, в которых присутствует только один цвет, а также образцы с неспецифическим окрашиванием, не должны подсчитываться. Визуализация всех ядер с наложенными сигналами Red ISH и SISH, которые не являются различимыми, должна производиться при большем увеличении, чтобы различить два сигнала, либо их не следует учитывать вовсе. Ядра, которые кажутся пузырьками, не должны учитываться.

**Подсчет сигналов** SISH **и** Red ISH **для определения статуса гена** HER2

Изучите окрашенные предметные стекла H&E, чтобы найти области, содержащие инвазивную карциному молочной железы или желудка. Изучите предметное стекло, окрашенное HER2 Dual ISH, соответствующее H&E, и определите область инвазивного рака молочной железы или желудка. Перед подсчетом сигналов HER2 и хромосомы 17 для определения статуса гена HER2 крайне важно, чтобы инвазивная рабочая область (пораженная ткань) была правильно окрашена и соответствовала критериям пригодности микропрепарата (критерии описаны в разделе «Определения» выше, пункт 2. «Пригодность микропрепаратов»).

Компания Ventana разработала алгоритм подсчета для данного анализа, который обеспечивает максимальную прецизионность и эффективность подсчета. Двадцать ядер, каждое из которых содержит красный (Red ISH) и черный (SISH) сигналы, должны быть подсчитаны.

**Критерии отбора клеток**

Учитывайте только ядра с диаметрами, которые являются репрезентативными для средней популяции ядер клеток инвазивной карциномы в рабочей области. Не учитывайте сигналы в ядрах, которые:

1. Намного больше в диаметре, чем средний размер ядер клеток карциномы.
2. Намного меньше в диаметре, чем средний размер ядер клеток карциномы.

Подсчитайте только ядра, представляющие популяцию ядер инвазивной карциномы с наибольшим средним числом сигналов (как SISH, так и Red ISH).

В тех целевых областях, где проявляется генетическая неоднородность по отношению к числу копий гена HER2, подсчитывают только ядра, представляющие популяцию ядер инвазивного рака с максимальным средним числом сигналов (как SISH, так и Red ISH). Обратите внимание на то, чтобы неоднородность была отмечена в оценочном листе.

**Таблица** 3. Визуализация сигнала

| | |
|---|---|
|  | Не считать, если наблюдается наложение ядер. |
|  | Не считать, если сигнал отсутствует. |
|  | Не считать, если присутствуют сигналы только одного цвета. |
|  | Не считать, если сигналы расположены вне ядер. |

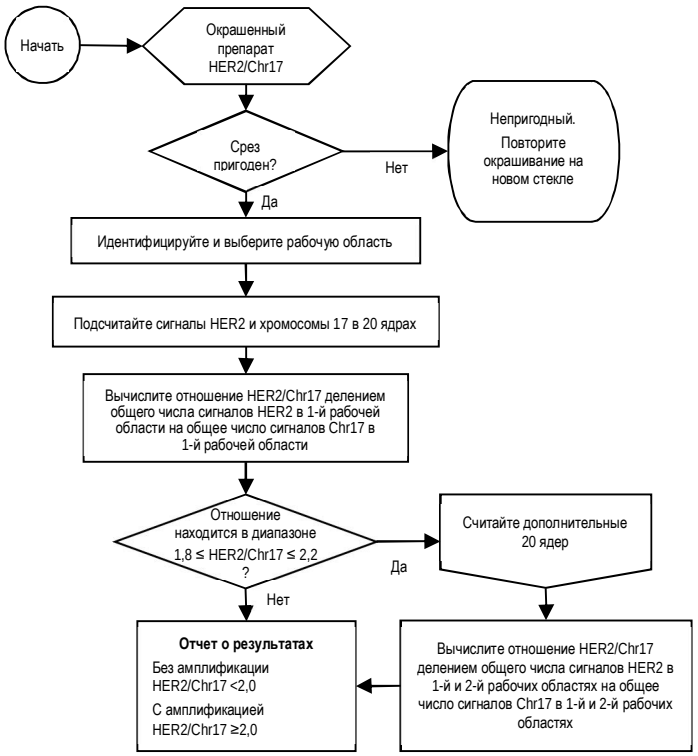


Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

| | |
|---|---|
|  | Считать как 1 черный (HER2) и 1 красный (Chr17) сигнал. |
|  | Считать как 2 черных (HER2) и 2 красных (Chr17) сигнала. |
|  | Считать как 1 черный (HER2) и 2 красных (Chr17) сигнала. Черный сигнал является «удвоенным». Считать два близко расположенных сигнала одного и того же цвета, только если расстояние между ними равно или больше диаметра единичного сигнала. |
|  | Небольшие кластеры SISH могут быть оценены только с использованием в качестве эталона размера одиночного сигнала. Используйте стромальные клетки для оценки размера сигнала (меньшая клетка). Например, этот кластер может быть оценен как 6 сигналов SISH. Добавив 2 оставшихся единичных сигнала, получаем в сумме 8. Считать как 2 красных сигнала. Отметьте на оценочном листе, что присутствуют кластеры для HER2. |
|  | Проведите оценку крупного кластера. В данном случае кластер может быть оценен как 12 черных сигналов. Добавляя 4 единичных сигнала, получаем в сумме 16. Считать красные сигналы как 2 копии хромосомы 17. Отметьте на оценочном листе, что присутствуют кластеры для HER2. |
|  | Красный сигнал, расположенный близко к черному сигналу, должен быть учтен как один красный сигнал и один черный сигнал. Чтобы различить эти сигналы, может потребоваться подсчет с использованием объектива с увеличением в 60 раз. Поэтому произведите подсчет таким образом: 4 черных (HER2) и 2 красных (Chr17) сигнала. Если наложенные сигналы нельзя различить, не учитывайте эти ядра. |
|  | Кластер черных точек затемняет красный (-е) сигнал (-ы). Большее увеличение (×60) может использоваться при попытке подтвердить наличие или отсутствие красного сигнала (-ов); в противном случае не учитывайте эти сигналы: всегда учитывайте ядра с только четкими красными сигналами. Отметьте наличие SISH-кластеров в оценочном листе. В ядрах с SISH-кластерами должны засчитываться ядра с видимыми и более многочисленными красными сигналами. |
|  | Если в ядрах возникает фоновая «пыль» SISH, учитывайте ее, только если специфические SISH-сигналы четко отличны от фона. |
|  | Может наблюдаться розовая размытость, которая не должна быть по ошибке принята за сигнал. Могут быть видны небольшие, слабые Red ISH сигналы, которые могут представлять неспецифическое связывание зонда Chr17 с другими хромосомами. На изображении показаны 2 дискретных красных (Chr17) сигнала и 2 черных (HER2) сигнала. |

**Статус гена** HER2: **алгоритм подсчета для теста** VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

Двадцать ядер (каждое содержащее красный (Chr17) и черный (HER2) сигналы) должны быть подсчитаны. Окончательные результаты по статусу HER2 фиксируются на основе отношения, полученного путем деления суммы сигналов HER2 для всех 20 ядер на сумму сигналов хромосомы 17 для всех 20 ядер. Статус амплификации определяется как «с амплификацией», если отношение HER2/Chr17 ≥2,0, и как «без амплификации», если отношение HER2/Chr17 <2,0. Если отношение HER2/Chr17 попадает в диапазон от 1,8 до 2,2, необходим подсчет дополнительных 20 ядер. Новое отношение затем должно быть выведено на основании всех 40 ядер, а статус амплификации фиксируется в соответствии с описанием, приведенным выше.




### Контроли

Нормальные клетки, расположенные внутри или рядом с целевой областью, служат в качестве внутреннего контроля окрашивания. Ядра нормальных клеток должны содержать в среднем 1–2 дискретные черные точки и 1–2 дискретные красные точки. Неспособность обнаружить единственную копию гена в нормальных клетках на любом препарате во время исследования указывает на то, что данный препарат не подходит для подсчета. Использование положительных контрольных образцов или препаратов ксенографтов поможет в устранении потенциальных проблем с аппаратом и (или) реагентом.

## ОГРАНИЧЕНИЯ

### Общие ограничения

1. ISH — это многоступенчатая методика, которая требует специализированного обучения по отбору подходящих реагентов, подготовке образцов, обработке, подготовке ISH-препаратов и интерпретации результатов.
2. На результаты окрашивания ткани влияет обращение с тканью и подготовка ее к окрашиванию. Неправильное проведение процесса фиксации, замораживания, оттаивания, промывки, сушки, нагрева, микротомирования или загрязнение другими тканями или жидкостями могут привести к артефактам, накоплению реагентов, ложноотрицательным или ложноположительным результатам. Несогласующиеся результаты могут быть получены вследствие несоблюдения режимов процессов фиксации и заливки или присущей исследуемой ткани неоднородности.



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

3. Избыточное или неполное контрастное окрашивание может негативно повлиять на правильность интерпретации результатов.
4. Клиническая интерпретация окрашивания должна проводиться с учетом истории болезни, морфологических данных и других гистопатологических критериев. Такая интерпретация должна проводиться квалифицированным специалистом-патологоанатомом, который обязан быть знаком с характеристиками используемого красителя и методикой, использованной для приготовления данного окрашенного среза. Окрашивание должно проводиться в сертифицированной и лицензированной лаборатории под наблюдением патоморфолога, который несет ответственность за просмотр окрашенных препаратов и за обеспечение адекватности контролей.
5. Компания Ventana поставляет реактивы в оптимальном разведении для проведения анализа при соблюдении инструкций. Любое отклонение от рекомендованных процедур проведения теста может привести к тому, что ожидаемые результаты будут недостоверны. Пользователи, которые отклоняются от рекомендованных процедур проведения теста, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.
6. Вследствие различий в обработке образцов может возникать необходимость в увеличении или уменьшении времени обработки протеазами ISH. Кроме того, увеличение или уменьшение времени кондиционирования клеток повлияет на результаты окрашивания. Пользователь должен валидировать такие изменения. Пользователи, допускающие отклонения от рекомендуемых методик проведения исследования, несут ответственность за интерпретацию результатов, полученных на образцах ткани пациента.
7. При использовании реагентов с тканями, которые ранее не тестировались, могут возникать непредвиденные реакции. В связи с биологической вариабельностью тканей полностью исключить возможность непредусмотренной реактивности нельзя даже для тех тканей, на которых данные реагенты уже тестировались. Документированные случаи неожиданных реакций следует доводить до сведения регионального представителя службы поддержки.

### Специфические ограничения

1. Применение не всех фиксирующих веществ совместимо с данным анализом. Компания Ventana рекомендует использовать 10-процентный NBF в течение 6–72 часов.
2. Анализ VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail был разработан для окрашивания участков ткани, толщина которых ~4 мкм [28]. В участках с толщиной срезов, превышающей 4 мкм, может наблюдаться потеря ткани.
3. Анализы могут регистрироваться не на каждом аппарате. Для получения дополнительной информации обратитесь к местному представителю компании Roche.
4. Некоторые марки заливочных сред могут вызвать окисление, потускнение и (или) исчезновение сигнала SISH. Совместимость гистологической среды для заливки см. в Таблица 24.
5. Для предотвращения сигнала Red ISH от распада окрашенные препараты не должны погружаться в ванночки со спиртом или ацетоном для дегидратации. Рекомендуется сушка на воздухе или сушка в печи. Окрашенные предметные стекла должны быть полностью сухими перед нанесением покровного стекла.
6. Как и в любом тесте, отрицательный результат означает, что специфическая цель не обнаружена. Это не равнозначно отсутствию специфической цели в анализируемых клетках или ткани.
7. Зонд был оптимизирован для использования с реагентами VENTANA на аппаратах BenchMark IHC/ISH. Пользователи, допускающие отклонения от рекомендуемых методик проведения исследования, несут ответственность за интерпретацию результатов, полученных на образцах ткани пациента.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определялись с помощью исследований чувствительности, специфичности и воспроизводимости. Во всех случаях, если не указано иное, окраска проводилась с помощью VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail по протоколу, указанному в Таблица 1, на аппаратах BenchMark IHC/ISH.

**Исследование сравнения методов**: **анализ** VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail **на аппарате** BenchMark ULTRA **по сравнению с** Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit

Чтобы оценить клиническую чувствительность и специфичность анализа VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail при определении статуса гена HER2 при инвазивном раке молочной железы, было проведено исследование сравнения методов в разных лабораториях с использованием устройства сравнения Abbott/Vysis PathVysion HER-2 FISH Kit. В исследовании анализа VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail приняли участие 3 центральных лаборатории. Шестьсот тридцать шесть случаев инвазивной карциномы молочной железы человека были предоставлены тремя клиническими лабораториями для потенциального включения в исследование на основе экспрессии белка HER2/neu, полученной ранее с помощью IHC. Спонсор исследования предоставил еще 133 случая. Центральные лаборатории, проводившие анализ VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и анализ PathVysion HER-2 FISH, были заслеплены в отношении статуса IHC и оригинального идентификатора случая, чтобы предотвратить смещение в оценке образцов. Одна центральная лаборатория выполнила окрашивание IHC всех образцов, используя анализ PATHWAY HER2/neu (4B5) для проведения дополнительных анализов. Результаты окрашивания FISH и анализа VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail были подсчитаны путем анализа по меньшей мере 20 ядер в каждом образце. Результаты были представлены следующим образом: отношение HER2/Chr 17 ≥2,0 с амплификацией; HER2/ Chr 17 <2,0 без амплификации. Из 678 случаев, которые были окрашены как по методу FISH, так и в анализах VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, результаты 605 образцов были подсчитаны при проведении обоих анализов и, следовательно, включены в анализ частоты совпадений.

**Первичные результаты**

При проведении первичного анализа сравнивался процент отрицательных и положительных совпадений, чтобы продемонстрировать эквивалентные результаты между анализами VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и PathVysion HER-2 FISH. Для каждого анализа данные по клиническим оценкам «с амплификацией» и «без амплификации», обобщенные из всех лабораторий, представлены ниже в таблице 2x2, включая процент отрицательных и положительных совпадений, где PathVysion HER-2 FISH — это контрольный анализ. Критерии приемлемости для демонстрации эквивалентного выполнения этих двух методов анализа при использовании аппарата BenchMark ULTRA требовали, чтобы нижние границы двустороннего 95-процентного доверительного интервала оценки составляли 85 % или выше при обобщении данных из всех трех лабораторий. Критерии приемлемости были соблюдены (Таблица 4). Кроме того, частота всех отрицательных и положительных совпадений лабораторий превышала 85 % (Таблица 5).

**Таблица** 4. Совпадения между VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit в когорте образцов карциномы молочной железы человека.

| | **Результат для** PathVysion HER-2 FISH | | |
|---|---|---|---|
| **Результат для** VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail | **С амплификацией** | **Без амплификации** | **Всего** |
| С амплификацией | 270 | 12 | 282 |
| Без амплификации | 32 | 291 | 323 |
| Всего | 302 | 303 | 605 |



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

| | n/N | % (CI подсчета 95 %) |
|---|---|---|
| Процент положительных совпадений | 270/302 | 89,4 (85,4, 92,4) |
| Процент отрицательных совпадений | 291/303 | 96,0 (93,2, 97,7) |

**Таблица** 5. Резюме отрицательной, положительной и общей частоты совпадений анализов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit для образцов карциномы молочной железы человека, представленных лабораторией.

| VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail **по сравнению с** PathVysion HER-2 FISH | **Процент положительных совпадений** | **Процент отрицательных совпадений** | **Общая доля одинаковых результатов** |
|---|---|---|---|
| Лаборатория A: n/N (%) (95 % CI) | 92/100 (92,0 %) (85,0, 95,9) | 92/93 (98,9 %) (94,2, 99,8) | 184/193 (95,3 %) (91,4, 97,5) |
| Лаборатория B: n/N (%) (95 % CI) | 93/103 (90,3 %) (83,0, 94,6) | 108/119 (90,8 %) (84,2, 94,8) | 201/222 (90,5 %) (86,0, 93,7) |
| Лаборатория C: n/N (%) (95 % CI) | 85/99 (85,9 %) (77,7, 91,4) | 91/91 (100,0 %) (95,9, 100,0) | 176/190 (92,6 %) (88,0, 95,6) |

Эти данные свидетельствуют о высокой частоте совпадений между анализом VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и PathVysion HER-2 FISH Kit в определении статуса гена HER2 в образцах рака молочной железы человека.

**Вторичные результаты**

Процент общих совпадений между VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и PathVysion HER-2 FISH Kit и двусторонним 95-процентным CI, обобщающим данные из всех клинических лабораторий, составил 92,7 % (90,4, 94,5).

**Вторичные результаты**: IHC **по сравнению с** ISH **для определения статуса гена** HER2

Исследование сравнения методов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и PathVysion FISH было разработано также для оценки случаев на основе IHC-анализа для подсчета уровней белка HER2. Это позволило провести вторичный анализ для сравнения обоих анализов ISH и IHC для определения частоты совпадений в отношении статуса гена HER2. Анализы сравнивали в соответствии с рекомендациями FDA, где случаи 2+/3+ считались положительными в отношении гиперэкспрессии HER2. В начале, при использовании руководства FDA для оценки, PathVysion HER-2 FISH использовался в качестве эталонного стандарта, демонстрирующего, что частота положительных совпадений и 95-процентный доверительный интервал для PATHWAY HER2/neu (4B5) по сравнению с FISH были 91,1 % (87,4, 93,8) (Таблица 6). Аналогично, когда использовался VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail в качестве эталонного стандарта, частота положительных совпадений для PATHWAY HER2/neu (4B5) по сравнению с VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail была 93,2 % (89,6, 95,7) (Таблица 7).

**Таблица** 6. Сравнение анализа IHC на аппарате BenchMark ULTRA с анализом FISH в соответствии с руководством FDA: обобщенные данные от всех лабораторий.

| | | **Результат для** PathVysion HER-2 FISH | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **С амплификацией** | **Без амплификации** | **Всего** |
| Результаты для PATHWAY HER2/neu (4B5) | Положительные (2+/3+ случая) | 277 | 63 | 340 |
| | Отрицательные (0/1+) | 27 | 238 | 265 |
| | Всего | 304 | 301 | 605 |

| | n/N | % (CI подсчета 95 %) |
|---|---|---|
| Процент положительных совпадений | 277/304 | 91,1 (87,4, 93,8) |

**Таблица** 7. Сравнение анализа IHC на аппарате BenchMark ULTRA с анализом VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail в соответствии с руководством FDA: обобщенные данные от всех лабораторий.

| | | **Результат для** VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **С амплификацией** | **Без амплификации** | **Всего** |
| Результаты для PATHWAY HER2/neu (4B5) | Положительные (2+/3+ случая) | 248 | 78 | 326 |
| | Отрицательные (0/1+) | 18 | 253 | 271 |
| | Всего | 266 | 331 | 597 |

| | n/N | % (CI подсчета 95 %) |
|---|---|---|
| Процент положительных совпадений | 248/266 | 93,2 (89,6, 95,7) |

**Исследование сравнения методов**: **анализ** VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail **на аппарате** BenchMark ULTRA **по сравнению с анализом** Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Kit

Чтобы оценить клиническую чувствительность и специфичность анализа VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail при определении статуса гена HER2 при карциноме желудка, было проведено исследование сравнения методов с использованием Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Kit для флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Сопоставимость результатов анализа образцов ткани желудка, желудка и пищеводно-желудочного перехода была определена путем сравнения результатов окрашивания двух анализов (Таблица 8). Сто тридцать четыре образца ткани желудка и 12 образцов ткани пищеводно-желудочного перехода (смесь случаев с амплификацией и без) были окрашены с использованием VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Эту же когорту случаев окрасили с применением анализа Dako HER2 IQFISH pharmDx™. Результаты, подробно описывающие частоту отрицательных, положительных и общих совпадений для 146 клинических образцов из этой когорты, которые были подсчитаны как с помощью анализа Dako HER2 IQFISH pharmDx™, так и с помощью анализа VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, показаны в Таблица 8 и Таблица 9.

**Таблица** 8. Совпадения между анализами VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и Dako HER2 IQFISH pharmDx™ в когорте образцов случаев карциномы желудка.

| **Статус амплификации для** VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail | **Анализ** Dako HER2 IQFISH pharmDx™ **Статус амплификации** | |
|---|---|---|
| | **С амп.** | **Без амп.** |
| С амп. | 49 | 8 |
| Без амп. | 5 | 84 |



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

**Таблица** 9. Резюме отрицательной, положительной и общей частоты совпадений анализов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и Dako HER2 IQFISH pharmDx™ для образцов карциномы желудка человека.

| | Частота отрицательных совпадений | | Частота положительных совпадений | | Показатель общих совпадений | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Необработанные данные / количество случаев | Процентов (CI подсчета 95 %) | Необработанные данные / количество случаев | Процентов (CI подсчета 95 %) | Необработанные данные / количество случаев | Процентов (CI подсчета 95 %) |
| VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail | 84/92 | 91,3 (83,8–95,5) | 49/54 | 90,7 (80,1–96,0) | 133/146 | 91,1 (85,4–94,7) |

**Повторяемость и прецизионность для аппарата** BenchMark IHC/ISH **при карциноме молочной железы**

Повторяемость и прецизионность анализа VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail была оценена на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX в сочетании с VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Повторяемость в пределах одного опыта была оценена с использованием 28 образцов карциномы молочной железы (BC). Два одинаковых предметных стекла из каждого образца ткани BC окрашивали с VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail на одном аппарате BenchMark ULTRA, XT или GX. Для анализа данных аппарата BenchMark XT и GX, вес пограничных отношений был определен с учетом их распространенности.

Также оценивали прецизионность между испытаниями в разные дни с использованием образцов ткани BC. Повторяющиеся предметные стекла от каждого из двадцати восьми образцов окрашивали с VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX в течение 5 непоследовательных дней. Для анализа данных аппарата BenchMark XT и GX вес пограничных отношений был определен с учетом их распространенности.

Повторяемость в пределах одного опыта определялась по среднему количеству положительных совпадений (APA), среднему количеству отрицательных совпадений (ANA) и общему проценту совпадений (OPA). Прецизионность между испытаниями в разные дни определяли по проценту положительных совпадений (PPA), проценту отрицательных совпадений (NPA), общему проценту совпадений (OPA) во всех наблюдениях в исследуемой популяции. Резюме полученных результатов обоих исследований приведено в Таблица 10.

**Таблица** 10. Повторяемость в пределах одного опыта и прецизионность между испытаниями в разные дни на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX.

| Платформа | Повторяемость/ прецизионность | Клинический статус | Совпадения | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Тип | n/N | % | 95 % CI |
| ULTRA | Повторяемость в пределах одного опыта | С амплификацией | APA | 146/146 | 100 | (97,4, 100) |
| | | Без амплификации | ANA | 188/188 | 100 | (98,0, 100) |
| | | Всего | OPA | 167/167 | 100 | (97,8, 100) |
| ULTRA | Прецизионность между несколькими опытами в разные дни | С амплификацией | PPA | 144/144 | 100 | (97,4, 100) |
| | | Без амплификации | NPA | 189/191 | 99,0 | (96,7, 100) |
| | | Всего | OPA | 333/335 | 99,4 | (98,2, 100) |
| XT | Повторяемость в пределах одного опыта | С амплификацией | APA | 128,8/128,8 | 100 | (97,1, 100) |
| | | Без амплификации | ANA | 151,2/151,2 | 100 | (97,5, 100) |
| | | Всего | OPA | 140,0/140,0 | 100 | (97,3, 100) |
| XT | Прецизионность между несколькими и опытами в разные дни | С амплификацией | PPA | 128,8/128,8 | 100 | (97,1, 100) |
| | | Без амплификации | NPA | 151,2/151,2 | 100 | (97,5, 100) |
| | | Всего | OPA | 280,0/280,0 | 100 | (98,6, 100) |
| GX | Повторяемость в пределах одного опыта | С амплификацией | APA | 128,8/128,8 | 100 | (97,1, 100) |
| | | Без амплификации | ANA | 151,2/151,2 | 100 | (97,5, 100) |
| | | Всего | OPA | 140,0/140,0 | 100 | (97,3, 100) |
| GX | Прецизионность между несколькими и опытами в разные дни | С амплификацией | PPA | 128,8/128,8 | 100 | (97,1, 100) |
| | | Без амплификации | NPA | 151,2/151,2 | 100 | (97,5, 100) |
| | | Всего | OPA | 280,0/280,0 | 100 | (98,6, 100) |

Примечание. 95 % CIs рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона.
В исследование были включены четыре случая с пограничным статусом.

**Прецизионность между несколькими аппаратами при карциноме молочной железы**

Прецизионность между несколькими аппаратами BenchMark IHC/ISH при анализе VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определили путем окрашивания повторяющихся предметных стекол 28 образцов BC на 3 аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX при анализе VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail с VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Прецизионность между несколькими аппаратами определяли с помощью PPA, NPA и OPA во всех наблюдениях в исследуемой популяции. Для случаев пограничного отношения был определен вес данных по их распространенности. Резюме полученных результатов данного исследования приведено в Таблица 11.

**Таблица** 11. Прецизионность между несколькими аппаратами BenchMark IHC/ISH

| Платформа | Прецизионность | Клинический статус | Совпадения | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Тип | n/N | % | 95 % CI |
| ULTRA | Прецизионность между несколькими аппаратами | С амплификацией | PPA | 72,0/72,0 | 100 | (94,9, 100) |
| | | Без амплификации | NPA | 94,0/96,0 | 97,9 | (95,8, 100) |
| | | Всего | OPA | 166,0/168,0 | 98,8 | (97,6, 100) |
| XT | Прецизионность между несколькими аппаратами | С амплификацией | PPA | 77,3/77,3 | 100 | (95,3, 100,0) |
| | | Без амплификации | NPA | 90,7/90,7 | 100 | (95,9, 100,0) |
| | | Всего | OPA | 168,0/168,0 | 100 | (97,8, 100,0) |
| GX | Прецизионность между | С амплификацией | PPA | 76,2/76,2 | 100 | (95,2, 100) |



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

| Плат-форма | Преци-зионность | Клини-ческий статус | Совпадения | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Тип | n/N | % | 95 % CI |
| | несколькими аппаратами | Без амплифи-кации | NPA | 90,7/90,7 | 100 | (95,9, 100) |
| | | Всего | OPA | 166,9/ 166,9 | 100 | (97,8, 100) |

Примечание. 95 % CIs рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона. В исследование были включены четыре случая с пограничным статусом.

**Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями при карциноме молочной железы**

Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями на аппарате BenchMark IHC/ISH при анализе VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определили путем оценки 3 исследователями 28 образцов ткани BC, окрашенных VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, с использованием VENTANA Silver ISH DNP Detection Ki и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit на аппарате BenchMark ULTRA. Для определения прецизионности в пределах одного исследователя один и тот же набор предметных стекол оценивался исследователем дважды после минимум двух недель перерыва между оценками. Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями определяли с помощью APA, ANA и OPA во всех наблюдениях в исследуемой популяции. Резюме полученных результатов данного исследования приведено в Таблица 12.

**Таблица** 12. Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями на аппарате BenchMark ULTRA

| Прецизионность | Клини-ческий статус | Совпадения | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95 % CI |
| Между исследователями | С амплифи-кацией | APA | 146/158 | 92,4 | (90,2, 94,7) |
| | Без амплифи-кации | ANA | 166/178 | 93,3 | (90,7, 95,7) |
| | Всего | OPA | 156/168 | 92,9 | (90,5, 95,2) |
| В пределах одного исследователя | С амплифи-кацией | APA | 76/78 | 97,4 | (95,0, 100,0) |
| | Без амплифи-кации | ANA | 88/90 | 97,8 | (95,5, 100,0) |
| | Всего | OPA | 82/84 | 97,6 | (95,2, 100,0) |

Примечание. 95 % CIs рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона.

**Межплатформенная прецизионность при карциноме молочной железы**

Межплатформенную прецизионность на аппарате BenchMark IHC/ISH при анализе VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определили путем оценки 28 образцов ткани BC, окрашенных с помощью VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail с использованием VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA RED ISH DIG Detection Kit на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX. Межплатформенную прецизионность определяли с помощью PPA, NPA и OPA во всех наблюдениях в исследуемой популяции. Для случаев пограничного отношения был определен вес данных по их распространенности. Резюме полученных результатов данного исследования приведено в Таблица 13.

**Таблица** 13. Межплатформенная прецизионность аппарата BenchMark IHC/ISH

| Прецизионность | Клини-ческий статус | Совпадения | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95 % CI |
| Межплат-форменная прецизионность | С амплифи-кацией | PPA | 230,8/ 230,8 | 100 | (98,4, 100) |
| | Без амплифи-кации | NPA | 271,0/ 272,2 | 99,6 | (98,3, 100) |
| | Всего | OPA | 501,8/ 502,9 | 99,8 | (99,2, 100) |

Примечание. 95 % CIs рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона. В исследование были включены четыре случая с пограничным статусом.

**Повторяемость и прецизионность для аппарата** BenchMark IHC/ISH **при карциноме желудка**

Повторяемость и прецизионность анализа VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail была оценена на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX в сочетании с VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Повторяемость в пределах одного опыта была оценена с использованием 14 образцов карциномы желудка (GC). Два одинаковых предметных стекла из каждого образца ткани GC окрашивали с VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail на одном аппарате BenchMark ULTRA, XT или GX. Для случаев пограничного отношения был определен вес данных по их распространенности.

Также оценивали прецизионность между испытаниями в разные дни с использованием образцов ткани GC. Повторяющиеся предметные стекла от каждого из 14 образцов окрашивали с VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX в течение 5 непоследовательных дней. Для случаев пограничного отношения был определен вес данных по их распространенности.

Повторяемость в пределах одного опыта определялась по среднему количеству положительных совпадений (APA), среднему количеству отрицательных совпадений (ANA) и общему проценту совпадений (OPA). Прецизионность между испытаниями в разные дни определяли по проценту положительных совпадений (PPA), проценту отрицательных совпадений (NPA), общему проценту совпадений (OPA) во всех наблюдениях в исследуемой популяции. Резюме полученных результатов обоих исследований приведено в Таблица 14.

**Таблица** 14. Повторяемость в пределах одного опыта и прецизионность между испытаниями в разные дни на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX.

| Платформа | Повторя-емость/ преци-зионность | Клини-ческий статус | Совпадения | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Тип | n/N | % | 95 % CI |
| ULTRA | Повторяе-мость в пределах одного опыта | С амплифи-кацией | APA | 70,0/70,0 | 100 | (94,8, 100) |
| | | Без амплифи-кации | ANA | 70,0/70,0 | 100 | (94,8, 100) |
| | | Всего | OPA | 70,0/70,0 | 100 | (94,8, 100) |
| ULTRA | Преци-зионность между несколькими опытами в разные дни | С амплифи-кацией | PPA | 70,0/70,0 | 100 | (94,8, 100) |
| | | Без амплифи-кации | NPA | 70,0/70,0 | 100 | (94,8, 100) |
| | | Всего | OPA | 140,0/ 140,0 | 100 | (97,3, 100) |
| XT | Повторяе-мость в пределах одного опыта | С амплифи-кацией | APA | 70,0/70,0 | 100 | (94,8, 100) |
| | | Без амплифи-кации | ANA | 70,0/70,0 | 100 | (94,8, 100) |
| | | Всего | OPA | 70,0/70,0 | 100 | (94,8, 100) |



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

| Платформа | Повторяемость/ прецизионность | Клинический статус | Совпадения | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Тип | n/N | % | 95 % CI |
| XT | Прецизионность между несколькими и опытами в разные дни | С амплификацией | PPA | 70,0/70,0 | 100 | (94,8, 100) |
| | | Без амплификации | NPA | 70,0/70,0 | 100 | (94,8, 100) |
| | | Всего | OPA | 140,0/ 140,0 | 100 | (97,3, 100) |
| GX | Повторяемость в пределах одного опыта | С амплификацией | APA | 64,6/65,1 | 99,1 | (95,9, 100) |
| | | Без амплификации | ANA | 70,0/70,6 | 99,2 | (95,2, 100) |
| | | Всего | OPA | 67,3/67,9 | 99,2 | (96,9, 100) |
| GX | Прецизионность между несколькими и опытами в разные дни | С амплификацией | PPA | 67,3/67,9 | 99,2 | (96,5, 100) |
| | | Без амплификации | NPA | 70,0/70,0 | 100 | (94,8, 100) |
| | | Всего | OPA | 137,3/ 137,9 | 99,6 | (98,5, 100) |

Примечание. 95 % CIs рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона. В исследование были включены два случая с пограничным статусом.

**Прецизионность между несколькими аппаратами при карциноме желудка**

Прецизионность между несколькими аппаратами BenchMark IHC/ISH при анализе VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определили путем окрашивания повторяющихся предметных стекол 14 образцов GC на 3 аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX при анализе VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail с VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Прецизионность между несколькими аппаратами определяли с помощью PPA, NPA и OPA во всех наблюдениях в исследуемой популяции. Для случаев пограничного отношения был определен вес данных по их распространенности. Резюме полученных результатов данного исследования приведено в Таблица 15.

**Таблица** 15. Прецизионность между несколькими аппаратами BenchMark IHC/ISH

| Платформа | Прецизионность | Клинический статус | Совпадения | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Тип | n/N | % | 95 % CI |
| ULTRA | Прецизионность между несколькими аппаратами | С амплификацией | PPA | 42,0/42,0 | 100 | (91,6, 100) |
| | | Без амплификации | NPA | 42,0/42,0 | 100 | (91,6, 100) |
| | | Всего | OPA | 84,0/84,0 | 100 | (95,6, 100) |
| XT | Прецизионность между несколькими аппаратами | С амплификацией | PPA | 40,4/40,9 | 98,6 | (94,1, 100) |
| | | Без амплификации | NPA | 40,9/40,9 | 100 | (91,4, 100) |
| | | Всего | OPA | 81,3/81,9 | 99,3 | (97,5, 100) |
| GX | Прецизионность между несколькими аппаратами | С амплификацией | PPA | 40,9/40,9 | 100 | (91,4, 100) |
| | | Без амплификации | NPA | 42,0/42,0 | 100 | (91,6, 100) |
| | | Всего | OPA | 82,9/82,9 | 100 | (95,6, 100) |

Примечание. 95 % CIs рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона. В исследование были включены два случая с пограничным статусом.

**Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями при карциноме желудка**

Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями на аппарате BenchMark IHC/ISH при анализе VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определили путем оценки 3 исследователями 28 образцов ткани GC, окрашенных VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, с использованием VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA RED ISH DIG Detection Kit на аппарате BenchMark ULTRA. Все предметные стекла были рандомизированы и заслеплены в отношении диагноза. Для определения прецизионности в пределах одного исследователя один и тот же набор предметных стекол оценивался исследователем дважды после минимум двух недель перерыва между оценками. Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями определяли с помощью APA, ANA и OPA во всех наблюдениях в исследуемой популяции. Резюме полученных результатов данного исследования приведено в Таблица 16.

**Таблица** 16. Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями на аппарате BenchMark ULTRA

| Прецизионность | Клинический статус | Совпадения | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95 % CI |
| Между исследователями | С амплификацией | APA | 80/84 | 95,2 | (90,5, 100,0) |
| | Без амплификации | ANA | 80/84 | 95,2 | (90,5, 100,0) |
| | Всего | OPA | 80/84 | 95,2 | (90,5, 100,0) |
| В пределах одного исследователя | С амплификацией | APA | 82/84 | 97,6 | (95,2, 100,0) |
| | Без амплификации | ANA | 82/84 | 97,6 | (95,2, 100,0) |
| | Всего | OPA | 82/84 | 97,6 | (95,2, 100,0) |

Примечание. 95 % CIs рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона.

**Межплатформенная прецизионность при карциноме желудка**

Межплатформенную прецизионность на аппарате BenchMark IHC/ISH при анализе VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определили путем оценки 14 образцов ткани GC, окрашенных с помощью VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail с использованием VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX. Межплатформенную прецизионность определяли с помощью PPA, NPA и OPA во всех наблюдениях в исследуемой популяции. Для случаев пограничного отношения был определен вес данных по их распространенности. Резюме полученных результатов данного исследования приведено в Таблица 17.

**Таблица** 17. Межплатформенная прецизионность аппарата BenchMark IHC/ISH

| Прецизионность | Клинический статус | Совпадения | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95 % CI |
| Межплатформенная прецизионность | С амплификацией | PPA | 123,3/ 123,9 | 99,5 | (98,1, 100) |
| | Без амплификации | NPA | 124,9/ 124,9 | 100 | (97,0, 100) |
| | Всего | OPA | 248,2/ 248,8 | 99,8 | (99,2, 100) |

Примечание. 95 % CIs рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона. В исследование были включены два случая с пограничным статусом.



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

**Прецизионность от серии к серии при карциноме молочной железы**

Прецизионность от серии к серии была определена путем исследования 3 производственных серий VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit на аппаратах BenchMark ULTRA. Двадцать восемь образцов ткани BC были окрашены с использованием каждого зонда и набора для обнаружения. Резюме результатов прецизионности от серии к серии анализа представлены в Таблица 18.

**Таблица** 18. Прецизионность от серии к серии

| Преци-зионность | Клинический статус | Совпадения | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95 % CI |
| Воспрои-зводимость между партиями. | С амплификацией | PPA | 121/121 | 100 | 96,9; 100 |
| | Без амплификации | NPA | 123/123 | 100 | 97,0; 100 |
| | Всего | OPA | 244/244 | 100 | 98,5; 100 |

Примечание. 95 % CIs рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона. В исследование были включены четыре случая с пограничным статусом.

**Исследование межлабораторной повторяемости при карциноме молочной железы и карциноме желудка на аппарате** BenchMark ULTRA

Исследование межлабораторной повторяемости было проведено для оценки повторяемости анализа VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail для определения статуса гена HER2 в ткани карциномы молочной железы и карциномы желудка, окрашенных на аппарате BenchMark ULTRA в сочетании с VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Использовали 28 образцов FFPE ткани карциномы молочной железы и желудка, приблизительно в половине случаев была амплификация экспрессии гена HER2, а оставшаяся половина была без амплификации гена HER2.

Было сделано несколько срезов каждого образца, их направили в 3 внешних исследовательских центра. В каждом исследовательском центре образцы 28 случаев рака молочной железы и 28 случаев рака желудка окрашивали в 5 непоследовательных дней с промежутком между ними не менее 20 дней. После окрашивания на аппарате BenchMark ULTRA исследователь проводил оценку препаратов для определения статуса гена HER2.

Резюме результатов данного исследования см. в Таблица 19 и Таблица 20 далее. Данные оценивали по проценту положительных совпадений (PPA) и проценту отрицательных совпадений (NPA) во всех наблюдениях. Для каждого случая сравнивали подлежащие оценке наблюдения (усиленные с неусиленными) с модальным результатом этого случая. Для случаев пограничного отношения был определен вес данных по их распространенности. Результаты этих сравнений объединялись по исследовательским центрам и дням, затем была сделана сводка результатов между случаями.

**Таблица** 19. Межлабораторная повторяемость: частота совпадений на аппарате BenchMark ULTRA при карциноме молочной железы

| Межлабораторная воспроизводимость | Совпадения | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Тип | n/N | % | 95 % CI |
| Между лабораториями (3 лаборатории) | PPA | 208,9/208,9 | 100 | (98,2, 100,0) |
| | NPA | 198,1/200,3 | 98,9 | (96,8, 100,0) |
| | OPA | 407,0/409,3 | 99,5 | (98,4, 100,0) |

| Межлабораторная воспроизводимость | | Совпадения | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95 % CI |
| Межсуточная (5 непоследо-вательных дней) | Лаборатория A | PPA | 72/74 | 97,3 | (92,3, 100,0) |
| | | NPA | 63/63 | 100 | (94,3, 100,0) |
| | | OPA | 135/137 | 98,5 | (95,6, 100,0) |
| | Лаборатория B | PPA | 70/70 | 100 | (94,8, 100,0) |
| | | NPA | 63/64 | 98,4 | (95,8, 100,0) |
| | | OPA | 133/134 | 99,3 | (97,8, 100,0) |
| | Лаборатория C | PPA | 70/70 | 100 | (94,8, 100,0) |
| | | NPA | 69/69 | 100 | (94,7, 100,0) |
| | | OPA | 139/139 | 100 | (97,3, 100,0) |

**Таблица** 20. Межлабораторная повторяемость: частота совпадений на аппарате BenchMark ULTRA при карциноме желудка

| Межлабораторная воспроизводимость | | Совпадения | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Тип | n/N | % | 95 % CI |
| Между лабораториями (3 лаборатории) | | PPA | 206,8/206,8 | 100 | (98,2, 100,0) |
| | | NPA | 208,4/208,9 | 99,7 | (99,2, 100,0) |
| | | OPA | 415,1/415,7 | 99,9 | (99,6, 100,0) |
| Межсуточная (5 непоследо-вательных дней) | Лаборатория A | PPA | 70/70 | 100 | (94,8, 100,0) |
| | | NPA | 69/70 | 98,6 | (96,0, 100,0) |
| | | OPA | 139/140 | 99,3 | (97,9, 100,0) |
| | Лаборатория B | PPA | 67/67 | 100 | (94,6, 100,0) |
| | | NPA | 69/69 | 100 | (94,7, 100,0) |
| | | OPA | 136/136 | 100 | (97,3, 100,0) |
| | Лаборатория C | PPA | 70/70 | 100 | (94,8, 100,0) |
| | | NPA | 70/70 | 100 | (94,8, 100,0) |
| | | OPA | 140/140 | 100 | (97,3, 100,0) |

**Аналитическая чувствительность/специфичность**

Аналитическая чувствительность (эффективность гибридизации) при анализе VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail была определена путем окрашивания нормальных метафазных пластинок человека на аппарате BenchMark XT. Из 125 проанализированных метафазных пластинок 100 % выявили специфическую колокализацию как зонда HER2, так и зонда хромосомы 17.

Аналитическая чувствительность измеряет способность зонда обнаруживать конкретную цель, в то время как специфичность заключается в его способности отличать цель от других последовательностей в образце. Анализ обладает аналитической чувствительностью и контролем специфичности, встроенным в каждую ткань человека. Нормальные клетки человека (включая стромальные фибробласты, эндотелиальные клетки, лимфоциты и неопухолевые эпителиальные клетки молочной железы) должны содержать 1–2 копии HER2 и Chr17. Таким образом, 1–2 копии HER2 и Chr17 в нормальных человеческих клетках указывают на то, что зонды обнаруживают свою специфическую цель (мера чувствительности). От одной до двух копий HER2 и Chr17 в обычных клетках также указывает на то, что зонд обнаруживает только свои специфические цели (мера специфичности). Уровень первого прохода для анализа VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail в 40 образцах тканей молочной железы, зафиксированных в рекомендациях ASCO



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

CAP (10-процентный NBF в течение 6–72 часов), составил 100 % (91,2–100) на аппаратах BenchMark ULTRA, 100 % (91,2–100) на аппаратах BenchMark XT и 97,5 % (87,1–99,6) на аппаратах BenchMark GX. Специфичность этих же 40 образцов ткани молочной железы без контроля зонда составила 100 % (91,2–100) на аппаратах BenchMark ULTRA.

Уровень первого прохода для анализа VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail в 39 образцах тканей желудка, зафиксированных в рекомендациях ASCO CAP (10-процентный NBF в течение 6–72 часов), составил 97,4 % (86,8–99,5) на аппаратах BenchMark ULTRA, 97,4 % (86,8–99,5) на аппаратах BenchMark XT и 100 % (91–100) на аппаратах BenchMark GX.

Аналитическая чувствительность и специфичность была также оценена путем окрашивания множества случаев нормальной и опухолевой ткани человека с анализом VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Результаты приведены в Таблица 21 и Таблица 22. Неожиданное окрашивание не наблюдали при анализе VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail при окрашивании нормальных и опухолевых тканей. * Количество случаев инвазивной карциномы молочной железы и аденокарциномы желудка, включенных в исследование, описано выше.

**Таблица** 21. Аналитическую чувствительность/специфичность анализа VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определяли путем окрашивания зафиксированных формалином и залитых в парафин здоровых тканей.

| Ткань | Кол-во приемлемых случаев/ общее кол-во случаев | Ткань | Кол-во приемлемых случаев/ общее кол-во случаев |
|---|---|---|---|
| Надпочечник | 3/3 | Легкое | 3/3 |
| Мочевой пузырь | 3/3 | Лимфоузел | 3/3 |
| Костный мозг | 3/3 | Мезотелий | 3/3 |
| Яичник | 3/3 | Поджелудочная железа | 3/3 |
| Молочная железа | 3/3 | Паращитовидная железа | 3/3 |
| Мозжечок | 3/3 | Периферический нерв | 3/3 |
| Головной мозг | 3/3 | Простата | 3/3 |
| Шейка матки | 3/3 | Скелетная мускулатура | 3/3 |
| Толстая кишка | 3/3 | Кожа | 3/3 |
| Эндометрий | 3/3 | Селезенка | 3/3 |
| Пищевод | 3/3 | Желудок | 3/3 |
| Сердце | 3/3 | Яичко | 3/3 |
| Гипофиз (питуитарная железа) | 3/3 | Тимус | 3/3 |
| Стенка кишечника | 3/3 | Щитовидная железа | 3/3 |
| Почка | 3/3 | Язык/слюнная железа | 3/3 |
| Печень | 3/3 | Миндалины | 3/3 |

**Таблица** 22. Аналитическую чувствительность/специфичность анализа VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определяли путем окрашивания зафиксированных формалином и залитых в парафин различных опухолевых тканей.

| Патология | Кол-во приемлемых случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Глиобластома (головной мозг) | 3/3 |
| Менингиома (головной мозг) | 1/1 |
| Олигодендроглиома (головной мозг) | 1/1 |
| Эндометриоидная карцинома (яичники) | 1/1 |
| Аденокарцинома (яичники) | 1/1 |
| Нейроэндокринное новообразование поджелудочной железы (поджелудочная железа) | 1/1 |
| Аденокарцинома (поджелудочная железа) | 1/1 |
| Семинома (яички) | 1/1 |
| Эмбриональная карцинома (яички) | 1/1 |
| Медуллярная карцинома (щитовидная железа) | 1/1 |
| Папиллярная карцинома (щитовидная железа) | 1/1 |
| Протоковая карцинома (молочная железа) in situ | 1/1 |
| Мелкоклеточная карцинома (легкое) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (легкое) | 1/1 |
| Аденокарцинома (пищевод) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (пищевод) | 1/1 |
| Аденокарцинома (желудок) | 1/1 |
| Аденокарцинома (пищеводно-желудочный переход) | 1/1 |
| Аденокарцинома (тонкая кишка) | 1/1 |
| Стромальная опухоль ЖКТ (тонкая кишка) | 1/1 |
| Желудочно-кишечная стромальная опухоль (ЖКСО) (толстая кишка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (толстая кишка) | 1/1 |
| Аденокарцинома (прямая кишка) | 1/1 |
| Желудочно-кишечная стромальная опухоль (ЖКСО) (прямая кишка) | 1/1 |
| Гепатобластома (печень) | 1/1 |
| Гепатоцеллюлярная карцинома (печень) | 1/1 |
| Светлоклеточная карцинома (почки) | 1/1 |
| Аденокарцинома (простата) | 2/2 |
| Лейомиома (матка) | 1/1 |
| Эндометриоидная аденокарцинома (матка) | 1/1 |
| Светлоклеточная карцинома (матка) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (шейка матки) | 2/2 |
| Эмбриональная рабдомиосаркома (поперечно-полосатая мускулатура) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (кожа) | 1/1 |
| Базальноклеточная карцинома (кожа) | 1/1 |
| Нейрофиброма (поясница) | 1/1 |
| Нейробластома (забрюшинное пространство) | 1/1 |
| Мезотелиома (брюшина) | 1/1 |
| В-клеточная лимфома; неуточненная (лимфатический узел) | 2/2 |
| Лимфома Ходжкина (Hodgkin) (лимфатический узел) | 3/3 |



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

| Патология | Кол-во приемлемых случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Анапластическая крупноклеточная лимфома (лимфатический узел) | 1/1 |
| Лейомиосаркома (мочевой пузырь) | 1/1 |
| Уротелиальная карцинома (мочевой пузырь) | 1/1 |
| Остеосаркома | 1/1 |
| Мезотелиома (брюшина) | 1/1 |
| Лейомиосаркома (гладкая мускулатура) | 1/1 |

## ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

**Таблица** 23. Поиск и устранение неисправностей.

| Проблема | Способ устранения |
|---|---|
| Отсутствие или слабый SISH сигнал | 1. Убедитесь, что дозаторы реагентов функционируют должным образом (т. е. не засорены или не опорожнены) и заполнены нерасфасованными растворами. Проверьте заливочную камеру дозатора реагентов или мениск на наличие посторонних материалов или твердых частиц, таких как волокна или осадок. Если подача жидкости дозатором не осуществляется, не используйте дозатор и обратитесь к региональному представителю службы поддержки. Также можно повторно заправить дозатор. Его следует направить в контейнер для отходов, снять колпачок наконечника и нажать на верхнюю часть дозатора. Если окрашивание все еще слабое или отсутствует, перейдите к пункту 2 ниже.<br>2. Убедитесь, что тип фиксации, время и толщина среза подходят для анализов на основе ISH.<br>3. Убедитесь, что для сохранения сигнала SISH используются SISH-совместимые гистологические среды (см. Таблица 24). Если окрашивание все еще слабое или отсутствует, перейдите к пункту 4 ниже.<br>4. Увеличьте время CC1 до > 16 мин.<br>5. Увеличьте время CC2 до > 16 мин для тканей карциномы желудка или до > 24 мин для тканей карциномы молочной железы.<br>6. Увеличьте время ISH Protease 3 до > 16 мин для тканей карциномы желудка или > 20 мин для тканей карциномы молочной железы, в случае если морфология ядра не нарушена. |
| Отсутствие или слабый красный сигнал | 1. Убедитесь, что дозаторы реагентов функционируют должным образом (т. е. не засорены или не опорожнены) и заполнены нерасфасованными растворами. Если окрашивание все еще слабое или отсутствует, перейдите к пункту 2 ниже.<br>2. Убедитесь, что спиртовые ванны и расширенные ксилоловые промывки не используются для обезвоживания окрашенных предметных стекол, так как это ухудшит качество красных сигналов ISH. Если окрашивание все еще слабое или отсутствует, перейдите к пункту 3 ниже.<br>3. Убедитесь, что тип фиксации, время и толщина среза подходят для анализов на основе ISH.<br>4. Увеличьте время CC1 до > 16 мин.<br>5. Увеличьте время CC2 до > 16 мин для тканей карциномы желудка или до > 24 мин для тканей карциномы молочной железы.<br>6. Увеличьте время ISH Protease 3 до > 16 мин для тканей карциномы желудка или > 20 мин для тканей карциномы молочной железы, в случае если морфология ядра не нарушена. |
| Неспецифическое красное ISH фоновое окрашивание | 1. Убедитесь, что используются положительно заряженные предметные стекла, образец зафиксирован и разделен соответствующим образом для анализов на основе ISH.<br>2. Если красное ISH фоновое окрашивание различимо для специфического красного ISH-сигнала, произведите подсчет, но не считайте неспецифические красные ISH-сигналы.<br>3. Если красное ISH фоновое окрашивание в ядре мешает подсчету, повторите окрашивание, используя температуру жесткой промывки 76 °C или 78 °C. Уменьшение времени кондиционирования клеток и экспозиции с протеазой также смягчает красный фон. |
| Неспецифическое фоновое окрашивание SISH | 1. Убедитесь, что используются положительно заряженные предметные стекла, образец зафиксирован и разделен соответствующим образом для анализов на основе ISH.<br>2. Если фоновое окрашивание SISH различимо для специфического SISH сигнала, произведите подсчет, но не считайте неспецифические SISH сигналы.<br>3. Если фоновое окрашивание SISH в ядре мешает подсчету, повторите окрашивание с уменьшением времени кондиционирования клеток или экспозиции с протеазой. |
| Осадок | 1. Если артефакт в виде осадка мешает подсчету, то повторите окрашивание. Если фоновое окрашивание SISH различимо для специфического SISH сигнала, произведите подсчет, но не считайте неспецифические SISH сигналы.<br>2. Убедитесь, что штрихкод на препарате расположен по центру и нанесен на предметное стекло без нависания. Не дублируйте и не наносите повторно штрихкоды. |
| Пузырьки | Если образование пузырьков мешает подсчету, убедитесь, что предварительные аналитические процедуры и толщина образца соответствуют рекомендациям. |
| Ткани смываются с предметных стекол | Убедитесь, что используются положительно заряженные предметные стекла. |



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

**Таблица** 24. Совместимость гистологической среды для заливки с анализами на основе SISH.

| Гистологическая среда для заливки | Производитель | Тип (ксилол, спирт, водная) | Совмести-мость с SISH |
|---|---|---|---|
| Entellan | Merck | Ксилол | Нет |
| Entellan New | Merck | Ксилол | Нет |
| Eukitt | EMS | Ксилол | Нет |
| HSR | Sysmex | Ксилол | Нет |
| Malinol | Muto Chemical | Ксилол | Нет |
| Acrytol | SurgiPath | Ксилол | Да |
| Alcolmount | Diapath | Спирт | Да |
| BioMount 2 | BBInternational | Ксилол | Да |
| Cytoseal 60 | Richard Allan Scientific | Ксилол | Да |
| Diamount | Diapath | Ксилол | Да |
| DPX | BDH: Raymond Lamb | Ксилол | Да |
| FloTexx | Lerner Labs | Ксилол | Да |
| Gel Mount | Biomeda | Водная | Да |
| Histomount | Raymond Lamb | Ксилол | Да |
| MicroMount | SurgiPath | Ксилол | Да |
| MM24 | SurgiPath | Ксилол | Да |
| Mountex | Histolab | Ксилол | Да |
| MountQuick | Daido Sangyo Co. | Водная | Да |
| Paramount | Protaqs Quartett: Dako | Ксилол | Да |
| Permount | Fisher | Ксилол | Да |
| Pertex | Cell Path | Ксилол | Да |
| Shandon Consul mount | Thermo Scientific | Ксилол | Да |
| Softmount | WAKO | Лемазол А (Lemasol A) | Да |
| SureMount | Triangle Biomedical Sciences | Ксилол | Да |
| Thermo EZ Mount | Thermo Scientific | Ксилол | Да |
| Ultramount | Dako | Ксилол | Да |

## ССЫЛКИ


1. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: target for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2004;4;361-370.
2. Muleris M, et al. Assignment of v-erb-b2 avian erythroblastic leukemic viral oncogene homolog 2 (ERBB2) to human chromosome band 17121.1 by in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet. 1997;76:34-5.
3. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. Science. 1985;230:1132-1139.
4. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science. 1989;244:707-712.
5. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 1987;235:177-182.
6. Narita M, Nakao K, Ogino N, et al. Independent prognostic factors in breast cancer patients. Am J Surg. 1998;175:73-75.
7. O'Reilly SM, Barnes DM, Camplejohn RS, et al. The relationship between c-erbB-2 expression, S-phase fraction, and prognosis in breast cancer. Br J Cancer. 1991;63:444-446.
8. Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, et al. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. Oncogene. 1997;15:537-547.
9. Press MF, Pike MC, Chazin VR, et al. HER-2/neu expression in node-negative breast cancer: Direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. Cancer Res. 1993;53:4960-4970.
10. Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: Poor prognosis in node-negative breast carcinomas. J Clin Oncol. 1997;15:2894-2904.
11. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. J Clin Oncol. 1992;10:1049-1056.
12. Bianchi S, Paglierani M, Zampi G, et al. Prognostic significance of c-erbB-2 expression in node negative breast cancer. Br J Cancer. 1993;67:625-629.
13. Kallioniemi O-P, Holli K, Visakorpi T, et al. Association of c-erB-2 protein expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in bret cancer. Int J Cancer. 1991;49:650-655.
14. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. J Clin Oncol. 2002;20:719-726.
15. Baselga J, Carbonell X, Castaneda-Soto NJ, et al. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. J Clin Oncol. 2005;23:2162-2171.
16. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Concurrent administration of anti-HER2 monoclonal antibody and first-line chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. A phase III, multinational, randomized controlled trial. N Engl J Med. 2001;344:783-792.
17. Marty M, Cognetti F, Maraninichi D, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatments: The M77001 Study Group. J Clin Oncol. 2005;23:4265-4274.
18. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. N Engl J Med. 2005;353:1659-1672.
19. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. N Engl J Med. 2005;353:1673-1684.
20. Bilous M et al. Current perspectives on HER2 Testing: A review of national testing guidelines. Mod Pathol. 2003:173-182.
21. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al: ToGA Trial Investigators: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet 2010;376: 687-697.
22. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
23. Middleton LP, et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. Arch Pathol Lab Med. 2009;133:775-780.
24. Khoury T, Sait S, Hwang H, Chandrasekhar R, Wilding G, Tan D, Kulkami S. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. Mod Pathol. 2009;22:1457-1467.
25. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2007.
26. CLSI (formerly NCCLS). Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunocytochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.





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

27. Reinholz MM, et al. Breast cancer and aneusomy 17: Implications for carcinogenesis and therapeutic response. Lancet Oncol. 2009 Mar;10:267-277.
28. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.

## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

VENTANA, BENCHMARK, ultraView и логотип VENTANA являются товарными знаками Roche. Все остальные товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

© 2019 Ventana Medical Systems, Inc.

## КОНТАКТЫ



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany
www.ventana.com

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.



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

VENTANA®

## Приложение A. Бланк для подсчета VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1. **Идентификационный номер случая / Идентификационный номер пациента**: | 2. **Проведен подсчет в данном случае?** 2a. ☐ *Да — перейдите к пункту №* 3. 2b. ☐ *Нет — пропустите пункт №* 3. *Перейдите к пункту №* 4. | 3. **Существует ли гетерогенность опухоли?** 3a. ☐ *Да — пропустите пункт №* 4. *Перейдите к пункту №* 5. 3b. ☐ *Нет — пропустите пункт №* 4, *перейдите к пункту №* 5. | |
| 4. **Этот случай не подсчитан по причине, пометьте ВСЕ, что применимо**: | 4a. ☐ *На предметном стекле, окрашенном* ISH, *не осталось ткани* | 4b. ☐ *На предметном стекле, в образце окрашенной* ISH *ткани не обнаружено инвазивной карциномы* | 4c. ☐ *Морфология ядра неприменима; невозможно отличить структурные элементы ткани нормальных клеток от целевых клеток карциномы.* |
| | 4d. ☐ *Фоновое окрашивание неприменимо, мешает подсчету на* ISH-*окрашенных препаратах* ☐HER2 ☐Chr 17 | | |
| 4e. ☐ *Внутренний сигнал положительного контроля не обнаружен* ☐HER2 ☐Chr 17 | 4f. ☐ *Слабое/отсутствующее окрашивание* ISH *в целевых клетках, невозможно оценить* ☐HER2 ☐Chr 17 | 4g. ☐ *Другое* (*указать*): | |

5. **Подсчет в целевой области** 1: количество сигналов HER2 и Chr17 от каждого из 20 ядер. Добавьте количество сигналов HER2. Добавьте количество Chr 17. Определите отношение статуса гена, разделив общее количество сигналов HER2 на общее количество сигналов Chr 17. Округлите до 0,1 десятичного знака после запятой. Задокументируйте, было ли подсчитано количество кластеров или сигналов.

**КОЛИЧЕСТВО СИГНАЛОВ В ЦЕЛЕВОЙ ОБЛАСТИ** 1 — 20 **ядер**

| | 5a | 5b | 5c | 5d | 5e | 5f | 5g | 5h | 5i | 5j | 5k | 5l | 5m | 5n | 5o | 5p | 5q | 5r | 5s | 5t | 5u | 5v | 5w | 5x Комментарии |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | **ИТОГО** | **ОТНОШЕНИЕ** | **Кластеры?** | |
| HER2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ☐ Да ☐ Нет | |
| Chr17 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ☐ Да ☐ Нет | |

6. **Результат, полученный при исследовании** 20 **ядер**: 6a. ☐ Без амплификации: HER2/Chr17 <2,0 **или** 6b. ☐ С амплификацией: HER2/Chr17 ≥2,0

**Если отношение** HER2/Chr17 **попадает в диапазон от** 1,8 **до** 2,2, **необходим подсчет дополнительных** 20 **ядер**.

7. **Подсчет в целевой области** 2: количество сигналов HER2 и Chr17 от каждого из 20 ядер. Добавьте количество сигналов HER2. Добавьте количество Chr 17. Задокументируйте, было ли подсчитано количество кластеров или сигналов.

. **КОЛИЧЕСТВО СИГНАЛОВ В ЦЕЛЕВОЙ ОБЛАСТИ** 2 — **вторые** 20 **ядер** (**если отношение в целевой области** 1 — 1,8–2,2)

| | 7a | 7b | 7c | 7d | 7e | 7f | 7g | 7h | 7i | 7j | 7k | 7l | 7m | 7n | 7o | 7p | 7q | 7r | 7s | 7t | 7u | 8w | 8x Комментарии |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | **ИТОГО** | **Кластеры?** | |
| HER2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ☐ Да ☐ Нет | |
| Chr17 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ☐ Да ☐ Нет | |

8. **Результат, полученный при исследовании всех** 40 **ядер**:

8a. Целевая область 1 HER2 Общее _____ + Целевая область 2 HER2 Общее _____ = Общее количество HER2 _____ 8c. **Отношение**: Общее Her2 / Общее Chr17
(из коробки 5u) (из коробки 7u)

8b. Целевая область 1 Chr17 Общее _____ + Целевая область 2 Chr17 Общее _____ = Общее количество Chr17 _____ _____
(из коробки 5u) (из коробки 7u)

8d. **Окончательный результат, полученный при исследовании** 40 **ядер**: ☐ Без амплификации: HER2/Chr17 <2,0 или ☐ С амплификацией: HER2/Chr ≥2,0

Подсчет провел: _____ Дата: _____

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

# VENTANA DLL3 (SP347) Assay

REF 790-7016

08416931001

IVD Σ 50

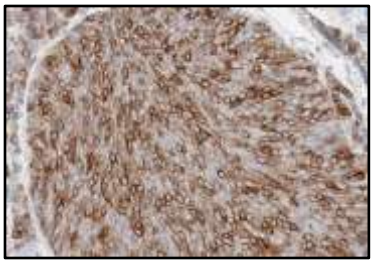


**Рисунок 1. Экспрессия VENTANA DLL3 (SP347) Assay на мелкоклеточной карциноме легкого.**

## НАЗНАЧЕНИЕ

Анализ VENTANA DLL3 (SP347) Assay (DLL3 (SP347) Assay) предназначен для лабораторного применения с целью обнаружения дельта-подобного белка 3 (DLL3) в срезах фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканей при окраске на аппаратах BenchMark IHC/ISH с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit.

Интерпретацию результатов, полученных с помощью данного продукта, должен выполнять квалифицированный патоморфолог с учетом результатов гистологического исследования, соответствующих клинических данных и надлежащих контролей.

Данные антитела предназначены для диагностики *in vitro* (IVD).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

В анализе DLL3 (SP347) Assay используется кроличье моноклональное антитело, вырабатываемое против белка DLL3. Окрашивание анализа DLL3 (SP347) Assay в опухолевых клетках может проявляться в виде точечного и/или диффузного цитоплазматического и/или мембранного окрашивания, которое может быть частичным или периферическим.

Дельта-подобный белок 3 (DLL3) представляет собой один из нескольких трансмембранных лигандов, которые участвуют в регуляции пути Notch. Путь Notch представляет собой важный механизм контроля жизни клеток, который регулирует клеточную дифференциацию, пролиферацию и апоптоз; эти клеточные пути имеют особое значение для биологии развития и поддержания стволовых клеток.[1] Дисрегуляция этого пути связана с нарушениями развития, с потенциалом для онкогенеза в различных тканях.[1] При нормальном развитии белок DLL3 ингибирует экспрессию сигнального пути Notch за счет перенаправления расщепленных Notch и DLL1 в эндосомы и/или лизосомы или тельца Гольджи соответственно. Эта секвестрация эффективно предотвращает локализацию активированного промежуточного белка Notch на поверхности клетки. Показано, что избыточная экспрессия Notch-1 ингибирует апоптоз у разных типов рака[2], поэтому ингибирование сигнального пути Notch является потенциальной терапевтической мишенью при раке.[2,3,4]

## ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

DLL3 (SP347) Assay использует кроличье моноклональное антитело, вырабатываемое против белка DLL3 в залитых в парафин тканевых срезах. Специфическое антитело можно визуализировать с использованием набора OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700/06396500001). Дополнительную информацию см. на листке-вкладыше в комплекте OptiView DAB IHC Detection Kit.

В дополнение к окрашиванию с помощью анализа DLL3 (SP347) Assay второй срез следует окрасить с помощью Rabbit Monoclonal Negative Control Ig(№ по каталогу 790-4795/06683380001).

## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

DLL3 (SP347) Assay содержит достаточное количество реагента для проведения 50 тестов.

Один дозатор с антителом DLL3 (SP347) объемом 5 мл содержит приблизительно 5 мкг кроличьих моноклональных антител.

Антитела растворены в физиологическом растворе с трис-буфером в концентрации 0,05 моль/л, содержащем ЭДТА 0,01 моль/л, 0,05 % Brij-35 с 0,3 % белка-носителя и 0,05 % азида натрия в качестве консерванта.

Общая концентрация белка в реагенте составляет приблизительно 3 мг/мл. Концентрация специфических антител составляет приблизительно 1 мкг/мл.

DLL3 (SP347) антитело представляет собой кроличье моноклональное антитело, полученное из очищенного супернатанта клеточной культуры.

См. листок-вкладыш соответствующего набора для обнаружения VENTANA, чтобы ознакомиться с более подробным описанием 1) принципов процедуры; 2) необходимых материалов и реагентов, не входящих в комплект; 3) сбора образцов тканей и подготовки к анализу; 4) процесса контроля качества; 5) принципов поиска и устранения проблем; 6) интерпретации результатов; 7) общих ограничений.

## НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

В комплект поставки не входят красящие реагенты, например наборы для обнаружения VENTANA, а также вспомогательные компоненты, в том числе микропрепараты для отрицательного и положительного контроля.

Продукты, перечисленные в листке-вкладыше, могут быть недоступны в некоторых странах. Проконсультируйтесь с местным представителем службы поддержки.

Для окрашивания могут потребоваться следующие реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки:

1. Рекомендуемые ткани с положительными и отрицательными контролями
2. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (№ по каталогу 790-4795/06683380001)
3. Предметные стекла для микроскопа (с положительным зарядом)
4. Сушильный шкаф, способный поддерживать температуру 60 °C ± 5 °C
5. Этикетки со штрихкодами (соответствующие отрицательному контролю реагента и используемому первичному антителу)
6. Ксилол (гистологической степени очистки)
7. Этанол или спиртосодержащий реагент (гистологической степени очистки)
   - 100%-ный раствор: неразбавленный этанол или спиртосодержащий реагент
   - 95%-ный раствор: смешать 95 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 5 частями деионизированной воды
   - 80%-ный раствор: смешать 80 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 20 частями деионизированной воды
8. Деионизированная или дистиллированная вода
9. OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700/06396500001)
10. EZ Prep Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-102/05279771001)
11. Reaction Buffer Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-300/05353955001)
12. ULTRA LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-210/05424534001)
13. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (№ по каталогу 950-224/05424569001)
14. LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-010/05264839001)
15. Cell Conditioning Solution (CC1) (№ по каталогу 950-124/05279801001)
16. Контрастное окрашивание Hematoxylin II (№ по каталогу 790-2208/05277965001)
17. Bluing Reagent (№ по каталогу 760-2037/05266769001)
18. Постоянная гистологическая среда для заливки образцов (Permount Fisher № по каталогу SP15-500 или эквивалентный продукт)
19. Покровное стекло (для помещения образцов ткани под стекло, например VWR № по каталогу 48393-060)
20. Автоматический аппарат для заключения под покровное стекло (например, Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
21. Световой микроскоп
22. Гигроскопические салфетки

## ХРАНЕНИЕ

После получения препарата и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживать.

Для обеспечения надлежащей сохранности реагента и стабильности антител после каждого использования необходимо закрывать флакон-дозатор крышкой и сразу ставить его в холодильник в вертикальном положении.



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

На каждом флаконе-дозаторе с раствором антител указан срок годности. При соблюдении условий хранения реагент остается стабильным до даты, указанной на этикетке. Не использовать реагент после истечения срока годности.

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Данное первичное антитело можно применять для окрашивания подготовленных стандартным образом, фиксированных формалином и залитых в парафин тканей при условии использования набора для обнаружения OptiView DAB Detection Kit, а также аппаратов BenchMark IHC/ISH. Рекомендуемым методом фиксации является выдерживание тканей в 10 % нейтральном забуференном формалине.[5] Не следует использовать фиксаторы с высокой концентрацией спирта (например, 95 % этанол) или фиксаторы на основе глиоксаля (например, фиксатор PREFER). Микропрепараты следует окрашивать немедленно, поскольку антигенность тканевых срезов со временем может уменьшаться.

Одновременно с исследованием неизвестных образцов рекомендуется провести исследование на положительном и отрицательном контролях.

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики *in vitro* (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. В данном реагенте в качестве консерванта используется раствор ProClin 300. Он относится к раздражающим средствам и при контакте с кожей может стать причиной сенсибилизации. При работе с реагентом соблюдайте обоснованные меры предосторожности. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. Используйте защитную одежду и перчатки.
4. Обладающие положительным электрическим зарядом предметные стекла могут быть подвержены неблагоприятным воздействиям со стороны окружающей среды, вследствие чего окрашивание любыми иммуногистохимическими методами приведет к неудовлетворительным результатам, например вследствие недостаточного количества первичного антитела или контрастного окрашивания в тканях. Запросите у своего представителя компании Roche копию документа «Неблагоприятные воздействия со стороны окружающей среды на обладающие положительным электрическим зарядом предметные стекла для ИГХ анализа» (Impacts of Environmental Stresses on IHC Positively Charged Slides) для того, чтобы лучше понять принцип использования стекол такого типа.
5. Материалы человеческого или животного происхождения следует считать биологически опасными материалами и утилизировать, соблюдая все необходимые меры предосторожности.
6. Избегайте контакта реагентов с глазами и слизистыми оболочками. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды.
7. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.
8. Проконсультируйтесь с местными и (или) государственными органами в отношении рекомендованного способа утилизации.
9. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Первичные антитела VENTANA разработаны для использования в аппаратах BenchMark IHC/ISH с применением наборов для обнаружения и вспомогательных компонентов OptiView DAB IHC. Рекомендованные протоколы окрашивания представлены в Таблица 1.

Данное антитело оптимизировано для инкубации в течение конкретных периодов времени, однако пользователю необходимо провести валидацию результатов, полученных с использованием данного реагента.

Параметры автоматических процедур могут быть отображены на экране, напечатаны и отредактированы согласно процедуре, описанной в руководстве пользователя, прилагаемом к соответствующему аппарату. Подробная информация о процедурах иммуногистохимического окрашивания содержится на листке-вкладыше соответствующего набора для обнаружения VENTANA.

**Таблица 1.** Рекомендуемый протокол окрашивания для DLL3 (SP347) Assay с OptiView DAB IHC Detection Kit на аппаратах BenchMark XT, BenchMark GX и BenchMark ULTRA.

| Тип процедуры | Метод |
|---|---|
| **Прогрев** | Дополнительно |
| **Депарафинирование** | Выбрано |
| **Кондиционирование клеток (демаскирование антигена)** | Аппарат BenchMark GX<br>CC1, 88 минуты<br>Аппарат BenchMark XT<br>CC1, 88 минуты<br>Аппарат BenchMark ULTRA<br>ULTRA CC1, 80 минут, 100 °C |
| **Антитело (первичное) или Rabbit Monoclonal Negative Control Ig** | Аппарат BenchMark GX<br>48 минут, 37 °C<br>Аппарат BenchMark XT<br>32 минут, 37 °C<br>Аппарат BenchMark ULTRA<br>32 минут, 36 °C |
| **Pre-primary Peroxidase Inhibitor** | Выбрано |
| **Контрастное окрашивание** | Hematoxylin II, 4 минуты |
| **Обработка после контрастного окрашивания** | Bluing, 4 минуты |

В связи с различиями в фиксации и обработке ткани, а также в лабораторном оборудовании общего назначения и условиях окружающей среды может потребоваться увеличить или уменьшить время инкубации первичного антитела, кондиционирования клеток или предварительной обработки протеазой в зависимости от конкретных образцов, методов обнаружения, а также от предпочтений экспертов. Дополнительная информация по факторам, влияющим на фиксацию, представлена в публикации Immunohistochemistry Principles and Advances.[6]

## ТКАНИ ДЛЯ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО И ОТРИЦАТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ

Примером ткани положительного контроля является ткань мелкоклеточной карциномы легкого. Когда окрашивание присутствует, опухолевые клетки проявляют точечное и/или диффузное цитоплазматическое и/или мембранное окрашивание DLL3, которое может быть частичным или периферическим. Нормальная легочная ткань может использоваться в качестве ткани для отрицательного контроля, поскольку она не имеет никакого окрашивания DLL3. Пигмент и кровь могут окрашиваться положительно для DLL3 и даже могут быть захвачены в альвеолярных макрофагах, что может придать им внешний вид положительного окрашивания. Это не следует считать фоновым или неприемлемым окрашиванием.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОКРАШИВАНИЯ/ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

В автоматическом иммуногистостейнере VENTANA в результате реакций образуется коричневый продукт (DAB), который оседает в местах расположения антигена, выявленного с помощью реактива DLL3 (SP347) Assay.

Характер окрашивания клеток для анализа DLL3 (SP347) Assay представляет собой точечное и/или диффузное цитоплазматическое и/или мембранное окрашивание, которое может быть частичным или периферическим.

## ОСОБЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Образец должен быть фиксирован в течение 24 часов после забора в 10%-ном нейтральном забуференном формалине на протяжении 6–72 часов.
2. Срезы тканей толщиной приблизительно 4–6 мкм следует разрезать и поместить предметные стекла с положительным зарядом.
3. Иммуногистохимический анализ — это многоэтапный диагностический процесс, который требует специальной подготовки при выборе надлежащих реагентов и тканей, фиксации, обработке и подготовке иммуногистохимического микропрепарата, а также интерпретации результатов окрашивания.



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

4. Окрашивание тканей зависит от обработки ткани перед окрашиванием. Ненадлежащая фиксация, замораживание, оттаивание, промывка, просушка, нагрев, микротомирование или загрязнение другими тканями или жидкостями может привести к появлению сторонних частиц, захвату антитела или получению ложноотрицательных результатов. Различия в методах фиксации и заливки или неоднородность свойств ткани могут стать причиной противоречивости получаемых результатов.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Результаты окрашивания тестовых препаратов с целью определения специфичности, чувствительности и воспроизводимости приведены в соответствующих таблицах (Таблица 2 и Таблица 3), а также в разделе Воспроизводимость.

### Специфичность

**Таблица 2.** Специфичность анализа DLL3 (SP347) Assay определялась путем окрашивания фиксированных формалином и залитых в парафин нормальных тканей.

| Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев | Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|---|---|
| Головной мозг | 1/9 | Желудок | 1/5 |
| Мозжечок | 0/6 | Тонкая кишка | 0/6 |
| Надпочечник | 5/6 | Толстая кишка | 0/6 |
| Яичник | 0/6 | Печень | 4/5 |
| Поджелудочная железа | 3/5 | Язык (ткань слюнной железы) | 0/6 |
| Лимфоузел | 0/2 | Почка | 0/6 |
| Гипофиз | 6/6 | Простата | 0/6 |
| Яичко | 1/6 | Матка | 0/2 |
| Щитовидная железа | 1/6 | Шейка матки | 0/1 |
| Вилочковая железа | 0/6 | Ткань скелетной мышцы | 0/3 |
| Молочная железа | 0/4 | Кожа | 0/1 |
| Селезенка | 0/6 | Ткань периферического нерва | 0/2 |
| Миндалина | 0/6 | Ткань плеврального мезотелия | 0/3 |
| Костный мозг | 0/4 | Глаз | 1/3 |
| Легкое | 0/5 | Гортань | 2/3 |
| Сердце | 0/6 | Паращитовидная железа | 0/3 |
| Пищевод | 0/6 | Мочевой пузырь | 0/3 |

### Чувствительность

**Таблица 3.** Чувствительность анализа DLL3 (SP347) Assay определяли путем окрашивания ряда фиксированных формалином и залитых в парафин препаратов опухолевых тканей.

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Головной мозг — глиобластома | 1/1 |
| Головной мозг — атипичная менингиома | 0/1 |
| Головной мозг — злокачественная эпендимома | 1/1 |
| Головной мозг — олигодендроглиома | 1/1 |
| Серозная аденокарцинома яичников | 0/1 |
| Аденокарцинома яичников | 0/1 |
| Поджелудочная железа — инсулома | 1/1 |
| Аденокарцинома поджелудочной железы | 0/1 |
| Семенник — семинома | 1/1 |
| Семенник — эмбриональный рак | 1/1 |
| Щитовидная железа — медуллярный рак | 1/1 |
| Щитовидная железа — папиллярная карцинома | 0/1 |
| Молочная железа — интрадуктальный рак | 0/1 |
| Молочная железа — инвазивный протоковый рак | 0/2 |
| Селезенка — диффузная В-клеточная лимфома | 0/1 |
| Легкое — мелкоклеточная карцинома | 1/1 |
| Легкое — плоскоклеточная карцинома | 0/1 |
| Легкое — аденокарцинома | 0/1 |
| Пищевод — плоскоклеточная карцинома | 0/1 |
| Пищевод — аденокарцинома | 0/1 |
| Желудок — муцинозная аденокарцинома | 0/1 |
| Аденокарцинома тонкой кишки | 0/1 |
| Тонкая кишка — злокачественная интерстициома | 1/1 |
| Толстая кишка — аденокарцинома | 0/1 |
| Толстая кишка — интерстициома | 0/1 |
| Прямая кишка — аденокарцинома | 0/1 |
| Прямая кишка — умеренно дифференцированная злокачественная интерстициома | 1/1 |
| Печень — гепатоцеллюлярная карцинома | 1/1 |
| Печень — гепатобластома | 0/1 |
| Почка — светлоклеточная карцинома | 0/1 |
| Предстательная железа — аденокарцинома | 0/2 |
| Матка — аденокарцинома | 0/1 |
| Матка — светлоклеточная карцинома | 0/1 |



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

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Шейка матки — плоскоклеточная карцинома | 1/2 |
| Поперечно-полосатая мышца — эмбриональная рабдомиосаркома | 0/1 |
| Прямая кишка — злокачественная меланома | 1/1 |
| Кожа — базальноклеточная карцинома | 0/1 |
| Ретроперитонеальное пространство — нейробластома | 0/1 |
| Перитонеальная полость — злокачественная мезотелиома | 0/1 |
| Лимфатический узел — диффузная В-клеточная лимфома | 1/2 |
| Лимфатический узел — лимфома Ходжкина (Hodgkin) | 1/1 |
| Мочевой пузырь — уротелиальная карцинома | 0/1 |
| Мочевой пузырь — злокачественная лейомиосаркома | 0/1 |
| Гладкая мускулатура — лейомиосаркома | 0/1 |

### Воспроизводимость

Исследования воспроизводимости окрашивания реагентом DLL3 (SP347) Assay проводились с целью определения следующих параметров:

- воспроизводимости результатов между партиями антител;
- повторяемости в пределах одного цикла и между циклами на одном аппарате BenchMark GX;
- повторяемости в пределах одного цикла и между циклами на одном аппарате BenchMark XT;
- повторяемости в пределах одного цикла и между циклами на одном аппарате BenchMark ULTRA;
- воспроизводимости между платформами с использованием аппаратов BenchMark GX, BenchMark XT и BenchMark ULTRA.

Все исследования соответствовали критериям приемлемости.

## ЛИТЕРАТУРА


1. Rizzo P, Osipo C, Foreman K, et al. Rational targeting of Notch signaling in cancer. Oncogene. 2008;27(38):5124-5131.
2. Ji X, Wang Z, Geamanu A, et al. Inhibition of cell growth and induction of apoptosis in non-small cell lung cancer cells by delta-tocotrienol is associated with notch-1 down regulation. J Cell Biochem. 2011;112(10):2773-2783.
3. Mullendore ME, Koorstra JB, Li YM, et al. Ligand-dependent Notch signaling is involved in tumor initiation and tumor maintenance in pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 2009;15(7):2291-2301.
4. Takebe, N, Nguyen D, Yang SX. Targeting notch signaling pathway in cancer: clinical development advances and challenges. Pharmacol Ther. 2014;141(2):140-149.
5. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
6. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.


## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ


VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW, и VENTANA логотип являются товарными знаками Roche.

Все остальные товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

© 2018 Ventana Medical Systems, Inc.


## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ


Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.

www.ventana.com





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

# VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay

REF 790-7026

08494665001

IVD Σ 50

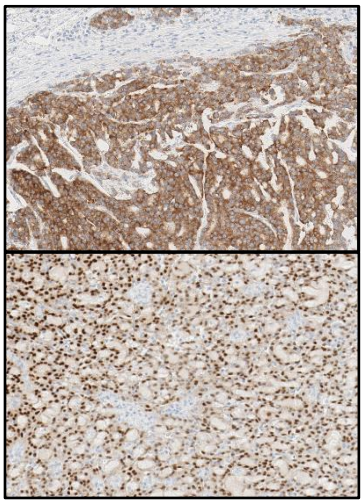


**Рисунок 1. Окрашивание химерного белка EML4-NTRK1 с помощью набора VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay при колоректальном раке (вверху) и химерного белка ETV6-NTRK3 при секреторной карциноме молочной железы (внизу).**

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Набор VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay предназначен для иммуногистохимического выявления С-концевой области протеинов A, B и C тропомиозин-рецепторной киназы (TPK). Указанная область, как известно, сохраняется в белках микроорганизмов дикого типа и химерных белках, в тканях, зафиксированных формальном и залитых парафином (FFPE) опухолевых тканях, окрашенных на аппаратах BenchMark IHC/ISH.

Результаты должны интерпретироваться квалифицированным патоморфологом с учетом данных гистологического исследования, соответствующих клинических данных и сравнения с контрольными образцами.

Данные антитела предназначены для диагностики *in vitro* (IVD).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

Набор VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay представляет собой первичные антитела кролика, направленные на С-концевую область белков A, B и C тропомиозин-рецепторной киназы (TPK). В норме TPK-рецепторы преимущественно экспрессируются в тканях нейронного происхождения и помогают регулировать дифференциацию и выживание клеток; они также играют физиологическую роль в развитии центральной и периферической нервных систем. [1, 2, 3, 4] Множественные изоформы всех трех белков (A, B, и C) тропомиозин-рецепторной киназы (TPK) были выявлены как в нейронных, так и в других тканях. Многие из них имеют N-концевые или С-концевые усечения. [5, 6] Это, в частности, привело к несоответствиям в указанных в литературе данных по распространенности экспрессии TPK-белков в разных типах тканей.

Эпитоп антител, входящих в набор VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay, расположен ниже по отношению к тирозин-киназе в пределах 3 областей генов тирозин-рецепторной киназы человека (HTPK 1, 2 и 3). Эпитоп также сохраняется во всех трех TPK-белках. Анализ был разработан для выявления экспрессии С-концевого белка и, таким образом, способен обнаруживать экспрессию химерных TPK-белков, а также белков дикого типа.

Экспрессия TPK-белков дикого типа в большинстве солидных опухолей, как правило, минимальна и мало распространена. Однако экспрессия TPK-белков дикого типа в некоторых нейроэндокринных опухолях может быть существенной.

Опухоли, экспрессирующие химерные HTPK-белки, как правило, имеют заметные уровни экспрессии TPK-доменов. HTTK1, HTPK2 и HTPK3, которые кодируются TPK-белками A, B и C соответственно, являются онкогенами, которые могут быть активированы. Это приводит к прогрессированию рака, вследствие чего хромосомные перестановки приводят к их патологическому соединению с другими генами, такими как ETV6, EML4, LMNA и TPM3. Эти онкогенные химерные белки, как правило, захватывают 3 региона HTPK, кодируя полный домен киназы, и некоторые кодирующие последовательности белков из 5 регионов несвязанных генов, таких как ETV6. Полученные в результате этого сверхэкспрессированные и, соответственно, активные химерные TPK-белки в свою очередь генерируют аномальные сигналы после сигнального пути. [7, 8, 9] В доклинических моделях было показано, что эти химерные протеины способны подавать сигнал лиганднезависимым способом с целью преобразования клеток. Было выявлено, что химерные TP-белки демонстрируют зависимость от онкогенов, что аналогично поведению других химерных белков при раке, например, белков ABL, ALK и ROS1.[10]

Химерные HTPK-белки были выявлены при низкочастотном обнаружении во множестве часто встречающихся опухолей, таких как рак легких, рак щитовидной железы и саркома. [8, 11-15] В очень редко встречающихся опухолях, таких как инфантильная фибросаркома, секреторный/ювенильный рак молочной железы и секреторный рак молочной железы (СРМЖ, секреторная карцинома), рак слюнных желез, присутствие химерных HTPK-белков, вероятно, будет определяющим генетическим признаком.[15-19]

Для данного антителопродуцирующего клона регистрировались следующие паттерны окрашивания химерных белков, зависящие от партнера: у всех 5 окрашенных химерных LMNA-NTRK1 белков проявилась контрастность ядерной мембраны, у всех 4 окрашенных химерных TPM3 белков отмечалась контрастность клеточной мембраны, а у половины (3 из 6) химерных ETV6-NTRK3 белков наблюдалось ядерное окрашивание.[20]

О дополнительных партнерах химерных белков сообщалось в литературе, но эти данные не были проверены с помощью набора VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay. [7, 21, 22]

## ПРИНЦИП ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Набор VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay связывается с эпитопом TPK-белков в залитых парафином участках тканей. Специфическое антитело можно визуализировать с использованием набора OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700 / 06396500001). Дополнительную информацию см. на листке-вкладыше в комплекте OptiView DAB IHC Detection Kit.

В дополнение к окрашиванию с помощью анализа VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay второй срез следует окрасить с помощью Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (№ по каталогу 790-4795 / 06683380001).

## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 50 тестов.

Один дозатор VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay объемом 5 мл содержит приблизительно 140 мкг кроличьего моноклонального антитела.

Антитело разведено в 0,05 M Tris-буферном солевом растворе, содержащем 0,01 M EDTA, 0,05 % раствор Brij-35 с 0,3 % белка-носителя и 0,05 % азида натрия в качестве консерванта.

Общая концентрация белка в реактиве составляет приблизительно 10 мг/мл. Концентрация специфических антител составляет около 28 мкг/мл. Неспецифической реактивности антител у данного продукта не обнаружено.

Набор VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay представляет собой белок A рекомбинантного кроличьего моноклонального антитела.

См. листок-вкладыш набора OptiView DAB IHC Detection Kit, чтобы ознакомиться с более подробным описанием: принципов действия; материалов и методов; сбора образцов тканей и подготовки к анализу; процесса контроля качества; принципов поиска и устранения проблем; результатов; общих ограничений.

## НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

В комплект поставки не входят красящие реагенты, например наборы для обнаружения VENTANA, а также вспомогательные компоненты, в том числе микропрепараты для отрицательного и положительного контроля.

Продукты, перечисленные в листке-вкладыше, могут быть недоступны в некоторых странах. Проконсультируйтесь с местным представителем службы поддержки.

Для окрашивания могут потребоваться следующие реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки.

1. Рекомендованный тканевый контроль
2. Предметные стекла для микроскопа (с положительным зарядом)
3. Сушилка с поддержанием температуры 60 ± 5 °C
4. Этикетки со штрихкодом
5. Ксилол (гистологической степени очистки)



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

6. Этанол или спиртосодержащий реагент (гистологической степени очистки)
   - 100 %-й раствор: неразбавленный этанол или спиртосодержащий реагент.
   - 95 %-й раствор: смешать 95 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 5 частями деионизированной воды.
   - 80 %-й раствор: смешать 80 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 20 частями деионизированной воды.
7. Деионизированная или дистиллированная вода
8. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (№ по каталогу 790-4795 / 06683380001)
9. OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700 / 06396500001)
10. EZ Prep Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-102 / 05279771001)
11. Reaction Buffer Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-300 / 05353955001)
12. LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-010 / 05264839001)
13. ULTRA LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-210 / 05424534001)
14. Cell Conditioning Solution (CC1) (№ по каталогу 950-124 / 05279801001)
15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (№ по каталогу 950-224 / 05424569001)
16. Hematoxylin II (№ по каталогу 790-2208 / 05277965001)
17. Bluing Reagent (№ по каталогу 760-2037 / 05266769001)
18. Постоянная гистологическая среда для заливки образцов (Permount Fisher, № по каталогу SP15-500, или эквивалентный продукт)
19. Покровное стекло (для помещения образцов ткани под стекло, например VWR, № по каталогу 48393-060)
20. Автоматический аппарат для заключения под покровное стекло (например, Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)

## ХРАНЕНИЕ

После получения препарата и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживать.

Для обеспечения надлежащей сохранности реагента и стабильности антител после каждого использования необходимо закрывать флакон-дозатор крышкой и сразу ставить его в холодильник в вертикальном положении.

На каждом флаконе-дозаторе с раствором антител указан срок годности. При соблюдении условий хранения реагент остается стабильным до даты, указанной на этикетке. Не использовать реагент после истечения срока годности.

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

При использовании наборов для обнаружения VENTANA и аппаратов BenchMark IHC/ISH данное первичное антитело можно применять для окрашивания подвергшихся стандартной обработке, фиксированных формалином и залитых в парафин срезов тканей. Рекомендованным фиксатором для тканей является 10%-й нейтральный забуференный формалин.[23] Предметные стекла следует окрашивать незамедлительно после получения, поскольку антигенность в срезах тканей может снижаться со временем.

Одновременно с исследованием неизвестных образцов рекомендуется провести исследование на положительном и отрицательном контролях.

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики *in vitro* (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. При использовании согласно инструкции данный продукт не считается опасным веществом. В качестве консерванта в реагенте используется азид натрия. Симптомы передозировки азида натрия включают в себя раздражение глаз и кожи, а также раздражение слизистых оболочек и верхних дыхательных путей. Концентрация азида натрия в реагенте составляет 0,05 %, что соответствует требованиям OSHA к содержанию опасных веществ. При накоплении азид натрия может вступать в реакцию со свинцовыми и медными канализационными трубами с образованием крайне взрывоопасных азидов металлов. Чтобы предотвратить накопление азидов в канализационных трубах, при утилизации реагент следует смывать большим количеством воды.[24] У лиц с повышенной чувствительностью возможно развитие системных аллергических реакций.
4. Обладающие положительным электрическим зарядом предметные стекла могут быть подвержены неблагоприятным воздействиям со стороны окружающей среды, вследствие чего окрашивание любыми иммуногистохимическими методами приведет к неудовлетворительным результатам, например вследствие недостаточного количества первичного антитела или контрастного окрашивания в тканях. Запросите у своего представителя компании Roche копию документа «Impacts of Environmental Stresses on IHC Positively Charged Slides» для того, чтобы лучше понять принцип использования предметных стекол такого типа.
5. Материалы человеческого или животного происхождения следует считать биологически опасными материалами и утилизировать, соблюдая все необходимые меры предосторожности.
6. Избегайте контакта реагентов с глазами и слизистыми оболочками. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды.
7. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.
8. Проконсультируйтесь с местными и (или) государственными органами в отношении рекомендованного способа утилизации.
9. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Первичные антитела VENTANA разработаны для использования в аппаратах BenchMark IHC/ISH с применением наборов для обнаружения и вспомогательных компонентов VENTANA. Рекомендованные протоколы окрашивания представлены в Таблица 1.

Данное антитело оптимизировано для инкубации в течение конкретных периодов времени, однако пользователю необходимо провести валидацию результатов, полученных с использованием данного реагента.

Параметры автоматических процедур могут быть отображены на экране, напечатаны и отредактированы согласно процедуре, описанной в руководстве пользователя, прилагаемом к соответствующему аппарату. Для получения более подробной информации об этапах процедуры иммуногистохимического окрашивания см. вкладыш в упаковку OptiView DAB IHC Detection Kit.

**Таблица 1.** Рекомендованный протокол окрашивания реагентом VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay с применением OptiView DAB IHC Detection Kit на приборах BenchMark IHC/ISH

| Тип процедуры | Метод | |
|---|---|---|
| | GX и XT | ULTRA |
| **Депарафинирование** | Выбрано | Выбрано |
| **Кондиционирование клеток (демаскирование антигена)** | CC1, 92 минуты | ULTRA CC1<br>88 мин при 100 °C |
| **Антитело (первичное) или Rabbit Monoclonal Negative Control Ig** | 32 мин при 37 °C | 16 минут, 36 °C |
| **Предварительная обработка первичным ингибитором пероксидазы** | Выбрано | |
| **Контрастное окрашивание** | Hematoxylin II, 4 минуты | |
| **Обработка после контрастного окрашивания** | Bluing, 4 минуты | |

В связи с различиями в фиксации и обработке ткани, а также в лабораторном оборудовании общего назначения и условиях окружающей среды может потребоваться увеличить или уменьшить время инкубации первичного антитела, кондиционирования клеток или предварительной обработки протеазой в зависимости от конкретных образцов, методов обнаружения, а также от предпочтений экспертов. Дополнительную информацию о различиях в методиках фиксации см. в руководстве «Immunohistochemistry Principles and Advances».[25]



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

## ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ТКАНЕВЫЙ КОНТРОЛЬ

Оптимальная лабораторная практика — помещение среза для положительного контроля на одно стекло с образцом исследуемой ткани. Это позволяет распознать случаи, когда реагенты нанесены на предметное стекло неправильно. Для контроля качества лучше всего подойдет образец ткани, в норме показывающий слабое положительное окрашивание. Контрольная ткань может содержать как положительно, так и отрицательно окрашиваемые элементы и использоваться в качестве как положительного, так и отрицательного контроля. В качестве контроля следует использовать свежие образцы тканей, полученные в ходе вскрытия, биопсии или хирургических операций. Образцы следует как можно скорее подготовить или зафиксировать.

Заведомо положительные тканевые контроли следует использовать только для контроля работы с реагентами и аппаратами, а не в качестве вспомогательного средства при постановке конкретного диагноза на основании тестовых образцов. Если не наблюдается положительного окрашивания положительных тканевых контролей, результаты окрашивания тестового образца следует считать недействительными.

Положительными контролями для данного антитела могут служить препараты мозжечка и аппендикса.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОКРАШИВАНИЯ/ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Окрашивание с помощью VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay наблюдалось в различных локализациях (ядерная, цитоплазматическая и мембранная).

## СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

Набор VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay не был оптимизирован с учетом различий между TPK-белками дикого типа и химерными белками.

Данное антитело было оптимизировано для инкубации на протяжении 16 минут на аппарате VENTANA BenchMark ULTRA и для инкубации на протяжении 32 минут на аппаратах BenchMark GX и BenchMark XT с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit, однако пользователю необходимо валидировать результаты, полученные с использованием данного реагента.

Срезы толщиной приблизительно 3-6 мкм следует разрезать и помещать на положительно заряженные предметные стекла.

Анализы могут регистрироваться не на каждом инструменте. Для получения дополнительной информации обратитесь к местному представителю компании Roche.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Результаты окрашивания тестовых препаратов с целью определения специфичности, чувствительности и воспроизводимости приведены в Таблица 2, Таблица 3, таблице 4, таблице 5, а также в разделе «Прецизионность».

### Чувствительность и специфичность

**Таблица 2.** Специфичность окрашивания реагентом VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay определялась путем окрашивания зафиксированных формалином и залитых в парафин нормальных тканей.

| Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев | Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|---|---|
| Надпочечник | 0/3 | Нерв | 0/2 |
| Мочевой пузырь | 0/23 | Яичник | 0/2 |
| Молочная железа | 0/3 | Поджелудочная железа | 0/3 |
| Мозжечок | 3/3 | Паращитовидная железа | 0/3 |
| Головной мозг | 3/3 | Перикард (сердечная мышца) | 0/1 |
| Шейка матки | 0/1 | Простата | 0/4 |
| Толстая кишка | 0/15 | Слюнная железа | 0/3 |
| Эндометрий (матка) | 0/2 | Скелетная мышца | 0/1 |
| Пищевод | 0/3 | Кожа | 0/2 |
| Сердце | 0/3 | Тонкий кишечник | 0/3 |
| Гипофиз | 3/3 | Селезенка | 0/3 |
| Почка | 0/3 | Желудок | 0/3 |
| Печень | 0/3 | Яичко | 0/3 |
| Легкое | 0/3 | Вилочковая железа | 0/3 |
| Лимфоузел | 0/2 | Щитовидная железа | 0/13 |
| Мезотелий (сердечная мышца) | 0/1 | Миндалина | 0/3 |
| Миелоидная ткань (костный мозг) | 0/3 | | |

**Таблица 3.** Чувствительность набора VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay определяли путем окрашивания фиксированных формалином и залитых в парафин опухолевых тканей.

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Аденокарцинома (мочевой пузырь) | 0/2 |
| Аденокарцинома (толстый кишечник) | 0/98 |
| Аденокарцинома (пищевод) | 0/1 |
| Аденокарцинома (легкое) | 0/1 |
| Аденокарцинома (простата) | 0/2 |
| Аденокарцинома (тонкая кишка) | 0/1 |
| Базальноклеточная карцинома (кожа) | 0/1 |
| Пограничный невус (кожа) | 0/1 |
| Светлоклеточная карцинома (почки) | 0/1 |
| Светлоклеточная карцинома (матка) | 0/1 |
| Сложный невус (кожа) | 0/8 |
| Возвышающаяся дерматофибросаркома (фиброзная ткань) | 0/10 |
| Диффузная B-клеточная лимфома (лимфатический узел) | 0/2 |
| Диффузная B-клеточная лимфома (селезенка) | 0/1 |



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

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Протоковая аденокарцинома (поджелудочная железа) | 0/1 |
| Эмбриональная карцинома (яички) | 0/1 |
| Эмбриональная рабдомиосаркома (поперечно-полосатая мускулатура) | 1/1 |
| Эндометриоидная аденокарцинома (матка) | 0/1 |
| Фибросаркома (фиброзная ткань) | 0/8 |
| Стромальная опухоль ЖКТ (СОЖКТ) (прямая кишка) | 0/2 |
| Стромальная опухоль ЖКТ (ЖКСО) (тонкая кишка) | 1/1 |
| Глиобластома (головной мозг) | 1/2 |
| Гепатобластома (печень) | 0/1 |
| Гепатоцеллюлярная карцинома (печень) | 0/1 |
| Лимфома Ходжкина (лимфатический узел) | 0/1 |
| Внутрикожный невус (кожа) | 0/6 |
| Внутрипротоковая карцинома (молочная железа) | 0/1 |
| Инвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 0/2 |
| Опухоль островков поджелудочной железы (поджелудочная железа) | 0/1 |
| Лейомиосаркома (мочевой пузырь) | 0/1 |
| Лейомиосаркома (гладкая мускулатура) | 1/19 |
| Липосаркома (жировая ткань) | 0/18 |
| Злокачественная меланома (пищевод) | 0/2 |
| Злокачественная меланома (прямая кишка) | 0/13 |
| Злокачественная меланома (кожа) | 0/42 |
| Злокачественная меланома (желудок) | 0/2 |
| Злокачественная меланома (вульва) | 0/4 |
| Злокачественная мезотелиома (брюшная полость) | 0/1 |
| Медуллярная карцинома (щитовидная железа) | 0/1 |
| Менингиома (головной мозг) | 1/1 |
| Метастатическая злокачественная меланома (лимфатический узел) | 0/21 |
| Муцинозная аденокарцинома (прямая кишка) | 0/7 |
| Муцинозная карцинома (яичник) | 0/1 |
| Муцинозная аденокарцинома (желудок) | 0/1 |
| Нейробластома (забрюшинное пространство) | 1/1 |
| Нейрофиброма (нервная ткань) | 0/1 |
| Папиллярная аденокарцинома (прямая кишка) | 0/2 |
| Папиллярная карцинома (щитовидная железа) | 1/45 |
| Плеоморфная рабдомиосаркома (забрюшинное пространство) | 0/1 |
| Рабдомиосаркома (скелетная мускулатура) | 2/19 |
| Жировой невус (кожа) | 0/1 |
| Семинома (яички) | 0/1 |
| Серозная папиллярная аденокарцинома (яичник) | 0/1 |
| Перстневидноклеточная карцинома (прямая кишка) | 0/2 |
| Мелкоклеточная недифференцированная карцинома (легкое) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (мочевой пузырь) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (шейка матки) | 0/2 |
| Плоскоклеточная карцинома (пищевод) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (легкое) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (кожа) | 0/1 |
| Фолликулярный рак щитовидной железы (щитовидная железа) | 0/19 |
| Недифференцированная карцинома (щитовидная железа) | 0/6 |
| Уротелиальная карцинома (мочевой пузырь) | 0/58 |

**Таблица 4.** Экспрессия белка обнаруживается при использовании набора VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay в клеточных линиях, содержащих химерные TPK-белки.

| Патология | Тип слияния | Выявлено с помощью набора VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay |
|---|---|---|
| Колоректальная карцинома | KM-12* (TPM3-NTRK1)[21,26-28] | ✓ |
| Острая миелоидная лейкемия | MO-91* (ETV6-NTRK3)[28,29] | ✓ |

*Клеточные линии, полученные из опухоли

**Таблица 5.** Экспрессия белков, выявленная с помощью набора VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay в опухолях, содержащих химерные TPK-белки. Секвенирование нового поколения, о котором сообщалось независимой лабораторией, позволило разработать тестирование на основе Oncomine Focus Assay.[30-33]

| Патология | Тип слияния | Выявлено с помощью набора VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay |
|---|---|---|
| Колоректальная карцинома | Формат бумаги «TPM3-NTRK1» | ✓ |
| | Формат бумаги «EML4-NTRK1» | |
| Секреторная карцинома молочной железы (СКМЖ) | Формат бумаги «ETV6-NTRK3» | ✓ |



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

### Прецизионность

Исследования прецизионности для антитела VENTANA pan-TRK (EPR17341) Assay проводились с целью определения следующего.

- Прецизионности антитела между партиями.
- Прецизионности цикла и суточной прецизионности на аппаратах BenchMark GX, BenchMark XT, BenchMark ULTRA.
- Прецизионности между аппаратами — на аппаратах BenchMark GX, BenchMark XT, BenchMark ULTRA.
- Прецизионности между платформами — на аппаратах BenchMark GX, BenchMark XT и BenchMark ULTRA.

Все исследования соответствовали критериям приемлемости.

### ССЫЛКИ


1. Barbacid M, Lamballe F, Pulido D, Klein R. The trk family of tyrosine protein kinase receptors. Biochim Biophys Acta. 1991;1072(2-3):115-27.
2. Barbacid M. Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. Ann NY Acad Sci. 1995;766:442-58.
3. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell. 2010;141(7):1117-34. (doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011)
4. Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. Cell. 1991;65(1):189-97.
5. Eide FF, Vining ER, Eide BL, Zang K, Wang XY, Reichardt LF. Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effect on brain-derived neurotrophic factor signaling. J Neurosci. 1996;16(10):3123-29.
6. Luberg K, Park R, Aleksejeva E, Timmusk T. Novel transcripts reveal a complex structure of the human TRKA gene and imply the presence of multiple protein isoforms. BMC Neurosci. 2015;16:78. (doi: 10.1186/s12868-015-0215-x)
7. Greco A, Mariani C, Miranda C, et al. The DNA rearrangement that generates the TRK-T3 oncogene involves a novel gene on chromosome 3 whose product has potential coiled-coil domain. Mol Cell Biol. 1995;15(11)6118-27.
8. Bongarzone I, Vigneri P, Mariani L, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA. RET/NTRK1 rearrangements in thyroid gland tumors of the papillary carcinoma family: correlation with clinicopathological features. Clin Cancer Res. 1998;4(1):223-8.
9. Stransky N, Cerami E, Schalm S, Kim JL, Lengauer C. The landscape of kinase fusions in cancer. Nat Commun. 2014;5:4846. (doi: 10.1038/ncomms5846)
10. Brzeziańska E, Karbownik M, Migdalska-Sek M, Pastuszak-Lewandoska D, Włoch J, Lewiński A. Molecular analysis of the RET and NTRK1 gene rearrangements in papillary thyroid carcinoma in the Polish population. Mutat Res. 2006;599(1-2):26-35.
11. De Braud FG, Pilla L, Niger M, et al. Phase 1 open label, dose escalation study of RXDX101, an oral pan-trk, ROS1, and ALK inhibitor, in patients with advanced solid tumors with relevant molecular alterations: Journal of Clinical Oncology - published online before print January 31, 2017. (doi: 10.1200/jco.2014.32.15_suppl.2502)
12. Fernandez-Cuesta L, Peifer M, Lu X, et al. Cross-entity mutation analysis of lung neuroendocrine tumors sheds light into their molecular origin and identifies new therapeutic targets. [abstract]. In: Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2014 Apr 5-9; San Diego, CA. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2014;74(19 Suppl):Abstract nr 1531. (doi: 10.1158/1538-7445.AM2014-1531)
13. Leeman-Neill RJ, Kelly LM, Liu P, et al. ETV6-NTRK3 is a common chromosomal rearrangement in radiation-associated thyroid cancer. Cancer. 2014;120(6):799-807.
14. Ross J.S, Wang K, Gay L, et al. New routes to targeted therapy of intrahepatic cholangiocarcinomas revealed by next-generation sequencing. Oncologist. 2014;19(3):235-42.
15. Argani PM, Fritsch M, Kadkoi SS, et al. Detection of the ETV6-NTRK3 chimeric RNA of infantile fibrosarcoma/cellular congenital mesoblastic nephroma in paraffin-embedded tissue: application to challenging pediatric renal stromal tumors. Mod Pathol. 2000;13(1):29-36.
16. Bishop JA, Yonescu R, Batista D, Begum S, Eisele DW, Westra WH. Utility of mammaglobin immunohistochemistry as a proxy marker for the ETV6-NTRK3 translocation in the diagnosis of salivary mammary analogue secretory carcinoma. Hum Pathol. 2013;44(10):1982-8.
17. Bourgeois JM, Knezevich SR, Mathers JA, Sorensen PH. Molecular detection of the ETV6-NTRK3 gene fusion differentiates congenital fibrosarcoma from other childhood spindle cell tumors. Am J Surg Pathol. 2000;24(7):937-46.
18. Rubin BP, Chen CJ, Morgan TW, et al. Congenital mesoblastic nephroma t(12;15) is associated with ETV6-NTRK3 gene fusion: cytogenetic and molecular relationship to congenital (infantile) fibrosarcoma. Am J Pathol. 1998;153(5):1451-8.
19. Tognon C, Knezevich SR, Huntsman D, et al. Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. Cancer Cell. 2002;2(5):367-76.
20. Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, et al. Pan-Trk immunohistochemistry is an efficient and reliable screen for the detection of NTRK fusions. Am J Surg Pathol. 2017;41(11):1547-51.
21. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer.Nat Med. 2013;19(11):1469-1472.
22. Passiglia F, Caparica R, Giovannetti E, et al. The potential of neurotrophic tyrosine kinase (NTRK) inhibitors for treating lung cancer. Expert Opin Investig Drugs. 2016;25(4):385-92.
23. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
24. Department of Health, Education and Welfare, National Institute of Occupational Safety and Health, Rockville, MD. Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides. DHHS (NIOSH) Publ No. 78-127, Current 13. August 16, 1976.
25. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
26. Creancier L, Vandenberghe I, Gomes B, et al. Chromosomal rearrangements involving the NTRK1 gene in colorectal carcinoma. Cancer Letters. 2015;365:107-111.
27. Murphy D, Ely H, Shoemaker R, et al. Detecting gene rearrangements in patient populations through a 2-step diagnostic test comprised of rapid IHC enrichment followed by sensitive next-generation sequencing. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2017; 25(7): 513-523.
28. Doebele RC, Davis LE, Vaishnavi A, et al. An onogenic NTRK fusion in soft tissue sarcoma patient with response to the tryopomyosin-related kinase (TRK) inhibitor LOXO-101. Cancer Discovery. 2015;5(10):1049-57.
29. Taipale M, Krykbaeva I, Whitesell L, et al. Chaperones as thermodynamic sensors of drug-target interactions reveal kinase inhibitor specificities in living cells. Nat Biotech. 2013;31:630-7.
30. Passinen-Sohns A, Koelzer VH, Frank A, et al. Single-Center Experience with a Targeted Next Generation Sequencing Assay for Assessment of Relevant Somatic Alterations in Solid Tumors. Neoplasia. 2017;19(3):196-206.
31. Oncomine™ Focus Assay, Part I: Library Preparation USER GUIDE. Document number: MAN0015819.B.0.
32. Oncomine™ Focus Assay Part II: Plan a Run, Template Preparation, and Sequencing USER GUIDE. Document number. MAN0015820.A.0.
33. Velizheva NP, Rechsteiner MP, Valtcheva N, et al. Targeted next-generation-sequencing for reliable detection of targetable rearrangements in lung adenocarcinoma—a single center retrospective study. Path research and prac. 2018;214:572-578.


### ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ


VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW и логотип VENTANA являются товарными знаками компании Roche. Все остальные товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

© 2018 Ventana Medical Systems, Inc.


### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ


Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.

www.ventana.com





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

# VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay

REF 790-7027

08504148001

IVD Σ 50

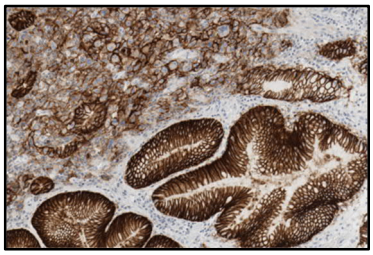


**Рисунок** 1. **Экспрессия реагента** VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay **на ткани аденокарциномы желудка**.

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Реагент VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay предназначен для иммуногистохимического обнаружения белка Claudin 18 (CLDN18) в фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканях, окрашенных на аппаратах BenchMark IHC/ISH.

Результаты должны интерпретироваться квалифицированным патоморфологом с учетом данных гистологического исследования, соответствующих клинических данных и сравнения с контрольными образцами.

Данные антитела предназначены для диагностики in vitro (IVD).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

Реагент VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay — это мышиное моноклональное антитело (клон 43-14A), направленное против белков Claudin 18, и оно выявляет изоформу Claudin 18.1 и изоформу Claudin 18.2. Окрашивание при этом анализе имеет мембранный характер.

Трансмембранные белки Claudin 18 содержат основной компонент плотных контактов. Последние регулируют проницаемость парацеллюлярных барьеров и полярность мембраны. Белки CLDN контролируют избирательный перенос ионов по клеткам и поддерживают целостность эпителиальных и эндотелиальных слоев.[1,2] У млекопитающих было выявлено 27 членов семейства Claudin.[3] Прогнозируемая структура белка CLDN включает четыре трансмембранных сегмента[4] с двумя внеклеточными петлями и N- и C-концами, локализованными в цитоплазме. Ген Claudin 18 представляет собой кодирование ДНК с помощью 785 пар оснований для белков, состоящих из 261 аминокислот, с молекулярной массой ~ 27,7 кДа. Белок Claudin 18 имеет две изоформы (CLDN18.1 и CLDN18.2). Изоформа CLDN18.2 отличается от изоформы CLDN18.1 69 аминокислотами в N-конце молекулы, включая первую внеклеточную петлю.[5]

В отличие от большинства членов семейства CLDN, белок CLDN18 проявляет экспрессию в немногих видах тканей. Изоформы CLDN18 можно кратковременно обнаруживать в дифференцированных эпителиальных клетках нормальной слизистой оболочки желудка и пневмоцитах нормальной легочной ткани, при ряде прогрессирующих и метастатических видов рака желудочно-кишечного тракта, включая рак желудка, пищевода, поджелудочной железы, желчных протоков, а также при немелкоклеточном раке легких.[6-12]

## ПРИНЦИП ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Реагент VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay является мышиным моноклональным первичным антителом, которое связывается с белком CLDN18 в залитых в парафин срезах ткани. Специфическое антитело можно визуализировать с использованием набора OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700 / 06396500001). Дополнительную информацию см. на листке-вкладыше в комплекте OptiView DAB IHC Detection Kit.

## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 50 тестов.

Один дозатор VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay объемом 5 mL содержит приблизительно 15 мкг мышиного моноклонального антитела.

Антитела растворены в физиологическом растворе с трис-буфером в концентрации 0,05 моль/л, содержащем ЭДТА 0,01 моль/л, 0,05 % Brij-35 с 0,3 % белка-носителя и 0,05 % азида натрия в качестве консерванта.

Общая концентрация белка в реагенте составляет приблизительно 3 мг/mL. Концентрация специфических антител составляет около 3 мкг/mL.

VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay является моноклональным антителом, полученным как супернатант клеточной культуры.

На листке-вкладыше соответствующего набора для обнаружения VENTANA можно найти более подробное описание принципов действия; материалов и методов; сбора образцов тканей и подготовки к анализу; процесса контроля качества; принципов поиска и устранения проблем; результатов; общих ограничений.

## НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

В комплект поставки не входят красящие реагенты, например наборы для обнаружения VENTANA, а также вспомогательные компоненты, в том числе микропрепараты для отрицательного и положительного контроля.

Продукты, перечисленные в листке-вкладыше, могут быть недоступны в некоторых странах. Проконсультируйтесь с местным представителем службы поддержки.

Для окрашивания могут потребоваться следующие реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки:

1. Рекомендованный тканевый контроль.
2. Предметные стекла для микроскопа (с положительным зарядом).
3. Сушилка с поддержанием температуры 60 ± 5 °C.
4. Этикетки со штрихкодом.
5. Ксилол (гистологической степени очистки).
6. Этанол или спиртосодержащий реагент (гистологической степени очистки).
   - 100 % раствор: неразбавленный этанол или спиртосодержащий реагент.
   - 95% раствор: смесь 95 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 5 частями деионизированной воды.
   - 80% раствор: смесь 80 частей этанола или спиртового реагента с 20 частями деионизированной воды.
7. Деионизированная или дистиллированная вода.
8. Negative Control (Monoclonal) (№ по каталогу 760-2014 / 05266670001).
9. OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700 / 06396500001).
10. EZ Prep Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-102 / 05279771001).
11. Reaction Buffer Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-300 / 05353955001).
12. LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-010 / 05264839001).
13. ULTRA LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-210 / 05424534001).
14. Cell Conditioning Solution (CC1) (№ по каталогу 950-124 / 05279801001).
15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (№ по каталогу 950-224 / 05424569001).
16. Hematoxylin II (№ по каталогу 790-2208 / 05277965001).
17. Bluing Reagent (№ по каталогу 760-2037 / 05266769001).
18. Постоянная гистологическая среда для заливки образцов (Permount Fisher № по каталогу SP15-500 или эквивалентный продукт).
19. Покровное стекло (для помещения образцов ткани под стекло, например, VWR № по каталогу 48393-060).
20. Автоматический аппарат для заключения под покровное стекло (например, Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper).
21. Световой микроскоп.
22. Гигроскопические салфетки.

## ХРАНЕНИЕ

После получения препарата и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживать.

Для обеспечения надлежащей сохранности реагента и стабильности антител после каждого использования необходимо закрывать флакон-дозатор крышкой и сразу ставить его в холодильник в вертикальном положении.

На каждом флаконе-дозаторе с раствором антител указан срок годности. При соблюдении условий хранения реагент остается стабильным до даты, указанной на этикетке. Не использовать реагент после истечения срока годности.



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

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

При использовании наборов для обнаружения VENTANA и аппаратов BenchMark IHC/ISH данное первичное антитело можно применять для окрашивания подвергшихся стандартной обработке, фиксированных формалином и залитых в парафин срезов тканей.

Рекомендуемый фиксатор ткани — это 10 % нейтральный буферный формалин [13] с продолжительностью фиксации от 6 часов до 48 часов.

Необходимо получить срезы ткани толщиной приблизительно 4 мкм и нанести их на положительно заряженные предметные стекла. Толщина срезов для данного анализа может составлять от 3 мкм до 6 мкм.

Перед окрашиванием полученные препараты необходимо полностью высушить либо при комнатной температуре (сушка на воздухе), либо в сушилке без использования приборов (сушка в сушилке) при 60 °C. Продолжительность сушки должна занимать 60 минут.

Микропрепараты следует немедленно окрасить, так как антигенность срезов ткани со временем может уменьшаться и ухудшаться под действием факторов окружающей среды во время длительного хранения.[17-20] Рекомендации по продолжительному хранению неокрашенных препаратов можно найти в разделе «Особые ограничения».

Одновременно с исследованием неизвестных образцов рекомендуется провести исследование на положительном и отрицательном контролях.

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики in vitro (IVD).
2. **ВНИМАНИЕ!** Федеральное законодательство США разрешает продажу этой продукции только медицинским работникам или по их заказу. (Rx Only)
3. Только для профессионального использования.
4. Обладающие положительным электрическим зарядом предметные стекла могут быть подвержены неблагоприятным воздействиям со стороны окружающей среды, вследствие чего окрашивание любыми иммуногистохимическими методами приведет к неудовлетворительным результатам, например вследствие недостаточного количества первичного антитела или контрастного окрашивания в тканях. Запросите у своего представителя компании Roche копию документа «Impacts of Environmental Stresses on IHC Positively Charged Slides» для того, чтобы лучше понять принцип использования предметных стекол такого типа.
5. Материалы человеческого или животного происхождения следует считать биологически опасными материалами и утилизировать, соблюдая все необходимые меры предосторожности.
6. Избегайте контакта реагентов с глазами и слизистыми оболочками. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды.
7. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.
8. Проконсультируйтесь с местными и (или) государственными органами в отношении рекомендованного способа утилизации.
9. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Первичные антитела VENTANA разработаны для использования в аппаратах BenchMark IHC/ISH с применением наборов для обнаружения и вспомогательных компонентов VENTANA. Рекомендованные протоколы окрашивания см. в Таблица 1.

Данное антитело оптимизировано для инкубации в течение конкретных периодов времени, однако пользователю необходимо провести валидацию результатов, полученных с использованием данного реагента.

Параметры автоматических процедур могут быть отображены на экране, напечатаны и отредактированы согласно процедуре, описанной в руководстве пользователя, прилагаемом к соответствующему аппарату. Подробная информация о процедурах иммуногистохимического окрашивания содержится на листке-вкладыше соответствующего набора для обнаружения VENTANA.

**Таблица** 1. Рекомендованный протокол окрашивания для VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay с помощью OptiView DAB Detection Kit на аппаратах BenchMark IHC/ISH.

| Тип процедуры | Метод | | |
|---|---|---|---|
| | GX | XT | ULTRA |
| **Прогрев** | Не выбрано | Не выбрано | Не выбрано |
| **Депарафинирование** | Выбрано | Выбрано | Выбрано |
| **Кондиционирование клеток (демаскирование антигена)** | CC1, 64 минуты | CC1, 64 минуты | ULTRA CC1 64 минуты, 100°C |
| **Подготовка к нанесению антитела с помощью ингибитора пероксидазы** | Выбрано | Выбрано | Выбрано |
| **Антитело (первичное) или** Negative Control (Monoclonal) | 16 мин, 37 °C | 32 мин, 37 °C | 16 мин, 37 °C |
| OptiView HQ Linker | 8 минут (по умолчанию) | 8 минут (по умолчанию) | 8 минут (по умолчанию) |
| OptiView HRP Multimer | 8 минут (по умолчанию) | 8 минут (по умолчанию) | 8 минут (по умолчанию) |
| OptiView Amplification | Не выбрано | | |
| **Контрастное окрашивание** | Hematoxylin II, 8 минуты | | |
| **Обработка после контрастного окрашивания** | Bluing, 4 минуты | | |

В связи с различиями в фиксации и обработке ткани, а также в лабораторном оборудовании общего назначения и условиях окружающей среды может потребоваться увеличить или уменьшить время инкубации первичного антитела, кондиционирования клеток или предварительной обработки протеазой в зависимости от конкретных образцов, методов обнаружения, а также от предпочтений экспертов. Дополнительную информацию о различиях в методиках фиксации см. в руководстве «Immunohistochemistry Principles and Advances».[14]

В дополнение к окрашиванию с помощью анализа VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay второй срез следует окрасить с помощью Negative Control (Monoclonal) (№ по каталогу 760-2014 / 05266670001).

## ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ТКАНЕВЫЙ КОНТРОЛЬ

Оптимальная лабораторная практика — помещение среза для положительного контроля на одно стекло с образцом исследуемой ткани. Это позволяет распознать случаи, когда реагенты нанесены на предметное стекло неправильно. Для контроля качества лучше всего подойдет образец ткани, в норме показывающий слабое положительное окрашивание. Контрольная ткань может содержать как положительно, так и отрицательно окрашиваемые элементы и использоваться в качестве как положительного, так и отрицательного контроля. В качестве контроля следует использовать свежие образцы тканей, полученные в ходе вскрытия, биопсии или хирургических операций. Образцы следует как можно скорее подготовить или зафиксировать по точно такой же процедуре, что используется для исследуемых образцов.

Заведомо положительные тканевые контроли следует использовать только для контроля работы с реагентами и аппаратами, а не в качестве вспомогательного средства при постановке конкретного диагноза на основании тестовых образцов. Если не наблюдается положительного окрашивания положительных тканевых контролей, результаты окрашивания тестового образца следует считать недействительными.

Примером контролей для данного антитела является желудочно-кишечная метаплазия, которая демонстрирует сильное мембранное окрашивание в нормальных эпителиальных клетках желудка и слабое или умеренное мембранное окрашивание эпителиальных клеток в областях метаплазии. Желудочно-кишечная метаплазия желудка не дает окрашивания белком CLDN18 в собственной пластинке



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

слизистой оболочки кишечника, лимфоцитах, гладких мышцах, кровеносных сосудах и периферических нервах, которые могут использоваться в качестве отрицательных контролей.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОКРАШИВАНИЯ / ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

В автоматическом иммуногистостейнере VENTANA в результате реакций образуется коричневый продукт (DAB), который оседает в местах расположения антигена, выявленного с помощью реактива VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay. Окрашивание с использованием реагента VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay носит мембранный характер. Также может отмечаться цитоплазматическое окрашивание. Интерпретация результатов контроля системных уровней должна производиться квалифицированным патоморфологом, имеющим опыт работы с иммуногистохимическими методиками. Прежде чем интерпретировать результаты, необходимо оценить контроли и удостовериться в соответствии окрашенного препарата критериям качества.

## СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

Реагент VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay будет обнаруживать как изоформу CLDN18.1, так и изоформу CLDN 18.2 и может давать IHC-окрашивание в эпителиальных клетках нормальной ткани желудка[6,7], пневмоцитах нормальной ткани легких[6,7,12,15] и клетках Панета нормальной ткани тонкого кишечника.[5] Экспрессия белка CLDN18 в пределах этих клеток или совместно с ними была зарегистрирована и опубликована в литературе.[6,7,9-12,15,16]

Данное антитело оптимизировано для инкубации в течение конкретных периодов времени (см. Таблицу 1) на аппарате BenchMark IHC/ISH в комбинации с аппаратом OptiView DAB IHC Detection Kit, однако пользователю необходимо провести валидацию результатов, полученных с использованием данного реагента.

Исследования подтверждают стабильность антигена на неокрашенных препаратах на протяжении по крайней мере 45 дней. Препараты следует высушивать и хранить при комнатной температуре. Поскольку экологические факторы, как известно, влияют на стабильность антигена на полученных микропрепаратах, лаборатории должны отслеживать даты истечения сроков годности в условиях хранения лаборатории, если желательный срок хранения составляет более 45 дней.

Анализы могут регистрироваться не на каждом инструменте. Для получения дополнительной информации обратитесь к местному представителю компании Roche.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Результаты окрашивания тестовых препаратов с целью определения специфичности, чувствительности и воспроизводимости приведены в соответствующих таблицах (Таблица 2 и Таблица 3), а также в разделе «Прецизионность».

### Чувствительность и специфичность

**Таблица** 2. Чувствительность/Специфичность окрашивания реагентом VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay определялась путем окрашивания зафиксированных формалином и залитых в парафин нормальных тканей.

| Ткань | Кол-во положительных случаев/ общее кол-во случаев | Ткань | Кол-во положительных случаев/ общее кол-во случаев |
|---|---|---|---|
| Надпочечник | 0/3 | Яичник (строма) | 0/3 |
| Мочевой пузырь | 0/3 | Паращитовидная железа | 0/3 |
| Костный мозг | 0/3 | Поджелудочная железа | 0/3 |
| Молочная железа | 0/3 | Периферический нерв | 0/3 |
| Мозжечок | 0/3 | Простата | 0/3 |
| Головной мозг | 0/3 | Слюнная железа | 0/3 |
| Толстая кишка | 0/3 | Скелетная мускулатура | 0/3 |
| Эндометрий | 0/3 | Кожа | 0/3 |
| Пищевод | 0/3 | Тонкий кишечник | 2/3** |
| Сердце | 0/3 | Селезенка | 0/3 |
| Гипофиз | 0/3 | Желудок | 12/12 *** |
| Почка | 0/3 | Яичко | 0/3 |
| Печень | 0/3 | Тимус | 0/3 |
| Легкое | 2/4* | Щитовидная железа | 0/3 |
| Лимфоузел | 0/3 | Миндалины | 0/3 |
| Мезотелий | 0/2 | Шейка матки | 0/3 |

*Мембранное окрашивание в присутствии белка CLDN18 наблюдается в 2 из 4 образцов пневмоцитов. В 3 из 4 образцов бронхиальный эпителий отсутствовал.

**Мембранный и цитоплазматический характеры окрашивание в присутствии белка CLDN18 наблюдаются в разновидности клеток Панета.

***Мембранный и цитоплазматический характеры окрашивание в присутствии белка CLDN18 наблюдаются в эпителиальных клетках желудка.

**Таблица** 3. Чувствительность/Специфичность реагента VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay была определена путем окрашивания ряда фиксированных формалином и залитых в парафин препаратов опухолевых тканей.

| Патология | Кол-во положительных случаев/ общее кол-во случаев |
|---|---|
| Глиобластома (головной мозг) | 0/1 |
| Менингиома (головной мозг) | 0/1 |
| Эпендимома (головной мозг) | 0/1 |
| Олигодендроглиома (головной мозг) | 0/1 |
| Серозная аденокарцинома (яичники) | 0/1 |
| Аденокарцинома (яичники) | 0/1 |
| Нейроэндокринное новообразование поджелудочной железы (поджелудочная железа) | 0/1 |
| Аденокарцинома (поджелудочная железа) | 0/1 |
| Семинома (яички) | 0/1 |
| Эмбриональная карцинома (яички) | 0/1 |
| Медуллярная карцинома (щитовидная железа) | 0/1 |
| Папиллярная карцинома (щитовидная железа) | 0/1 |
| Микроинвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 0/1 |
| Инвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 0/2 |
| В-клеточная лимфома; неуточненная (селезенка) | 0/1 |
| Мелкоклеточная карцинома (легкое) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (легкое) | 0/1 |
| Аденокарцинома (легкое) | 0/1 |



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

| Патология | Кол-во положи-тельных случаев/ общее кол-во случаев |
|---|---|
| Плоскоклеточная карцинома (пищевод) | 0/1 |
| Аденокарцинома (пищевод) | 0/1 |
| Муцинозная аденокарцинома (желудок) | 0/1 |
| Аденокарцинома (тонкая кишка) | 0/1 |
| Стромальная опухоль ЖКТ (тонкая кишка) | 0/1 |
| Аденокарцинома (толстая кишка) | 0/1 |
| Желудочно-кишечная стромальная опухоль (ЖКСО) (толстая кишка) | 0/1 |
| Аденокарцинома (прямая кишка) | 0/1 |
| Желудочно-кишечная стромальная опухоль (ЖКСО) (прямая кишка) | 0/1 |
| Гепатоцеллюлярная карцинома (печень) | 0/1 |
| Гепатобластома (печень) | 0/1 |
| Светлоклеточная карцинома (почки) | 0/1 |
| Аденокарцинома (простата) | 0/2 |
| Лейомиома (матка) | 0/1 |
| Аденокарцинома (матка) | 0/1 |
| Светлоклеточная карцинома (матка) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (шейка матки) | 0/2 |
| Эмбриональная рабдомиосаркома ((поперечно-полосатая мускулатура) | 0/1 |
| Меланома (прямая кишка) | 0/1 |
| Базальноклеточная карцинома (кожа) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (кожа) | 0/1 |
| Нейрофиброма (поясница) | 0/1 |
| Нейробластома (забрюшинное пространство) | 0/1 |
| Мезотелиома (брюшина) | 1/1 * |
| В-клеточная лимфома; неуточненная (лимфатический узел) | 0/2 |
| Лимфома Ходжкина (лимфатический узел) | 0/1 |
| Анапластическая крупноклеточная лимфома (лимфатический узел) | 0/1 |
| Уротелиальная карцинома (мочевой пузырь) | 0/1 |
| Лейомиосаркома (мочевой пузырь) | 0/1 |
| Рабдомиосаркома (брюшина) | 0/1 |
| Лейомиосаркома (гладкая мускулатура) | 0/1 |

*Окрашивание в присутствии белка CLDN18 наблюдается примерно в 3 % злокачественных клеток

### Точность

Исследования прецизионности для антитела VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay проводились с целью определения следующего.

- Прецизионности антитела между партиями.
- Прецизионности цикла и суточной прецизионности на аппарате BenchMark ULTRA.
- Прецизионности между аппаратами с использованием аппаратов BenchMark GX, BenchMark XT и BenchMark ULTRA.
- Прецизионности между платформами — на аппаратах BenchMark XT, BenchMark GX и BenchMark ULTRA.

Все исследования соответствовали критериям приемлемости.

### Сравнение метода

Исследования сравнения метода для реагента VENTANA CLDN18 (43-14A) Assay проводились между аппаратами BenchMark XT, BenchMark GX и BenchMark ULTRA.

Все исследования соответствовали критериям приемлемости.

## ССЫЛКИ


1. Anderson JM, Van Itallie CM. Physiology and Function of the Tight Junction. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2009;1(2):a002584.
2. Martin TA. The role of tight junctions in cancer metastasis. Semin Cell Dev Biol. 2014;36:224-31.
3. Gunzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiol Rev. 2013;93:525-69.
4. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;2:285-93.
5. Niimi T, Nagashima K, Ward JM, et al. Claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing. Mol Cell Biol. 2001;21:7380-90.
6. Sahin U, Koslowski M, Dhaene K, et al. Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development. Clin Cancer Res. 2008;14:7624-34.
7. Tureci O, Koslowski M, Helftenbein G, et al. Claudin-18 gene structure, regulation, and expression is evolutionary conserved in mammals. Gene. 2011;481:83-92.
8. Woll S, Schlitter AM, Dhaene K, et al. Claudin 18.2 is a target for IMAB362 antibody in pancreatic neoplasms. Int J Cancer. 2014;134:731-9.
9. Karanjawala ZE, Illei PB, Ashfaq R, et al. New markers of pancreatic cancer identified through differential gene expression analyses: claudin 18 and annexin A8. Am J Surg Pathol. 2008;32:188-96.
10. Shinozaki A, Shibahara J, Noda N, et al. Claudin-18 in biliary neoplasms. Its significance in the classification of intrahepatic cholangiocarcinoma. Virchows Arch. 2011;459:73-80.
11. Tanaka M, Shibahara J, Fukushima N, et al. Claudin-18 is an early-stage marker of pancreatic carcinogenesis. J Histochem Cytochem. 2011;59:942-52.
12. Micke P, Mattsson JS, Edlund K, et al. Aberrantly activated claudin 6 and 18.2 as potential therapy targets in non-small-cell lung cancer. Int J Cancer. 2014;135:2206-14.
13. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
14. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
15. Merikallio H, Pääkkö P, Harju T, Soini Y. Claudins 10 and 18 are Predominantly Expressed in Lung Adenocarcinomas and in Tumors of Nonsmokers. Int J Clin Exp Pathol. 2011:4(7):667-673.
16. Sanada Y, Oue N, Mitani Y, et al. Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype. J Pathol. 208:633-642. 2006.
17. Economou M, Schoni L, Hammer C, et al. Proper paraffin slide storage is crucial for translational research projects involving immunohistochemistry. Clin Transl Med. 2014:3:4. Published online 2014 Mar 17.
18. Xie R, Chung JY, Ylaya K, et al. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. J Histochem Cytochem. 2011;3:356–365.
19. Bertheau P, Cazals-Hatem D, Meignin V, et al. Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides. J Clin Pathol. 1998;3:370–374.
20. Ramos-Vara JA, Webster JD, Dusold D, Miller MA. Immunohistochemical evaluation of the effects of paraffin section storage on biomarker stability. Vet Pathol. 2014;3:102–109.





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

## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW и логотип VENTANA являются товарными знаками Roche. Все остальные товарные знаки являются собственностью их владельцев.

© 2018 Ventana Medical Systems, Inc.

## КОНТАКТЫ

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

www.ventana.com

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.



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

# VENTANA MSLN (SP74) ASSAY

REF 790-7028

08508011001

IVD Σ 50

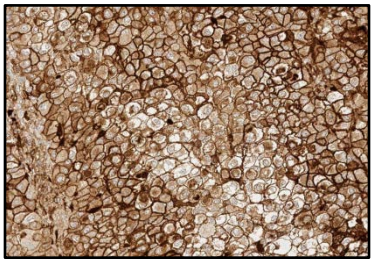


**Рисунок 1. Экспрессия VENTANA MSLN (SP74) Assay на ткани мезотелиомы**

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Набор VENTANA MSLN (SP74) Assay предназначен для иммуногистохимической оценки белка мезотелина в фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканях, окрашенных на аппаратах BenchMark IHC/ISH.

Интерпретацию результатов, полученных с помощью данного продукта, должен выполнять квалифицированный патоморфолог с учетом результатов гистологического исследования, соответствующих клинических данных и надлежащих контролей.

Данные антитела предназначены для диагностики *in vitro* (IVD).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

VENTANA MSLN (SP74) Assay является кроличьим моноклональным антителом, которое вырабатывается против белка мезотелина (MSLN). Антитело VENTANA MSLN (SP74) Assay демонстрирует цитоплазматическое и мембранное окрашивание.

Мезотелин (MSLN) представляет собой мембраносвязанный, располагающийся на поверхности клеток гликопротеин с молекулярной массой 40 кДа. Его распространение в значительной степени ограничено здоровыми мезотелиальными клетками, выстилающими плевру, перикард и брюшину.[1–4] Биологическая функция MSLN неизвестна, однако было обнаружено, что он ограниченно локализован на нормальных тканях и показывает высокую экспрессию при раке поджелудочной железы, раке яичников, мезотелиоме и других видах рака.[5]

## ПРИНЦИП ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

VENTANA MSLN (SP74) Assay является первичным кроличьим моноклональным антителом, которое связывается с белком MSLN в срезах тканей, залитых в парафин. Специфическое антитело можно визуализировать с использованием набора OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700 / 0639500001). Дополнительную информацию см. на листке-вкладыше в комплекте OptiView DAB IHC Detection Kit.

В дополнение к окрашиванию с помощью анализа VENTANA MSLN (SP74) Assay второй срез следует окрасить с помощью Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (№ по каталогу 790-4795 / 06683380001).

## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

VENTANA MSLN (SP74) Assay содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 50 тестов.

Один дозатор VENTANA MSLN (SP74) Assay объемом 5 мл содержит приблизительно 5 мкг кроличьего моноклонального антитела.

Антитела разведены в забуференном фосфатом физиологическом растворе, содержащем 0,01 моль/л ЭДТА, 0,05 % Brij-35 с 0,3 % белка-носителя.

Общая концентрация белка в реагенте составляет приблизительно 3 мг/мл. Концентрация специфических антител составляет приблизительно 1 мкг/мл.

VENTANA MSLN (SP74) Assay является белком A рекомбинантного кроличьего моноклонального антитела.

См. листок-вкладыш соответствующего набора для обнаружения VENTANA, чтобы ознакомиться с более подробным описанием принципов действия; материалов и методов; сбора образцов тканей и подготовки к анализу; процесса контроля качества; принципов поиска и устранения проблем; результатов; общих ограничений.

## НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

В комплект поставки не входят красящие реагенты, например наборы для обнаружения OptiView DAB IHC Detection Kit, а также вспомогательные компоненты, в том числе микропрепараты для отрицательного и положительного контролей.

Продукты, перечисленные в листке-вкладыше, могут быть недоступны в некоторых странах. Проконсультируйтесь с местным представителем службы поддержки.

Для окрашивания могут потребоваться следующие реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки:

1. Образцы здоровых фаллопиевых труб человека для использования в качестве контрольной ткани
2. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (№ по каталогу 790-4795 / 06683380001)
3. Предметные стекла для микроскопа (с положительным зарядом)
4. Этикетки со штрих-кодом
5. Ксилол (гистологической степени очистки)
6. Этанол или спиртосодержащий реагент (гистологической степени очистки)
   - 100%-ный раствор: неразбавленный этанол или спиртосодержащий реагент
   - 95%-ный раствор: смешать 95 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 5 частями деионизированной воды
   - 80%-ный раствор: смешайте 80 частей этанола или спиртового реактива с 20 частями деионизированной воды
7. Деионизированная или дистиллированная вода
8. OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700 / 06396500001)
9. EZ Prep Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-102 / 05279771001)
10. Reaction Buffer Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-300 / 05353955001)
11. LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-010 / 05264839001) для автоматических аппаратов окрашивания BenchMark XT и GX.
12. ULTRA LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-210 / 05424534001) для автоматического аппарата окрашивания BenchMark ULTRA.
13. Cell Conditioning Solution (CC1) (№ по каталогу 950-124 / 05279801001) для автоматических аппаратов окрашивания BenchMark XT и GX.
14. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (№ по каталогу 950-224 / 05424569001) для автоматического аппарата окрашивания BenchMark ULTRA.
15. Контрастное окрашивание Hematoxylin II (№ по каталогу 790-2208 / 05277965001)
16. Bluing Reagent (№ по каталогу 760-2037 / 05266769001)
17. Постоянная гистологическая среда для заливки образцов (Permount Fisher № по каталогу SP15-500 или эквивалентный продукт).
18. Покровное стекло (для помещения образцов ткани под стекло, например VWR, № по каталогу 48393-060)
19. Автоматический аппарат для заключения под покровное стекло (например, Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
20. Световой микроскоп
21. Гигроскопические салфетки

## ХРАНЕНИЕ

После получения препарата и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживать.

Для обеспечения надлежащей сохранности реагента и стабильности антител после каждого использования необходимо закрывать флакон-дозатор крышкой и сразу ставить его в холодильник в вертикальном положении.

На каждом флаконе-дозаторе с раствором антител указан срок годности. При соблюдении условий хранения реагент остается стабильным до даты, указанной на этикетке. Не использовать реагент после истечения срока годности.

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Данное первичное антитело можно применять для окрашивания подготовленных стандартным образом, фиксированных формалином и залитых в парафин тканей при условии использования набора для обнаружения OptiView DAB Detection Kit, а также аппаратов BenchMark IHC/ISH. Рекомендуемым методом фиксации является выдерживание тканей в 10 % нейтральном забуференном формалине в течение 6–72 часов.[6] Не следует использовать фиксаторы с высокой концентрацией спирта



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

(например, 95 % этанол) или фиксаторы на основе глиоксаля (например, фиксатор PREFER). Микропрепараты следует окрашивать немедленно, поскольку антигенность тканевых срезов со временем может уменьшаться.

Одновременно с исследованием неизвестных образцов рекомендуется провести исследование на положительном и отрицательном контролях.

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики *in vitro* (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. В данном реагенте в качестве консерванта используется раствор ProClin 300. Он относится к раздражающим средствам и при контакте с кожей может стать причиной сенсибилизации. При работе с реагентом соблюдайте обоснованные меры предосторожности. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. Используйте защитную одежду и перчатки.
4. Обладающие положительным электрическим зарядом предметные стекла могут быть подвержены неблагоприятным воздействиям со стороны окружающей среды, вследствие чего окрашивание любыми иммуногистохимическими методами приведет к неудовлетворительным результатам, например, вследствие недостаточного количества первичного антитела или контрастного окрашивания в тканях. Чтобы лучше понять принцип использования стекол такого типа, запросите у представителя компании Roche копию документа «Impacts of Environmental Stresses on IHC Positively Charged Slides».
5. Материалы человеческого или животного происхождения следует считать биологически опасными материалами и утилизировать, соблюдая все необходимые меры предосторожности.
6. Избегайте контакта реагентов с глазами и слизистыми оболочками. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды.
7. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.
8. Проконсультируйтесь с местными и (или) государственными органами в отношении рекомендованного способа утилизации.
9. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Первичные антитела VENTANA разработаны для использования в аппаратах BenchMark IHC/ISH с применением наборов для обнаружения OptiView DAB IHC и вспомогательных компонентов. Рекомендованные протоколы окрашивания представлены в Таблице 1.

Данное антитело оптимизировано для инкубации в течение конкретных периодов времени, однако пользователю необходимо провести валидацию результатов, полученных с использованием данного реагента.

Параметры автоматических процедур могут быть отображены на экране, напечатаны и отредактированы согласно процедуре, описанной в руководстве пользователя, прилагаемом к соответствующему аппарату. Подробная информация о процедурах иммуногистохимического окрашивания содержится на листке-вкладыше соответствующего набора для обнаружения VENTANA.

**Таблице 1.** Рекомендованный протокол окрашивания реагентом VENTANA MSLN (SP74) Assay с применением OptiView DAB IHC Detection Kit на приборах BenchMark IHC/ISH

| Тип процедуры | Метод | | |
|---|---|---|---|
| | GX | XT | ULTRA |
| **Депарафинирование** | Выбрано | | |
| **Кондиционирование клеток (демаскирование антигена)** | CC1<br>72 минуты,<br>100 °C | CC1<br>64 минуты,<br>100 °C | ULTRA CC1<br>64 минуты,<br>100 °C |
| **Антитело (первичное)** | 8 минут,<br>37 °C | 8 минут,<br>37 °C | 8 минут,<br>36 °C |
| OptiView HQ Linker | 8 мин | | |
| OptiView HRP Multimer | 8 мин | | |
| **Контрастное окрашивание** | Hematoxylin II, 4—12 минут | | |
| **Обработка после контрастного окрашивания** | Bluing, 4—12 минут | | |

В связи с различиями в фиксации и обработке тканей, а также в лабораторном оборудовании и внешних условиях, может потребоваться увеличение или уменьшение времени инкубации первичных антител и кондиционирования клеток в зависимости от конкретных образцов, диагностических методов и предпочтений пользователя. Дополнительная информация о факторах, влияющих на фиксацию, содержится в источнике Immunohistochemistry Principles and Advances.[7]

## ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ТКАНЕВЫЙ КОНТРОЛЬ

Оптимальная лабораторная практика — помещение среза для положительного контроля на одно стекло с образцом исследуемой ткани. Это позволяет распознать случаи, когда реагенты нанесены на предметное стекло неправильно. Для контроля качества лучше всего подойдет образец ткани, в норме показывающий слабое положительное окрашивание. Контрольная ткань может содержать как положительно, так и отрицательно окрашиваемые элементы и использоваться в качестве как положительного, так и отрицательного контроля. В качестве контроля следует использовать свежие образцы тканей, полученные в ходе вскрытия, биопсии или хирургических операций. Образцы следует как можно скорее подготовить или зафиксировать по точно такой же процедуре, что используется для исследуемых образцов.

Заведомо положительные тканевые контроли следует использовать только для контроля работы реагентов и аппаратов, но не для постановки конкретного диагноза на основании анализируемых образцов. Если не наблюдается положительного окрашивания положительных тканевых контролей, результаты окрашивания тестового образца следует считать недействительными.

Примером контрольной ткани для этого антитела является ткань здоровой фаллопиевой трубы, которая демонстрирует мембранное окрашивание эпителия, выстилающего просвет, от слабого до интенсивного и отсутствие специфического стромального окрашивания. Предпочтительным окрашиванием для контроля с приемлемым системных уровнем является окрашивание от слабого до умеренного окраски в эпителии и отсутствие специфического стромального окрашивания здоровой фаллопиевой трубы. Эпителиальное окрашивание используется в качестве внутреннего положительного контроля, а отсутствие специфического стромального окрашивания — в качестве внутреннего отрицательного контроля.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОКРАШИВАНИЯ / ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

В автоматическом иммуногистостейнере VENTANA в результате реакций образуется коричневый продукт (DAB), который оседает в местах расположения антигена, выявленного с помощью реактива VENTANA MSLN (SP74) Assay.

Характер окрашивания клеток реагентом VENTANA MSLN (SP74) Assay мембранный или цитоплазматический в опухолевых тканях. Стромальное окрашивание в случаях с высокой экспрессией является обычным явлением и не должно считаться неприемлемым.

## СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

Образец должен быть фиксирован в течение 24 часов после забора в 10%-ном нейтральном забуференном формалине на протяжении 6–72 часов.

Срезы тканей толщиной приблизительно 4 мкм следует разрезать и поместить предметные стекла с положительным зарядом.

Иммуногистохимический анализ — это многоэтапный диагностический процесс, который требует специальной подготовки при выборе надлежащих реагентов и тканей, фиксации, обработке и подготовке иммуногистохимического микропрепарата, а также интерпретации результатов окрашивания.



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

Окрашивание тканей зависит от обработки ткани перед окрашиванием. Ненадлежащая фиксация, замораживание, оттаивание, промывка, просушка, нагрев, микротомирование или загрязнение другими тканями или жидкостями может привести к появлению сторонних частиц, захвату антитела или получению ложноотрицательных результатов. Различия в методах фиксации и заливки или неоднородность свойств ткани могут стать причиной противоречивости получаемых результатов.

Анализы могут регистрироваться не на каждом инструменте. Для получения дополнительной информации обратитесь к местному представителю компании Roche.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Результаты окрашивания тестовых препаратов с целью определения специфичности, чувствительности и воспроизводимости приведены в соответствующих таблицах (Таблице 2 и Таблице 3), а также в разделе «Прецизионность».

### Чувствительность и специфичность

**Таблице 2.** Специфичность окрашивания реагентом VENTANA MSLN (SP74) Assay определялась путем окрашивания зафиксированных формалином и залитых в парафин нормальных тканей.

| Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев | Ткань | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|---|---|
| Головной мозг | 0/3 | Костный мозг | 0/3 |
| Мозжечок | 0/3 | Легкое | 0/3 |
| Надпочечник | 0/3 | Перикард / мезотелий | 3/3 |
| Яичник | 2/3 | Сердце (сердечная мышца) | 0/3 |
| Эндометрий | 1/3 | Пищевод | 0/3 |
| Шейка матки | 1/3 | Желудок | 0/3 |
| Поджелудочная железа | 0/3 | Тонкий кишечник | 2/3 |
| Лимфоузел | 0/3 | Толстая кишка | 3/3 |
| Гипофиз | 0/3 | Печень | 0/3 |
| Яичко | 0/3 | Слюнная железа | 0/3 |
| Паращитовидная железа | 0/3 | Почка | 0/3 |
| Щитовидная железа | 0/4 | Мочевой пузырь | 3/3 |
| Молочная железа | 0/3 | Простата | 0/3 |
| Селезенка | 0/5 | Скелетная мышца | 0/4 |
| Миндалина | 2/3 | Кожа | 0/3 |
| Вилочковая железа | 3/3 | Периферический нерв | 0/3 |

**Таблице 3.** Чувствительность реагента VENTANA MSLN (SP74) Assay, определенная путем окрашивания ряда фиксированных формалином и залитых в парафин препаратов опухолевых тканей

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Глиобластома (головной мозг) | 0/1 |
| Менингиома (головной мозг) | 0/1 |
| Эпендимома (головной мозг) | 0/1 |
| Олигодендроглиома (головной мозг) | 0/1 |
| Серозная аденокарцинома (яичники) | 1/1 |
| Аденокарцинома (яичники) | 1/1 |
| Нейроэндокринное новообразование поджелудочной железы (поджелудочная железа) | 0/1 |
| Аденокарцинома (поджелудочная железа) | 1/1 |
| Семинома (яички) | 0/1 |
| Эмбриональная карцинома (яички) | 0/1 |
| Медуллярная карцинома (щитовидная железа) | 0/1 |
| Папиллярная карцинома (щитовидная железа) | 0/1 |
| Протоковая карцинома (молочная железа) in situ | 0/1 |
| Инвазивная протоковая карцинома (молочная железа) | 0/2 |
| В-клеточная лимфома; неуточненная (селезенка) | 0/1 |
| Мелкоклеточная карцинома (легкое) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (легкое) | 1/1 |
| Аденокарцинома (легкое) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (пищевод) | 1/1 |
| Аденокарцинома (пищевод) | 0/1 |
| Муцинозная аденокарцинома (желудок) | 0/1 |
| Аденокарцинома (тонкая кишка) | 0/1 |
| Стромальная опухоль ЖКТ (тонкая кишка) | 0/1 |
| Аденокарцинома (толстая кишка) | 1/1 |
| Желудочно-кишечная стромальная опухоль (ЖКСО) (толстая кишка) | 0/1 |
| Аденокарцинома (прямая кишка) | 1/1 |
| Желудочно-кишечная стромальная опухоль (ЖКСО) (прямая кишка) | 0/1 |
| Гепатоцеллюлярная карцинома (печень) | 0/1 |
| Гепатобластома (печень) | 0/1 |
| Светлоклеточная карцинома (почки) | 0/1 |
| Аденокарцинома (простата) | 0/2 |
| Лейомиома (матка) | 0/1 |



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

| Патология | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|---|---|
| Аденокарцинома (матка) | 1/1 |
| Светлоклеточная карцинома (матка) | 1/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (шейка матки) | 2/2 |
| Эмбриональная рабдомиосаркома (поперечно-полосатая мускулатура) | 0/1 |
| Меланома (прямая кишка) | 0/1 |
| Базальноклеточная карцинома (кожа) | 0/1 |
| Плоскоклеточная карцинома (кожа) | 0/1 |
| Нейрофиброма (поясница) | 0/1 |
| Нейробластома (забрюшинное пространство) | 0/1 |
| Мезотелиома (брюшина) | 1/1 |
| В-клеточная лимфома; неуточненная (лимфатический узел) | 0/2 |
| Лимфома Ходжкина (Hodgkin) (лимфатический узел) | 0/1 |
| Анапластическая крупноклеточная лимфома (лимфатический узел) | 0/1 |
| Лейомиосаркома (мочевой пузырь) | 0/1 |
| Остеосаркома | 0/1 |
| Веретеноклеточная рабдомиосаркома (брюшина) | 0/1 |
| Лейомиосаркома (гладкая мускулатура) | 0/1 |

### Прецизионность

Исследования прецизионности для антитела VENTANA MSLN (SP74) Assay проводились с целью определения:

- Прецизионности антитела между партиями.
- Прецизионности цикла и суточной прецизионности на аппаратах BenchMark GX, BenchMark XT, BenchMark ULTRA.
- Прецизионности между аппаратами — на аппаратах BenchMark GX, BenchMark XT и BenchMark ULTRA.
- Прецизионности между платформами — на аппаратах BenchMark XT, BenchMark GX и BenchMark ULTRA.

Все исследования соответствовали критериям приемлемости.

## ССЫЛКИ


1. Chang K, Pai LH, Batra JK, Pastan I, Willingham MC. Characterization of the antigen (CAK1) recognized by monoclonal antibody K1 present on ovarian cancers and normal mesothelium. Cancer Res. 1992;52(1):181-6.
2. Chang K, Pastan I. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a protein detected by the K1 antibody from an ovarian carcinoma (OVCAR-3) cell line. Int J Cancer. 1994;57(1):90-7.
3. Chang K, Pastan I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93(1):136-40.
4. Chowdhury PS, Viner JL, Beers R, Pastan I. Isolation of a high-affinity stable single-chain Fv specific for mesothelin from DNA-immunized mice by phage display and construction of a recombinant immunotoxin with anti-tumor activity. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95(2):669-74.
5. Pastan I, Hassan R. Discovery of mesothelin and exploiting it as a target for immunotherapy. Cancer Res. 2014;74(11):2907-12.
6. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
7. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.


## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ


VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW и логотип VENTANA являются товарными знаками компании Roche. Все остальные товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

© 2018 Ventana Medical Systems, Inc.


## КОНТАКТЫ


Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

www.ventana.com

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.





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

# Дополнительная информация относительно реагентов

## Линейный дозатор
## Инструкции по подготовке к использованию, обращению и хранению

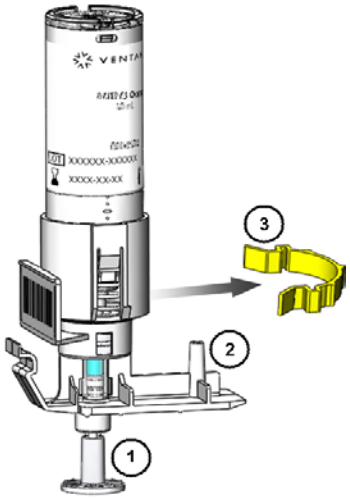
IVD

Линейный дозатор предназначен для нанесения и подачи реагентов и растворов для исследований in vitro (IVD), выполняемых на аппаратных платформах BenchMark (кроме аппарата BenchMark Special Stains), а также может использоваться на аппаратных платформах DISCOVERY. Более подробную информацию см. в соответствующем листке-вкладыше в упаковку.

Для диагностики *in vitro* (IVD).

### ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

#### Снятик колпачка наконечника и транспортного замка




1 Снимите колпачок наконечника.

2 Поместите колпачок наконечника в держатель колпачка наконечника.

В колпачке наконечника может находиться жидкость.

3 Удерживая дозатор в вертикальном положении, с каждой стороны потяните за язычок транспортного замка, чтобы отсоединить его. Утилизируйте транспортный замок.

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ.**
НЕ закрывайте кончик наконечника и не прикасайтесь к нему при выполнении дозировки реагента или заливки дозатора. Это может привести к необратимому повреждению дозатора. В процессе снятия транспортного замка НЕ нажимайте на верхнюю часть цилиндра дозатора, так как может произойти утечка реагента.

**Для ПО NexES версии 8.0 и более поздних выпусков и для Ventana System** Software (VSS)

При запуске каждого сеанса окрашивания программное обеспечение аппарата будет проверять, находится ли на карусели для реагентов новый дозатор, и автоматически заливать его резервуар, нажимая на верхнюю часть цилиндра, чтобы подать реагент в заливочную камеру.

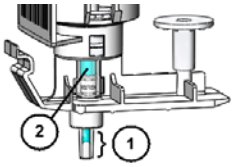
Нет необходимости в заливке дозатора вручную, так как это может привести к утечке реагента и уменьшить количество доступных к использованию доз реагента.

**Для всех версий ПО NexES *до* версии 8.0**

После снятия колпачка наконечника снимите транспортный замок и, удерживая дозатор вертикально, ЗАЛЕЙТЕ ЕГО ПУТЕМ БЫСТРОГО НАКАЧИВАНИЯ 3 ИЛИ 4 РАЗА. Заливка необходима только перед первым использованием дозатора. (См. раздел «Проверка подготовительной заливки дозатора и наконечника перед каждым использованием».)

#### Проверка подготовительной заливки дозатора и наконечника перед каждым использованием

Снимите колпачок наконечника и проверьте кончик наконечника. См. рисунок ниже.




Дозатор готов к использованию, если:

- кончик наконечника свободен от твердого мусора (1); тщательно удалите засохший реагент из кончика наконечника;
- между основанием и кончиком наконечника виден мениск реагента (1);
- в заливочной камере (2) находится жидкость; в ней могут присутствовать небольшие пузырьки.

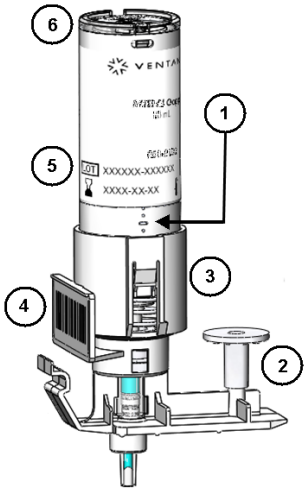
Если одно или более из данных условий не выполняются, обратитесь к разделу «Поиск и устранение неисправностей».

#### Хранение и обращение

Инструкции по хранению и использованию продукта, а также срок его годности см. в листке-вкладыше в упаковку и на этикетках дозатора.

Чтобы обеспечить надлежащую подачу и стабильность каждого реагента, после каждого использования дозатора кончик наконечника следует закрывать колпачком. Дозатор следует хранить в вертикальном положении в условиях, указанных в листке-вкладыше.

#### Характеристики дозатора




1 На цилиндр нанесены миллилитровые метки

2 Держатель колпачка наконечника

3 Соединитель

4 Этикетка со штрих-кодом и серийный номер дозатора

5 Номер партии на этикетке

6 Верхняя часть цилиндра дозатора

**ПРИМЕЧАНИЕ.** Если вручную нажать на верхнюю часть цилиндра дозатора, выделится капля реагента. См. разделы «Предостережения и меры предосторожности» и «Поиск и устранение неисправностей».

### ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики *in vitro* (IVD).
2. Перед каждым использованием дозатора проверяйте заливочную камеру и мениск. (См. раздел «Проверка подготовительной заливки дозатора и наконечника перед каждым использованием».)
3. При размещении дозатора на лотке для дозаторов держите его за соединитель, чтобы избежать случайного выдавливания реагента.
4. Надевайте колпачок на наконечник после каждого использования и храните дозатор в вертикальном положении.
5. Не дозируйте реагент вручную, если дозатор перевернут. Это приведет к потере заливки камеры, которую может оказаться невозможным восстановить.
6. Не дозируйте реагент вручную, не сняв сперва колпачок с наконечника. Это может привести к необратимому повреждению дозатора.
7. Не дозируйте реагент вручную и не заливайте дозатор перед каждым использованием. Данный этап не является необходимым и приводит к ненужному расходу реагента.
8. Не держите цилиндр в нажатом положении. При нажатии на цилиндр из дозатора может вытекать жидкость.
9. Не складывайте карусели с установленными на них дозаторами друг на друга. Это может привести к утечке жидкости из дозаторов.



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

## ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Предварительно заполняемые дозаторы VENTANA были заполнены, чтобы обеспечить достаточное количество исследований. При выполнении дозировки или заливки дозатора вручную число возможных доз для испытаний может оказаться недостаточным, что приведет к получению нежелательных результатов окрашивания.

| Проблема | Решение |
|---|---|
| Первичное заполнение дозатора не выполнено надлежащим образом (заливочная камера частично заполнена или пуста) | Повторная заливка дозатора<br><br>При правильном обращении с дозатором заливка камеры не теряется. Если необходима повторная заливка дозатора, выполните следующие действия.<br>1. Направьте кончик дозатора в контейнер для сбора отходов. Снимите колпачок с наконечника и нажмите на цилиндр (верхнюю часть дозатора). При этом должна выделиться капля жидкости.<br>2. Если капля не появилась, повторите действие 1 несколько раз до выделения капли.<br>3. Если капля выделилась, см. раздел «Проверка заливки дозатора и наконечника перед каждым использованием».<br><br>Если капля не появляется, или проверка заливки (действие 3) дала неудовлетворительный результат, или требуется повторная заливка дозатора, обратитесь к региональному представителю службы поддержки. |
| Отсутствует мениск реагента между основанием и кончиком наконечника. | Частичное заполнение для восстановления мениска<br>1. Если реагент не виден в области наконечника, медленно нажмите на цилиндр, чтобы выдавить реагент в основание и в кончик наконечника. Когда мениск будет виден, отпустите цилиндр.<br>2. Если ситуация не разрешилась, необходимо повторно залить дозатор в соответствии с этапами, указанными выше в разделе «Повторная заливка дозатора».<br><br>При повторном возникновении проблемы обратитесь к региональному представителю службы поддержки. |
| Наличие инородных частиц в кончике наконечника. | Проверьте наличие сухих частиц реагента в кончике наконечника и осторожно удалите их. Если мениск отсутствует, выполните этапы, указанные в разделе «Частичное заполнение для восстановления мениска» |
| Утечка жидкости из дозатора. | Обратитесь к региональному представителю службы поддержки. |
| Дозатор заблокирован, или капля не выделяется, или проверка заливки дозатора дала неудовлетворительный результат. | Исправный дозатор устроен таким образом, что попадание внутрь устройства инородных частиц (например, волокон, частиц осадка) может привести к его блокировке.<br><br>Признаком блокировки может являться более высокий, чем предполагалось, уровень реагента, сохраняющийся в дозаторе после использования в течение определенного периода времени. Также признаком блокировки является невозможность вручную выдавить жидкость из резервуара. Возможность ручного дозирования можно проверить, выполнив этапы, описанные выше в разделе «Повторная заливка дозатора».<br><br>Если присутствуют признаки блокировки (или в цилиндре дозатора, заливочной камере или наконечнике видны посторонние вещества), обратитесь к региональному представителю службы поддержки. |

## ОБРАЩЕНИЕ К РЕГИОНАЛЬНОМУ ПРЕДСТАВИТЕЛЮ СЛУЖБЫ ПОДДЕРЖКИ

Если внешний вид или функционирование дозатора не соответствуют предполагаемым, обратитесь к региональному представителю службы поддержки за рекомендациями или информацией о возврате. При этом необходимо сообщить номер партии дозатора (указанный на этикетке реагента).

## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

BENCHMARK, DISCOVERY, VENTANA и логотип VENTANA являются зарегистрированными торговыми марками компании Roche.

Все другие торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

© Ventana Medical Systems, Inc., 2011, 2014

## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755
USA
+1 520 887 2155
+1 800 227 2155 (USA)

www.ventana.com

EC REP

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

CE



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

# Дополнительная информация относительно реагентов

## Линейный дозатор
## Инструкции по подготовке к использованию, обращению и хранению

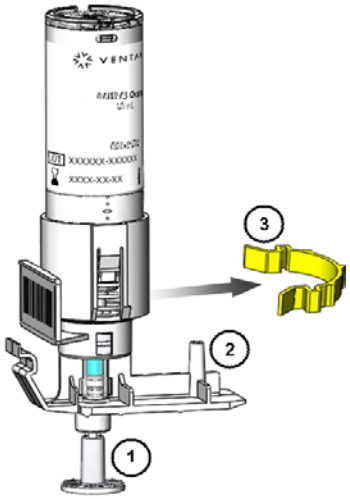
IVD

Линейный дозатор предназначен для нанесения и подачи реагентов и растворов для исследований in vitro (IVD), выполняемых на аппаратных платформах BenchMark (кроме аппарата BenchMark Special Stains), а также может использоваться на аппаратных платформах DISCOVERY. Более подробную информацию см. в соответствующем листке-вкладыше в упаковку.

Для диагностики *in vitro* (IVD).

### ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

#### Снятик колпачка наконечника и транспортного замка




1 Снимите колпачок наконечника.

2 Поместите колпачок наконечника в держатель колпачка наконечника.

В колпачке наконечника может находиться жидкость.

3 Удерживая дозатор в вертикальном положении, с каждой стороны потяните за язычок транспортного замка, чтобы отсоединить его. Утилизируйте транспортный замок.

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ.**
НЕ закрывайте кончик наконечника и не прикасайтесь к нему при выполнении дозировки реагента или заливки дозатора. Это может привести к необратимому повреждению дозатора. В процессе снятия транспортного замка НЕ нажимайте на верхнюю часть цилиндра дозатора, так как может произойти утечка реагента.

**Для ПО NexES версии 8.0 и более поздних выпусков и для Ventana System** Software (VSS)

При запуске каждого сеанса окрашивания программное обеспечение аппарата будет проверять, находится ли на карусели для реагентов новый дозатор, и автоматически заливать его резервуар, нажимая на верхнюю часть цилиндра, чтобы подать реагент в заливочную камеру.

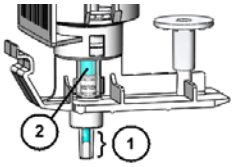
Нет необходимости в заливке дозатора вручную, так как это может привести к утечке реагента и уменьшить количество доступных к использованию доз реагента.

**Для всех версий ПО NexES *до* версии 8.0**

После снятия колпачка наконечника снимите транспортный замок и, удерживая дозатор вертикально, ЗАЛЕЙТЕ ЕГО ПУТЕМ БЫСТРОГО НАКАЧИВАНИЯ 3 ИЛИ 4 РАЗА. Заливка необходима только перед первым использованием дозатора. (См. раздел «Проверка подготовительной заливки дозатора и наконечника перед каждым использованием».)

#### Проверка подготовительной заливки дозатора и наконечника перед каждым использованием

Снимите колпачок наконечника и проверьте кончик наконечника. См. рисунок ниже.




Дозатор готов к использованию, если:

- кончик наконечника свободен от твердого мусора (1); тщательно удалите засохший реагент из кончика наконечника;
- между основанием и кончиком наконечника виден мениск реагента (1);
- в заливочной камере (2) находится жидкость; в ней могут присутствовать небольшие пузырьки.

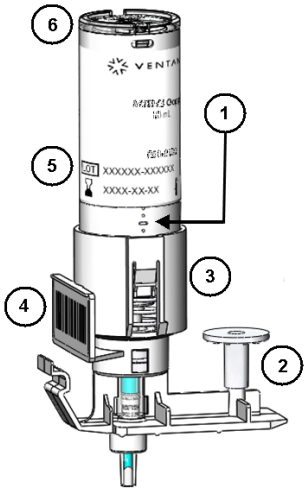
Если одно или более из данных условий не выполняются, обратитесь к разделу «Поиск и устранение неисправностей».

#### Хранение и обращение

Инструкции по хранению и использованию продукта, а также срок его годности см. в листке-вкладыше в упаковку и на этикетках дозатора.

Чтобы обеспечить надлежащую подачу и стабильность каждого реагента, после каждого использования дозатора кончик наконечника следует закрывать колпачком. Дозатор следует хранить в вертикальном положении в условиях, указанных в листке-вкладыше.

#### Характеристики дозатора




1 На цилиндр нанесены миллилитровые метки

2 Держатель колпачка наконечника

3 Соединитель

4 Этикетка со штрих-кодом и серийный номер дозатора

5 Номер партии на этикетке

6 Верхняя часть цилиндра дозатора

**ПРИМЕЧАНИЕ.** Если вручную нажать на верхнюю часть цилиндра дозатора, выделится капля реагента. См. разделы «Предостережения и меры предосторожности» и «Поиск и устранение неисправностей».

### ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики *in vitro* (IVD).
2. Перед каждым использованием дозатора проверяйте заливочную камеру и мениск. (См. раздел «Проверка подготовительной заливки дозатора и наконечника перед каждым использованием».)
3. При размещении дозатора на лотке для дозаторов держите его за соединитель, чтобы избежать случайного выдавливания реагента.
4. Надевайте колпачок на наконечник после каждого использования и храните дозатор в вертикальном положении.
5. Не дозируйте реагент вручную, если дозатор перевернут. Это приведет к потере заливки камеры, которую может оказаться невозможным восстановить.
6. Не дозируйте реагент вручную, не сняв сперва колпачок с наконечника. Это может привести к необратимому повреждению дозатора.
7. Не дозируйте реагент вручную и не заливайте дозатор перед каждым использованием. Данный этап не является необходимым и приводит к ненужному расходу реагента.
8. Не держите цилиндр в нажатом положении. При нажатии на цилиндр из дозатора может вытекать жидкость.
9. Не складывайте карусели с установленными на них дозаторами друг на друга. Это может привести к утечке жидкости из дозаторов.



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

## ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Предварительно заполняемые дозаторы VENTANA были заполнены, чтобы обеспечить достаточное количество исследований. При выполнении дозировки или заливки дозатора вручную число возможных доз для испытаний может оказаться недостаточным, что приведет к получению нежелательных результатов окрашивания.

| Проблема | Решение |
|---|---|
| Первичное заполнение дозатора не выполнено надлежащим образом (заливочная камера частично заполнена или пуста) | Повторная заливка дозатора<br><br>При правильном обращении с дозатором заливка камеры не теряется. Если необходима повторная заливка дозатора, выполните следующие действия.<br>1. Направьте кончик дозатора в контейнер для сбора отходов. Снимите колпачок с наконечника и нажмите на цилиндр (верхнюю часть дозатора). При этом должна выделиться капля жидкости.<br>2. Если капля не появилась, повторите действие 1 несколько раз до выделения капли.<br>3. Если капля выделилась, см. раздел «Проверка заливки дозатора и наконечника перед каждым использованием».<br><br>Если капля не появляется, или проверка заливки (действие 3) дала неудовлетворительный результат, или требуется повторная заливка дозатора, обратитесь к региональному представителю службы поддержки. |
| Отсутствует мениск реагента между основанием и кончиком наконечника. | Частичное заполнение для восстановления мениска<br>1. Если реагент не виден в области наконечника, медленно нажмите на цилиндр, чтобы выдавить реагент в основание и в кончик наконечника. Когда мениск будет виден, отпустите цилиндр.<br>2. Если ситуация не разрешилась, необходимо повторно залить дозатор в соответствии с этапами, указанными выше в разделе «Повторная заливка дозатора».<br><br>При повторном возникновении проблемы обратитесь к региональному представителю службы поддержки. |
| Наличие инородных частиц в кончике наконечника. | Проверьте наличие сухих частиц реагента в кончике наконечника и осторожно удалите их. Если мениск отсутствует, выполните этапы, указанные в разделе «Частичное заполнение для восстановления мениска» |
| Утечка жидкости из дозатора. | Обратитесь к региональному представителю службы поддержки. |
| Дозатор заблокирован, или капля не выделяется, или проверка заливки дозатора дала неудовлетворительный результат. | Исправный дозатор устроен таким образом, что попадание внутрь устройства инородных частиц (например, волокон, частиц осадка) может привести к его блокировке.<br><br>Признаком блокировки может являться более высокий, чем предполагалось, уровень реагента, сохраняющийся в дозаторе после использования в течение определенного периода времени. Также признаком блокировки является невозможность вручную выдавить жидкость из резервуара. Возможность ручного дозирования можно проверить, выполнив этапы, описанные выше в разделе «Повторная заливка дозатора».<br><br>Если присутствуют признаки блокировки (или в цилиндре дозатора, заливочной камере или наконечнике видны посторонние вещества), обратитесь к региональному представителю службы поддержки. |

## ОБРАЩЕНИЕ К РЕГИОНАЛЬНОМУ ПРЕДСТАВИТЕЛЮ СЛУЖБЫ ПОДДЕРЖКИ

Если внешний вид или функционирование дозатора не соответствуют предполагаемым, обратитесь к региональному представителю службы поддержки за рекомендациями или информацией о возврате. При этом необходимо сообщить номер партии дозатора (указанный на этикетке реагента).

## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

BENCHMARK, DISCOVERY, VENTANA и логотип VENTANA являются зарегистрированными торговыми марками компании Roche.

Все другие торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

© Ventana Medical Systems, Inc., 2011, 2014

## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755
USA
+1 520 887 2155
+1 800 227 2155 (USA)

www.ventana.com

EC REP

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

CE



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

2. Аналитическая специфичность (эффективность гибридизациия) зонда INFORM Chromosome 17 определялась путем окрашивания нормальных метафазных пластинок человека, и было определено, что он специфичен к к 17 хромосоме. Какой-либо перекрестной реактивности к другим человеческим хромосомам не отмечалось.
3. Внутренняя воспроизводимость исследования (окрашивания) оценивалась в общей сложности на 32 препаратах, включая образцы карциномы молочной железы человека, ранее охарактеризованные при помощи FISH. Было окрашено четыре контрольных препарата *HER2* 3-в-1 Xenograft, четыре препарата из двух положительных случаев и четыре препарата из одного отрицательного случая на аппарат (аппарат BenchMark XT и BenchMark), за одно окрашивание. Три квалифицированных эксперта оценивали препараты ISH в отношении амплификации гена *HER2* и фонового окрашивания согласно разделу Интерпретация результатов данного листка-вкладыша. В 3 случаях препараты не прошли проверку адекватности в связи со слабым окрашиванием. 29 из 32 препаратов (90,6% конкордантности) были окрашены адекватно. Все адекватно окрашенные препараты окрашивались Chromosome 17 со сходными характеристиками и с надлежащим числом хромосом. Пользователь должен проводить верификацию внутренней (в пределах исследования) воспроизводимости результатов путем окрашивания нескольких серий образцов.
4. Воспроизводимость между исследованиями и между аппаратными платформами определялись на 144 препаратах, по три исследования на двух аппаратных платформах (два прибора BenchMark® XT и два BenchMark). За каждое исследоване окрашивались три контрольных препарата HER2 3-в-1 и три препарата, каждый из которых приготовлен из трех образцов тканей карциномы молочной железы. Три квалифицированных специалиста оценивали препараты ISH в отношении генных копий хромосомы 17 и фонового окрашивания. В 3 случаях препараты не прошли проверку адекватности в связи со слабым окрашиванием. 141 из 144 препаратов были расценены как адекватные, а повторные случаи показали 97,9% конкордантность между аппаратными платформами и между несколькими исследованиями. Пользователь должен проводить верификацию воспроизводимости результатов между исследованиями (между аппаратными платформами) путем окрашивания нескольких серий проб.
5. Межлабораторная воспроизводимость. В оценке межлабораторной воспроизводимости принимали участи три лаборатории. Препараты срезов, полученные из образцов 12 случаев инвазивной карциномы молочной железы, фиксированных в нейтральном буферном растворе формалина, и шесть контрольных препаратов *HER2* 3-в-1 Xenograft подвергались окрашиванию в автоматическом аппарате для окрашивания препаратов Ventana, согласно существующему протоколу окрашивания; результаты возвращались в компанию Ventana для последующего анализа данных. Все препараты оценивались в отношении хромосомы 17. В качестве контролей использовались контрольные препараты *HER2* 3-в-1 Xenograft. В двух случаях препараты не прошли проверку адекватности в связи со слабым окрашиванием. В 10 из 12 случаях препараты были окрашены надлежащим образом. Уровень межлабораторного соответствия составил 9 из 10 (90%), причем соответствие определялось как три из трех.

## ВЫЯВЛЕНИЕ И УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ

1. Если положительный контроль дает отрицательный результат, следует убедиться, что препарат маркирован надежащей этикеткой со штрих-кодом.
2. Если положительный контроль дает отрицательный результат или окрашен слабее, чем ожидалось, следует проверить окрашивание других положительных контролей, окрашенных в том же исследовании, чтобы определить, связана ли ошибка с контрольным препаратом или используемыми реактивами.
3. Неправильно забранные, фиксированные или хранящиеся образцы могут не окрашиваться надлежащим образом. Для увеличения мощности сигнала может потребоваться увеличение времени гибридизации. Кроме того, может быть увеличено время воздействия протеазой 3 – более 8 минут, или протеазой 2 – 4 минуты или более.
4. При фоновом окрашивании препаратов, которое может влиять на оценку образцов, можно использовать ISH-протеазу 3 в течение 4 минут вместо 8 минут.
5. При недостаточном окрашивании или слабом окрашивании контрольных препаратов *HER2* 3–в-1 Xenograft окрашивание считается недействительным. Перед использованием все дозаторы подлежат проверке.
6. В том случае, если контрольные препараты *HER2* 3-в-1 Xenograft окрашены правильно, однако окрашивание препаратов пациента отсутствует или недостаточно, следует проверить правильность их фиксации. Если образцы фиксированы согласно рекомендациям, но окрашивание получилось слабым, то может быть увеличено время воздействия ISH протеазой 3 – более 8 минут, или протеазой 2 – 4 минуты или более.
7. Для коррекции ошибок следует обратиться к разделу Поэтапное описание исследования, Руководству пользователя к автоматическому аппарату для окрашивания препаратов или обратиться в местное представительство Ventana.

## ССЫЛКИ


1. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.
2. Wolff, AC, Hammond, MEH, Schwartz, JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. Arch Pathol Lab Med 2007;131: 18-43.


## ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ


Ventana, INFORM, BenchMark, *ultra*View, EZ Prep, и Liquid Coverslip являются торговыми марками члена группы Roche.

Все прочие торговые марки являются собственностью их владельцев.

Ventana предоставляет своему Покупателю лицензию США разового пользования под пат. №№ США – 6045 759, 6192 945, 6416 713, 6945 128, и 7378058, и все иностранные аналоги.


## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ


Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

Уполномоченный представитель
в Республике Беларусь:
ООО "Алмазмед"
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.

www.ventanamed.com


CE




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