

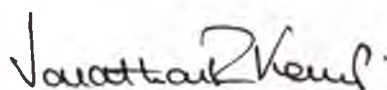


**Jonathan  
Kemp**  
NOTARY PUBLIC

BE IT KNOWN that I, JONATHAN RICHARD KEMP, of Newcastle upon Tyne, England, NOTARY PUBLIC duly admitted and sworn, authorised to practise throughout England and Wales, CERTIFY that the two documents attached and listed below were produced to me today in Newcastle upon Tyne by Victoria Reid, Head of R&D of **LEICA BIOSYSTEMS NEWCASTLE LIMITED**, a United Kingdom company existing and registered with the Registrar of Companies for England and Wales with Company no. 02163063 (the "Company"), who signed for the Company in my presence. I further certify that the signature appearing on the document as that of Rachel Osborne, appears to be that of Rachel Osborne, Senior Regulator Affairs Specialist of the Company, when compared with a signature made by Rachel Osborne before me previously:

- "A" Operational Document Statement for Leica HER2 FISH System; and
- "B" Corrected Leica HER2 FISH System – 30 Test, TA9217 EU-RU-CE.

SIGNED and SEALED with my seal of office in Newcastle upon Tyne, England, this twelfth day of May in the year two thousand and sixteen



.....  
Jonathan Richard Kemp  
Notary Public, England and Wales  
Protocol No. 2016/224.B

To the Federal Service  
on Surveillance in Healthcare  
of the Russian Federation  
(ROSZDRAVNADZOR)

May, 11 2016

## STATEMENT

Dear Sirs,

**I. Leica Biosystems Newcastle Ltd. (Balliol Business Park West, Benton Lane, Newcastle upon Tyne, NE12 8EW, UK)** in accordance with the request of ROSZDRAVNADZOR № 04-14153/16 dd 08-Apr-2016 sent to our authorized representative BioLine LLC (tax identification number 7813118690, Russia) and forwarded then to us, herewith solicits

**to supplement** the registration bid for the Leica HER2 FISH System with the updated Instruction for Use with the following information included:

**a) Warranty.**

"Leica Biosystems Newcastle Ltd guarantees that the product has been subjected to a comprehensive quality control procedure based on the Leica in-house testing standards, and that the product is faultless and complies with all technical specifications and/or agreed characteristics warranted.

The scope of the warranty is based on the content of the concluded agreement. The warranty terms of your Leica sales organization or the organization from which you have purchased the contractual product shall apply exclusively.

The manufacturer guarantees high quality of product operation during all term until expiry date under condition of storage and methodic recommendations observance".

**b) Service information.**

"To receive additional service or support please contact your local Leica distributor.

Russian Federation:

BioLine LLC

Pinsky lane 3 letter A, 197101, Saint Petersburg, the Russian Federation

E-mail: [main@bioline.ru](mailto:main@bioline.ru)

Tel: (812) 320-49-49

Fax: (812) 320-49-40

Service Hotline: 8-800-333-00-49

The product is not a subject of technical service (maintenance) and repair".

**c) Decommissioning and disposal**

"The medical product or its components must be disposed of according to existing applicable, local regulations referred to class "B" (epidemiological hazardous waste)".

II. The mentioned above information must be supplemented to the Operational documentation.

Date: 11 MAY 2016

Date: 12 MAY 2016

Signature: 

Rachel Osborne  
Senior Regulatory Affairs Specialist

Signature: 

Victoria Reid  
Head of R & D

# Leica HER2 FISH System - 30 Test

## Инструкции по использованию

Для использования на системе Leica Biosystems BOND-MAX система и BOND-III системы.

TA9217 представляет собой гибридизационный продукт для *локальной* флуоресценции, рассчитанный на окрашивание 30 исследований (30 предметных стекол, окрашенных с помощью LSI HER2/CEP17 Dual Probe).



Leica Biosystems Newcastle Ltd  
Balliol Business Park West  
Benton Lane  
Newcastle Upon Tyne NE12 8EW  
United Kingdom  
T +44 191 215 4242

Leica Biosystems Canada  
71 Four Valley Drive  
Concord, Ontario L4K 4V8  
Canada  
T +1 800 248 0123

Leica Biosystems Inc  
1700 Leider Lane  
Buffalo Grove IL 60089  
USA  
T +1 800 248 0123

Leica Biosystems Melbourne  
Pty Ltd  
495 Blackburn Road  
Mt Waverley VIC 3149  
Australia  
T +61 2 8870 3500



2016 11 MAY 2016  
w 12 MAY 2016

# Содержание

Русский

|                                                                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Использование по назначению.....                                                                                                           | 3         |
| Для диагностики <i>in vitro</i> .....                                                                                                      | 3         |
| Необходимое обучение.....                                                                                                                  | 3         |
| <b>Обзор и описание.....</b>                                                                                                               | <b>3</b>  |
| Исходная информация.....                                                                                                                   | 3         |
| Обзор клинической конкордантности BOND-MAX System.....                                                                                     | 4         |
| Обзор клинической конкордантности BOND-III System.....                                                                                     | 4         |
| Принцип процедуры.....                                                                                                                     | 4         |
| Предоставляемые компоненты.....                                                                                                            | 5         |
| Указания по использованию.....                                                                                                             | 5         |
| Хранение и стабильность.....                                                                                                               | 5         |
| Подготовка образцов.....                                                                                                                   | 5         |
| Предупреждения и предостережения.....                                                                                                      | 6         |
| <b>Процедура.....</b>                                                                                                                      | <b>6</b>  |
| A. Необходимые, но не предоставляемые реактивы.....                                                                                        | 6         |
| B. Необходимое, но не предоставляемое оборудование.....                                                                                    | 6         |
| C. Методология.....                                                                                                                        | 7         |
| D. Предварительная обработка энзимов Bond.....                                                                                             | 7         |
| E. Протокол окрашивания по умолчанию.....                                                                                                  | 7         |
| F. Этапы процедуры.....                                                                                                                    | 7         |
| G. Хранение предметных стекол.....                                                                                                         | 8         |
| Оценка и подсчет количества сигналов.....                                                                                                  | 9         |
| Рекомендуемый метод для определения соотношения LSI HER2 и CEP17.....                                                                      | 10        |
| <b>Leica HER2 FISH System - 30 Test Руководство по интерпретации результатов.....</b>                                                      | <b>11</b> |
| Ведомость подсчета.....                                                                                                                    | 12        |
| Контроль качества.....                                                                                                                     | 13        |
| <b>Ограничения.....</b>                                                                                                                    | <b>13</b> |
| A. Общие ограничения.....                                                                                                                  | 13        |
| B. Ограничения, относящиеся к продукту.....                                                                                                | 14        |
| Клиническая конкордантность Leica HER2 FISH System - 30 Test и Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Грудь.....                | 15        |
| Результаты конкордантности BOND-MAX System 2x2 - Грудь.....                                                                                | 15        |
| Результаты конкордантности BOND-III System 2x2 - Грудь.....                                                                                | 16        |
| Клиническая конкордантность Leica HER2 FISH System - 30 Test по сравнению с Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - желудок..... | 17        |
| Результаты конкордантности 2x2, BOND-MAX System - желудок.....                                                                             | 17        |
| <b>Проверка точности – BOND-MAX System.....</b>                                                                                            | <b>19</b> |
| A. Внутрисерийная проверка точности.....                                                                                                   | 19        |
| B. Внутринструментальная проверка точности.....                                                                                            | 19        |
| C. Межсерийная проверка точности.....                                                                                                      | 19        |
| D. Межлабораторная проверка точности.....                                                                                                  | 19        |
| E. Межнаблюдательная проверка точности.....                                                                                                | 19        |
| F. Проверка точности от партии к партии.....                                                                                               | 20        |
| <b>Проверка точности – BOND-III System.....</b>                                                                                            | <b>20</b> |
| G. Внутрисерийная проверка точности.....                                                                                                   | 20        |
| H. Внутринструментальная проверка точности.....                                                                                            | 20        |
| I. Межсерийная проверка точности.....                                                                                                      | 20        |
| J. Межлабораторная проверка точности.....                                                                                                  | 20        |
| K. Межнаблюдательная проверка точности.....                                                                                                | 20        |
| L. Проверка точности от партии к партии.....                                                                                               | 21        |
| <b>Надежность анализа.....</b>                                                                                                             | <b>21</b> |
| <b>Поиск и устранение неисправностей.....</b>                                                                                              | <b>23</b> |
| <b>Справочный материал.....</b>                                                                                                            | <b>25</b> |
| <b>Лицензионное соглашение.....</b>                                                                                                        | <b>26</b> |



## Использование по назначению

### Для диагностики *in vitro*

Leica HER2 FISH System - 30 Test предназначен для определения усиления гена HER2/neu через флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) пропитанных парафином фиксированных формалином колоний клеток рака груди и аденокарцином желудка (включая гастроэзофагеальный переход). Leica HER2 FISH System - 30 Test показан при оценке состояния пациентов, для которых рассматривается лечение препаратом Herceptin® (trastuzumab) (см. рекламный вкладыш о Herceptin в упаковке). Leica HER2 FISH System - 30 Test не предназначен для диагностики рака груди. Следует учитывать и прочую доступную клиническую информацию, такую как размер опухоли, количество затронутых лимфоузлов и состояние стероидных рецепторов. Ни одно решение о лечении пациентов с раком груди не должно основываться только на состоянии усиления гена HER2.

Примечание: все пациенты, на которых испытывается Herceptin, были выбраны с использованием исследовательского иммуноцитохимического анализа для клинических исследований (CTA). Ни один из пациентов в рамках этих исследований не был выбран с помощью Leica HER2 FISH System - 30 Test. Leica HER2 FISH System - 30 Test сравнивался с Abbott Molecular PathVysion® HER-2 для взятия проб ДНК на независимом наборе образцов и дал приемлемо конкордантные результаты, как показано в Обзоре клинической конкордантности. Фактическая корреляция результатов Leica HER2 FISH System - 30 Test к клиническому результату не установлена.

Все пациенты, участвующие в клиническом исследовании Herceptin на поздней стадии рака желудка (ToGA), были отобраны с помощью теста HercepTest компании Dako. Ни один из пациентов не был отобран для этого исследования с помощью системы Leica HER2 FISH - 30 Test. Система Leica HER2 FISH - 30 Test сравнивалась с Abbott Molecular PathVysion® HER-2 DNA Probe Kit на независимом наборе образцов и дала приемлемо конкордантные результаты, как показано в Обзоре клинической конкордантности. Фактическая корреляция результатов системы Leica HER2 FISH - 30 Test к клиническому результату не установлена.

\* Herceptin® – зарегистрированная торговая марка Genentech, Inc. и F. Hoffmann-La Roche Ltd. PathVysion® – зарегистрированная торговая марка компании Abbott Molecular Inc. Все права защищены. Используется по лицензии.

### Необходимое обучение

Leica Biosystems предоставит обучение по подготовке образцов, процедуре анализа и интерпретации результатов FISH-исследований гена HER2 для всех пользователей.

## Обзор и описание

### Исходная информация

Ген HER2, известный еще как neu или c-erbB2, расположен на длинном плече 17-й хромосомы в положении 17q11-12 (1). И ген HER2, и его кодированный белок 185 kD продемонстрировали, что играют важную роль в злокачественном преобразовании и прогрессии раковой опухоли в груди (2).

HER2 служит прогностическим признаком, при этом усиление гена и чрезмерная выраженность белка связываются с повышенной частотой рецидивов болезни и ростом смертности. HER2 также служит прогностическим признаком для выбранной соматической химиотерапии и запланированного лечения (3). Говоря конкретно, усиление гена HER2 показало себя индикатором плохого прогноза рака груди с поражением лимфатических узлов (4-8). Кроме того, одно исследование показывает более сильное прогностическое значение HER2 у пациентов, проходящих курсы химиотерапии (7). Однако при прогнозировании общей выживаемости у отдельных пациентов необходимо учитывать и другие прогнозирующие факторы – размер опухоли, количество положительных лимфоузлов и состояние стероидных рецепторов.

Чрезмерная выраженность онкогенного белка HER2 в результате усиления гена, обнаруженного в клетках рака груди, в качестве терапии на основе антител предполагает HER2 (3) - в то время как результаты исследований на поздней стадии рака желудка (ToGA испытание) со всей очевидностью показывают, что использование Герцептина® при раке желудка наряду с химиотерапией является эффективным методом лечения, улучшающим общую выживаемость при HER2-положительном раке желудка (9).



Herceptin (trastuzumab), очеловеченное моноклональное антитело (10), тесно связанное с онкогенным белком HER2 и тормозящее разрастание человеческих опухолевых клеток, дающих чрезмерную выраженность онкогенного белка HER2 как *in vitro*, так и *in vivo* (11-13). С момента разработки Herceptin обнаружение гена HER2 и белка стали необходимыми инструментами оценки грудных опухолей, определяющими и выбор терапии, и последующую работу с пациентом (14,15).

И в межфазных, и в метафазных клетках, полученных из колоний клеток карциномы груди, для демонстрации усиления гена HER2 используется метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) (16-19). Для измерения усиления гена HER2 метод FISH оценивает уровень усиления гена HER2 прямо в клетках опухоли. Характерная морфология ткани и пространственное распределение онкогенных копий в отдельных некультивируемых первичных карциномах груди сохраняются. В грудных опухолях также часто встречаются aberrации в 17-й хромосоме по количеству копий гена (аневсомия). Они могут быть в виде пропущения (делеции) или увеличения хромосом (полисомия). Эти хромосомные изменения решающим образом влияют на интерпретацию состояния усиления гена HER2. Поэтому крайне важным становится измерение количества копий 17-й хромосомы в увязке с HER2 (4).

Leica HER2 FISH System - 30 Test содержит ДНК-зонд (меченый изотопом фрагмент ДНК) LSI HER2, непосредственно маркируемый флуоресцентный ДНК-зонд 226 Kb SpectrumOrange™, специфичный для местоположения гена HER2 (17q11.2-q12) и ДНК-зонд CEP17, непосредственно маркируемый флуоресцентный ДНК-зонд 5.4 Kb SpectrumGreen™, специфичный для альфа-сателлитной последовательности ДНК в кинетохорной области 17-й хромосомы (17p11.1-q11.1). Зондовый метод был специально разработан и одобрен для использования в системе BOND-MAX система и BOND-III системы и его не следует модифицировать или использовать в ручной настройке.

### Обзор клинической конкордантности BOND-MAX System

Leica HER2 FISH System - 30 Test был разработан для обеспечения полностью автоматизированной альтернативы действующим методам, используемым для определения состояния усиления гена HER2. Поведение Leica HER2 FISH System - 30 Test на BOND-MAX System было оценено в независимом исследовании, где сравнивались результаты Leica HER2 FISH System - 30 Test с Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit Assay на 300 образцах грудной опухоли и 109 образцах аденокарцином желудка (включая гастроэзофагеальный переход). Ни один из этих образцов не был получен от пациентов в рамках клинических исследований Herceptin. Результаты на образцах грудной опухоли показали конкордантность 99,33 % в анализе 2x2 (95% доверительные интервалы 97,61–99,92%). Результаты на образцах аденокарцином желудка (включая гастроэзофагеальный переход) показали конкордантность 98,17% в анализе 2x2 (95% доверительные интервалы 93,53–99,78%). Конкордантность также показывает, что положительный результат в Leica HER2 FISH System - 30 Test с высокой вероятностью соответствует положительному результату в анализе Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Leica HER2 FISH System - 30 Test интерпретируется как отрицательный результат по усилению гена HER2 при коэффициенте гена HER2:CEP17 меньше 2.0, и как положительный при коэффициенте гена HER2:CEP17 больше либо равном 2.0. Неопределенный (пограничный) результат получается при коэффициенте усиления гена HER2:CEP17 1.8–2.2, интерпретация здесь должна быть осторожной. Добавьте еще 20 ядер и пересчитайте коэффициент.

### Обзор клинической конкордантности BOND-III System

Leica HER2 FISH System - 30 Test был разработан для обеспечения полностью автоматизированной альтернативы действующим методам, используемым для определения состояния усиления гена HER2. Поведение Leica HER2 FISH System - 30 Test на BOND-III System было оценено в независимом исследовании, где сравнивались результаты Leica HER2 FISH System - 30 Test с анализом Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit на 300 образцах грудной опухоли. Ни один из этих образцов не был получен от пациентов в рамках клинических исследований Herceptin. Результаты показали конкордантность 99,67% в анализе 2x2 (доверительные интервалы 95% из 98,16–99,99%). Конкордантность также показывает, что положительный результат в Leica HER2 FISH System - 30 Test с высокой вероятностью соответствует положительному результату в анализе Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. Leica HER2 FISH



System - 30 Test интерпретируется как отрицательный результат по усилению гена HER2 при коэффициенте гена HER2:CEP17 меньше 2.0, и как положительный при коэффициенте гена HER2:CEP17 больше либо равном 2.0. Неопределенный (пограничный) результат получается при коэффициенте усиления гена HER2:CEP17 1.8–2.2, интерпретация здесь должна быть осторожной. Добавьте еще 20 ядер и пересчитайте коэффициент.

### Принцип процедуры

Leica HER2 FISH System - 30 Test содержит компоненты, необходимые для выполнения флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) на основе окрашивания тканей, фиксированных формалином и пропитанных парафином. После соответствующей предварительной обработки, инкубации в готовом LSI HER2/CEP17 Dual Probe и достаточно тщательной промывки секции ткани обезживаются и располагаются на предметных стеклах с помощью DAPI. Результаты интерпретируются путем флуоресцентной микроскопии с помощью рекомендуемых фильтров при подходящих длинах волн.

Leica HER2 FISH System - 30 Test предназначен только для использования на системе Leica Biosystems BOND-MAX система и BOND-III системы.

### Предоставляемые компоненты

Перечисленных ниже материалов (Таблица 1) достаточно для окрашивания 30 исследований (30 предметных стекол, окрашенных с помощью LSI HER2/CEP17 Dual Probe).

|                                   |                                                                                             |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| LSI HER2/CEP17 Probe<br>6,6 mL    | Содержит готовый LSI HER2/CEP17 Dual Probe.<br>Содержит <60% (v/v) формамида.               |
| Post Hybridization Wash 2<br>9 mL | Содержит готовый раствор для промывки после гибридизации.<br>Содержит <50% (v/v) формамида. |
| BOND Enzyme Concentrate 2<br>1 mL | Содержит раствор протеиназы K (1,7 mg/mL).                                                  |
| BOND Enzyme Diluent<br>65 mL      | Содержит энзимный разжижитель.                                                              |
| BOND Open Container<br>3 x 7 mL   | BOND Open Container используемый для Enzyme 5.                                              |

Таблица 1: Leica HER2 FISH System - 30 Test Компоненты

Более подробную информацию о безопасности продуктов см. в отдельных паспортах безопасности веществ на сайте [www.LeicaBiosystems.com/TA9217-IFU](http://www.LeicaBiosystems.com/TA9217-IFU)

### Указания по использованию

Все предоставленные реактивы предназначены специально для использования с этим анализом, и номера партий специфичны для каждого Leica HER2 FISH System - 30 Test. Чтобы анализ прошел валидацию, не следует производить никаких замен.

### Хранение и стабильность

Хранить при 2–8 °C. Не замораживать. Сразу после использования вернуть в помещение с температурой 2–8 °C. Любое отклонение от этих условий отменяет валидацию анализа. Убедитесь, что срок годности используемого Leica HER2 FISH System - 30 Test еще не истек. Признаками загрязнения и/или нестабильности Leica HER2 FISH System - 30 Test являются мутность растворов (кроме пробного раствора) и появление запаха. Пользователь должен проверять условия хранения, если они отличаются от указанных выше.

## Подготовка образцов

Для всех образцов следует использовать стандартные методы обработки тканей (20). Рекомендуется подготавливать ткани в фиксажах на основе формалина, стандартно обрабатывать и пропитывать парафином. Например, образцы следует отбирать при толщине 3–4 мм и фиксировать в течение 18–24 часов в 10% нейтрально-буферизованном формалине. Затем ткани следует обезживать в серии спиртов и делать прозрачными с помощью ксилена, после чего пропитывать расплавленным парафином при температуре не более 60 °C. Образцы ткани следует делить на секции через 4–6  $\mu\text{m}$ .

Секции ткани, расположенные на загруженных предметных стеклах (BOND Plus Slides S21.2113) перед окрашиванием можно хранить до 12 месяцев при 2–8 °C. После деления на секции рекомендуется инкубировать предметные стекла в течение 1 часа при 60 °C. Окрашенные секции следует хранить при –20 °C для сохранения флуоресцентного сигнала и предотвращения обесцвечивания. Перед считыванием дайте предметным стеклам нагреться до комнатной температуры.

## Предупреждения и предостережения

*Только для профессиональных пользователей.*

Один или несколько компонентов в продукте опасны и могут нанести вред неродившемуся ребенку.

Как правило, лица моложе 18 лет не допускаются к работе с этим продуктом. Пользователи должны быть тщательно проинструктированы о порядке работы, опасных свойствах продукта и правилах техники безопасности.

С образцами, до и после фиксации, и всеми контактирующими с ними материалами следует обращаться как с разносчиками инфекции и утилизировать их с должной предосторожностью.

Никогда не пипетируйте реактивы ртом и избегайте попадания реактивов и образцов на кожу и слизистую оболочку. При попадании реактивов и образцов на чувствительные области обильно промойте их водой. Обратитесь за медицинской помощью. По утилизации любых потенциально токсичных компонентов см. федеральные и региональные правила.

Минимизируйте микробное заражение реактивов, в противном случае может увеличиться неспецифическое окрашивание.

## Процедура

### A. Необходимые, но не предоставляемые реактивы

- BOND Dewax Solution (AR9222)
- BOND Epitope Retrieval Solution 1 (AR9961)
- BOND Wash Solution, Concentrate x10 (AR9590)
- Стандартные растворители, используемые в анализах на основе флуоресцентной гибридизации *in situ* (например, этанол, абсолютный и сортовой)
- Дистиллированная или деионизированная вода
- DAPI Контрокрасивание
- Leica HER2 FISH Control Slides (TA9123)
- BOND Aspiring Probe Cleaning System (CS9100)

### B. Необходимое, но не предоставляемое оборудование

- Пипетки (способные измерять объемы 1–20  $\mu\text{l}$  и 100–1000  $\mu\text{l}$ )
- Заряженные предметные стекла (BOND Plus Slides – код продукта S21.2113)
- BOND-MAX (21.0051) или BOND-III (21.2201)
- BOND Universal Covertiles™ (S21.2001, S21.4583 или S21.4611)
- BOND Mixing Stations (S21.1971)
- BOND Slide Label & Print Ribbon (S21.4564)
- Покровные стекла
- Сушильная печь (способная поддерживать температуру 60 °C)
- Флуоресцентный микроскоп (с объективом 60–100x) с соответствующим источником света. Регистрируйте количество часов работы лампочки и заменяйте ее до выработки ресурса. Следите за правильностью положения лампы.

- Набор флуоресцентных фильтров (SpectrumOrange™ – пик возбуждения при 559 nm, пик испускания при 588 nm, SpectrumGreen™ – пик возбуждения при 497 nm, пик испускания при 524 nm и DAPI – пик возбуждения при 367 nm, пик испускания при 452 nm). Для большинства моделей флуоресцентных микроскопов предлагаются наборы широкополосных фильтров, оптимизированных для использования с Leica HER2 FISH System - 30 Test. Для Leica HER2 FISH System - 30 Test рекомендуются DAPI/9-оранжевый с двумя полосами пропускания, DAPI/зеленый с двумя полосами пропускания, зеленый/оранжевый (V.2) с двумя полосами пропускания и DAPI/зеленый/оранжевый (V.2) с тремя полосами пропускания.

### С. Методология

- Перед применением этой методологии пользователи должны быть должным образом обучены технологии автоматизированной флуоресцентной гибридизации *in situ*.
- Каждая секция ткани, окрашенная с помощью LSI HER2/CEP17 Dual Probe, позволяет провести одинаковый клеточный анализ и HER2, и сигналов кинетохорной области 17-й хромосомы. Последующее отношение HER2 к сигналам 17-й хромосомы позволит присвоить образцу количественное значение, показывая отрицательный (без усиления) или положительный (с усилением) результат. Неопределенные (пограничные) результаты (1.8–2.2) следует интерпретировать с осторожностью. Добавьте еще 20 ядер и пересчитайте коэффициент.

### Д. Предварительная обработка энзимов BOND

Перед окрашиванием разбавьте имеющийся BOND Enzyme Concentrate 2 в соотношении 1:300 с использованием BOND Enzyme Diluent в одной из прилагаемых открытых емкостей BOND. Например, для окрашивания 10 предметных стекол подготовьте 3 mL рабочего энзимного раствора, разбавив 10 µl BOND Enzyme Concentrate 2 в 2990 µl BOND Enzyme Diluent. Рекомендуется готовить энзимный раствор непосредственно перед каждой серией окрашивания и использовать не менее 900 µl на каждое окрашивание.

### Е. Протокол окрашивания по умолчанию

Рекомендуется использовать Leica HER2 FISH System - 30 Test с рекомендуемым протоколом окрашивания по умолчанию, см. Таблицу 2 внизу.

| Тип протокола   | Название протокола        |
|-----------------|---------------------------|
| Окрашивание     | *FISH Protocol A          |
| Подготовка      | *Dewax (Депарафинизация)  |
| HIER            | *HIER 25 мин с ER1 (97)   |
| Энзим           | *Enzyme 5 for 25 min      |
| Денатурирование | *D10                      |
| Гибридизация    | *ISH Hybridization (12Hr) |

Таблица 2: Протокол окрашивания по умолчанию Leica HER2 FISH - 30 Test Staining Protocol

### Ф. Этапы процедуры

Данные инструкции необходимо изучать вместе с Руководством по системе BOND-MAX система и BOND-III системы. С каждым предметным стеклом следует использовать новый BOND Universal Covertile™.

Применение BOND Universal Covertile™, ранее использовавшихся для иммуногистохимического или гибридизационного окрашивания *in situ*, по результатам этого исследования не прошло валидацию.

1. На системе BOND-MAX система и BOND-III системы проверьте, достаточно ли вместительны емкости для сыпучих и опасных отходов для выполнения необходимых серий окрашивания.
2. Убедитесь в наличии подходящего спирта, дистиллированной или деионизированной воды, BOND Dewax Solution, BOND Epitope Retrieval Solution 1 и BOND Wash Solution в емкостях для реактивов для выполнения окрашивания.
3. Убедитесь, что установлена чистая BOND Mixing Station.
4. Включите систему BOND-MAX система и BOND-III системы.

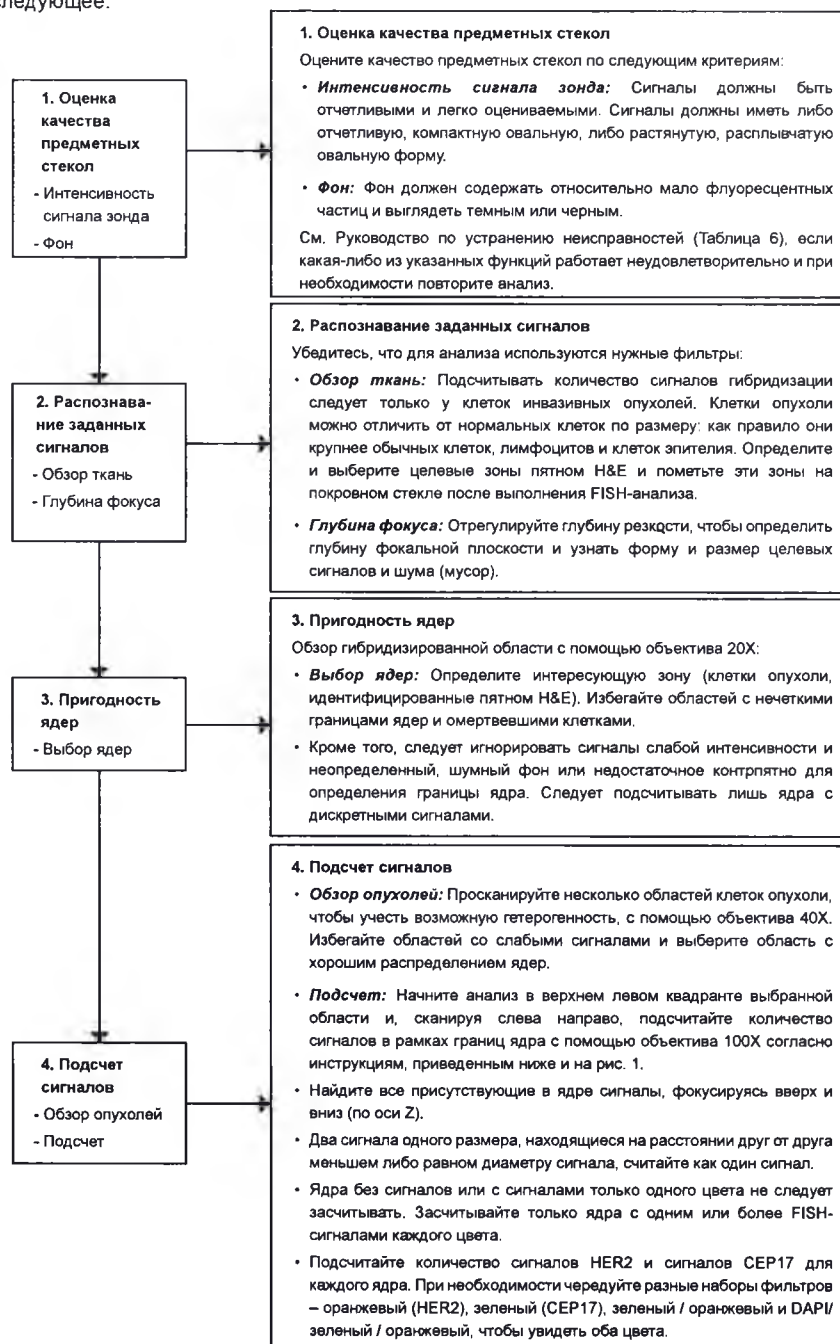
5. Включите ПК, подключенный к BOND-MAX система и BOND-III системы.
6. Откройте программу BOND программное обеспечение.
7. У нового комплекта Leica HER2 FISH System - 30 Test просканируйте штрихкод лотка с реактивами ручным сканером, чтобы войти в каталог реактивов BOND (только один штрихкод).
8. Подготовьте BOND Enzyme 5 в прилагаемой открытой емкости BOND сразбавлением 1:300. Например, для 10 предметных стекол налейте 10 µl Leica BOND Enzyme Concentrate 2 на 2990 µl BOND Enzyme Diluent.
9. Просканируйте прилагаемую открытую емкость BOND и зарегистрируйте как Bond Enzyme 5.
10. Перейдите в окно настроек предметного стекла и щелкните на Add case (Добавить пациента).
11. Введите данные для первого пациента. Убедитесь, что объем раздачи установлен на 150 µl, а протокол подготовки – на \*Dewax (Депарафинизация). Щелкните на OK.
12. Когда пациент выделится в окне настроек предметного стекла, щелкните Add slide (Добавить предметное стекло).
13. Сначала добавьте исследуемые предметные стекла пациента. Убедитесь, что тип ткани установлен на Test tissue (Исследуемая ткань).
14. Выберите режим окрашивания Single (Одиночный).
15. Выберите процесс ISH.
16. В списке проб выберите \*LSI HER2/CEP17 Dual Probe – 30Test. На вкладке «Протоколы» (Protocols) по умолчанию будет значиться правильный протокол окрашивания (\*FISH ProtocolA), протокол HIER(\*HIER25minwithER1(97)), протокол EIER(\*Enzyme5for25min), денатурирование (\*D10) и гибридизация (\*ISH Hybridization (12Hr)).
17. Повторяйте шаги 10–16, пока не будут созданы исследуемые предметные стекла пациента и средства контроля (контрольные предметные стекла Leica HER2 FISH и/или внутрилабораторные средства контроля). Распечатайте наклейки для предметных стекол.
18. Наклейте наклейки на предметные стекла.
19. Откройте крышки всех емкостей Leica HER2 FISH System - 30 Test и загрузите лоток с реактивом в систему BOND-MAX и BOND-III.
20. На каждое предметное стекло положите новые Covertiles.
21. Загрузите контейнер с предметными стеклами в систему BOND-MAX и BOND-III и нажмите кнопку Load/Unload (Загрузка/разгрузка).
22. Убедитесь, что предметные стекла просканированы и щелкните на кнопке Run (Play) (Серия) в окне System status (Состояние системы), чтобы немедленно начать окрашивание (для Leica HER2 FISH System - 30 Test рекомендуется проводить этот анализ в течение ночи с использованием функции отложенного запуска).
23. Убедитесь, что в поле индикатора контейнера отображается Proc (OK), номер партии и время завершения.
24. По окончании серии нажмите кнопку Load/Unload (Загрузка/разгрузка) и выньте контейнер с предметными стеклами из BOND-MAX система и BOND-III системы.
25. Снимите Covertiles и промойте предметные стекла в деионизированной воде.
26. Быстро обезвожьте двумя сменами спирта, просушите воздухом.
27. Нанесите 20 µl DAPI прямо на образец.
28. Положите покровное стекло и дайте раствору полностью распределиться, удалите все пузырьки воздуха.
29. Обмажьте края покровного стекла лаком для ногтей или аналогичным герметиком.
30. Положите предметные стекла в темное место, чтобы обеспечить формирование сигнала перед просмотром под флуоресцентным микроскопом.
31. Для сохранения интенсивности сигнала храните окрашенные предметные стекла при –20 °C.

#### G. Хранение предметных стекол

Храните окрашенные предметные стекла при –20 °C в темном месте. Разрешить слайды до комнатной температуры до просмотра после извлечения из –20 °C.

## Оценка и подсчет количества сигналов

Для оценки качества сигналов и подсчет количества сигналов HER2 и CEP17 проделайте следующее:



### Рекомендуемый метод для определения соотношения LSI HER2 и CEP17

Для определения соотношения LSI HER2 и CEP17 используйте следующий метод:

1. Зафиксируйте и определите количество сигналов LSI HER2 и CEP17 в 20 ядрах (см. рис. 2 «Подсчет сигналов Leica HER2 FISH System - 30 Test» внизу).
2. Суммируйте все сигналы LSI HER2. Это будет сумма сигналов LSI HER2 для подсчета, например, 143.
3. Суммируйте все сигналы CEP17. Это будет сумма сигналов CEP17 для подсчета, например, 48.
4. Для вычисления окончательного результата используйте следующую формулу: сумму сигналов LSI HER2 разделить на сумму сигналов CEP17, например,  $143/48$  дает отношение 2.98 – положительное для усиления HER2.

**Важное замечание:** если отношение LSI HER2 к CEP17 неопределенное (1.80–2.20), то добавьте еще 20 ядер и пересчитайте соотношение.

Результаты должны интерпретироваться следующим образом:

1. Если соотношение  $<2$ , то усиление гена HER2 не наблюдалось
2. Если соотношение  $\geq 2$ , то усиление гена HER2 наблюдалось

**Важное замечание:** соотношение, близкое к значению отсечки (1.80–2.20) должно интерпретироваться с осторожностью, как описано выше.

## Leica HER2 FISH System - 30 Test Руководство по интерпретации результатов

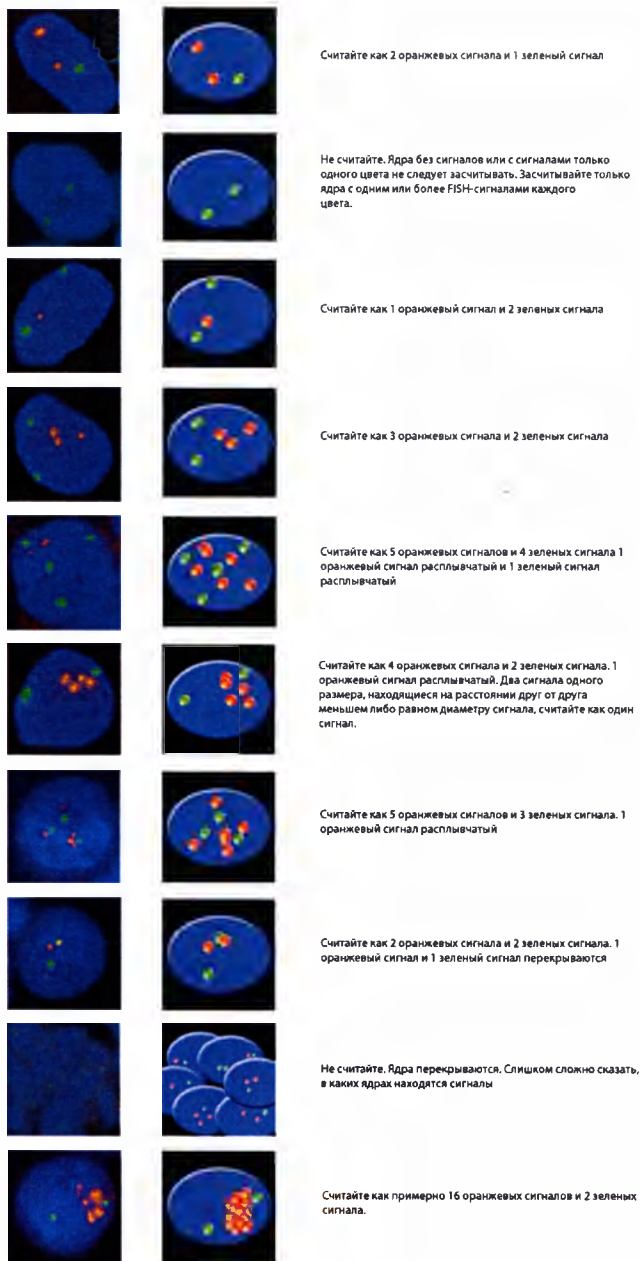


Рисунок 1: Руководство по интерпретации результатов

Leica HER2 FISH System - 30 Test Ведомость подсчета

Русский

| 20 ядер, подсчет сигналов |                  |                   |             |                  |                   |
|---------------------------|------------------|-------------------|-------------|------------------|-------------------|
| Ядро №                    | HER2 Номер копии | CEP17 Номер копии | Ядро №      | HER2 Номер копии | CEP17 Номер копии |
| 1                         |                  |                   | 11          |                  |                   |
| 2                         |                  |                   | 12          |                  |                   |
| 3                         |                  |                   | 13          |                  |                   |
| 4                         |                  |                   | 14          |                  |                   |
| 5                         |                  |                   | 15          |                  |                   |
| 6                         |                  |                   | 16          |                  |                   |
| 7                         |                  |                   | 17          |                  |                   |
| 8                         |                  |                   | 18          |                  |                   |
| 9                         |                  |                   | 19          |                  |                   |
| 10                        |                  |                   | 20          |                  |                   |
| Всего 1-10                |                  |                   | Всего 11-20 |                  |                   |

|                          | HER2 | CEP17 | HER2:CEP17 коэффициент усиления |
|--------------------------|------|-------|---------------------------------|
| Общий счет 1-20          |      |       |                                 |
| В среднем на одну клетку |      |       |                                 |

Рисунок 2: Пример ведомости подсчета



## Автоматизированный способ Ariol для оценки HER2 FISH

Использование приложения Ariol PathVysion для цифровой оценки в качестве вспомогательного способа интерпретации результатов было независимым образом подтверждено на различных группах образцов для использования с системой Leica HER2 FISH. Приложение Ariol PathVysion® для цифровой оценки при использовании вместе с системой Leica HER2 FISH применяется для диагностики в лабораторных условиях. При работе с системой Leica HER2 FISH приложение Ariol PathVysion должно быть откалибровано для использования с предметными стеклами с образцами тканей, а не с предметными стеклами Leica HER2 FISH (TA9123).

**Любые решения в отношении диагностики должны приниматься квалифицированным врачом-консультантом.**

Дополнительную информацию см. в руководстве оператора Ariol.

## Контроль качества

### Использование контрольных предметных стекол

Рекомендуется включать по одному Leica HER2 FISH Control Slides в каждую исследуемую серию для контроля характеристик анализируемых образцов и оценки точности подсчета сигналов. Контрольные предметные стекла должны включаться в каждую серию окрашивания на BOND-MAX система и BOND-III системы и в каждую новую партию реактива. Кроме того, пользователи вправе использовать для контроля собственный материал.

Оценивать качество контрольного предметного стекла и выполнять подсчет количества сигналов следует согласно инструкциям в разделе «Оценка и подсчет количества сигналов». Критерии качества предметных стекол должны быть удовлетворены, а соотношение HER2:CEP17 должно находиться в установленных пределах. Критерии качества Leica HER2 FISH Control Slides см. в Таблице 3.

| Колонияклеток | Bond Oracle<br>HER2IHCSystem<br>Профиль | HER2Рецептор-<br>ная нагрузка<br>на каждую<br>клетку* | Leica HER2 FISH System - 30 Test<br>HER2:CEP17 Критерии приемки |
|---------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| SKBr-3        | 3+                                      | 4,3 x 10 <sup>5</sup>                                 | HER2 наблюдается усиление                                       |
| MDA-MB-453    | 2+                                      | 1,4 x 10 <sup>5</sup>                                 | HER2/ ген CEP17 должно быть 1,5–2,5                             |
| MDA-MB-175    | 1+                                      | 6,3 x 10 <sup>4</sup>                                 | HER2 усиление не наблюдается                                    |
| MDA-MB-231    | 0                                       | 9,3 x 10 <sup>3</sup>                                 | HER2 усиление не наблюдается                                    |

\*Рецепторная нагрузка HER2 анализируется путем проточной цитометрии.

Таблица 3: Интерпретация Leica HER2 FISH Control Slide.

Если средства контроля анализа дают сбой, то результаты FISH-гибридизации для этого случая не нужно засчитывать. Если контрольные предметные стекла не удовлетворят критериям качества, то Leica HER2 FISH System - 30 Test может повести себя неадекватным образом. В этом случае потребуется повторное исследование со свежими контрольными предметными стеклами и предметными стеклами с образцами пациентов. Если результаты окажутся за пределами указанного диапазона, но контрольные предметные стекла удовлетворяют критериям качества, то может быть целесообразным повторный скрининг того же предметного стекла, так как возможен сбой при подсчете количества. В случае сбоя гибридации, как с образцом, так и с контрольными предметными стеклами, см. Руководство по устранению неисправностей (Таблица 6).

Для клинических образцов, когда интерпретация сигнала гибридации затруднена и для повторного анализа имеется недостаточно образцов, исследование является неинформативным. Если для анализа недостаточно клеток, исследование является неинформативным.

Образцы ткани пациентов должны контролироваться согласно стандартным лабораторным процедурам. Качество сигналов и результаты подсчета нужно документировать в соответствующей отчетности.

## Ограничения

### А. Общие ограничения

FISH – это технология, требующая специального обучения по всем аспектам процедуры (включая выбор реактивов, ткани, фиксацию, обработку и подготовки предметных стекол) и интерпретации. Окрашивание ткани зависит от фиксации и обработки ткани перед окрашиванием. Неправильная фиксация, замораживание, оттаивание, промывание, сушка, нагрев, секционирование или загрязнение другими тканями или жидкостями может привести к морфологическим артефактам, разложению нуклеиновой кислоты, фоновому свечению или ложным отрицательным результатам. Причиной искажения результатов могут быть изменения в методах фиксации и заливки тканей или собственные аномалии в ткани (21). Избыточное или неполное контрокрашивание также может помешать правильно интерпретировать результаты.

Неспецифическое окрашивание из-за несвязанного зонда имеет разрозненный, зернистый вид и его можно наблюдать в ожидаемом месте гибридизации или на расстоянии от него. Для интерпретации результатов окрашивания используйте неповрежденные клетки. Омертвевшие или дегенерированные клетки могут окрашиваться неспецифично (22). Неожидаемое FISH-окрашивание и изменения в окрашивании могут быть результатом изменений выраженности кодирующих генов или антигенов. Любое изменение ожидаемых рисунков окрашивания следует интерпретировать в увязке со всеми остальными диагностическими исследованиями. Интерпретация окрашивания должна дополняться морфологическими исследованиями и использованием подходящего контрольного материала, и должна оцениваться квалифицированным патологом в контексте истории болезни пациента и других диагностических исследований.

Анализ (т.е. оценка адекватности средств контроля) и интерпретация любого иммуногистохимического окрашивания или его отсутствия должны выполняться в лаборатории, аккредитованной / лицензированной в установленном порядке, под наблюдением имеющего соответствующую квалификацию и опыт патолога, отвечающего за всю оценку анализа гибридизации *in situ* и его интерпретацию. Ложные положительные результаты в FISH могут стать результатом перекрестной реактивности зонда по отношению к другим последовательностям нуклеиновых кислот и/или неспецифического связывания. Необходимо практиковать и документировать подходящие средства контроля, а в исследованиях должны учитываться все сроки годности.

Технические и интерпретационные изменения можно также увидеть при использовании FISH на материалах, извлеченных из колонии клеток (23).

### В. Ограничения, относящиеся к продукту

Данный продукт не предназначен для использования ни в каком другом диагностическом анализе на базе ДНК.

Не заменяйте реактивы Leica HER2 FISH System - 30 Test другими компонентами, поставляемыми Leica Biosystems или другими изготовителями. В случае замены валидация анализа отменяется. Пользователь обязан валидировать любое отклонение от рекомендуемых процедур.

Рекомендуется использовать для анализа ткани, фиксируемые только в фиксационных растворах формалина. Использование любых других типов фиксажа отменяет валидацию анализа.

Секции ткани с толщиной среза, выходящей за пределы рекомендуемого диапазона, не прошли валидацию. Использование ткани с недопустимой толщиной среза отменяет валидацию анализа.

## Клиническая конкордантность Leica HER2 FISH System - 30 Test к Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - Грудь

В данном исследовании изучалась пригодность Leica HER2 FISH System - 30 Test к использованию при определении лечения препаратом Herceptin (trastuzumab). Целью исследования было изучить конкордантность между Leica HER2 FISH System - 30 Test и диагностическим прибором Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, считающимся «золотым стандартом» для этого анализа тканей молочной железы. Испытание считалось успешным, если нижняя граница 95%-го одностороннего доверительного интервала превышала 90% между Leica HER2 FISH System - 30 Test и ручным Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, между положительным (усиление) и отрицательным (без усиления) случаями у фиксированных формалином и пропитанных парафином (FFPE) тканей инвазивной карциномы груди.

Исследование проводилось в трех лабораториях, с замаскированной оценкой клинических образцов инвазивной карциномы груди. В каждую из лабораторий были предоставлены архивированные фиксированные формалином и пропитанные парафином блоки ткани инвазивной карциномы груди с известной выраженностью онкогенного белка HER2. Была выбрана и равномерно распределена в каждой лаборатории когорта из 300 образцов, из них 75 ранее охарактеризованных иммуногистохимических случаев на 0/1+, 150 ранее охарактеризованных иммуногистохимических случаев на 2+ и 75 ранее охарактеризованных иммуногистохимических случаев на 3+.

Все экзemplяры были окрашены с помощью ручного анализа Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit в соответствии с инструкциями изготовителя, указанными на буклете в упаковке. Затем последовательные секции из каждого случая были окрашены с помощью Leica HER2 FISH System - 30 Test в системе BOND-MAX система и BOND-III системы.

Все окрашенные предметные стекла были замаскированы и оценены в случайном порядке одним обученным наблюдателем в каждой из трех лабораторий. Результаты интерпретировались как отрицательные с вычисленным соотношением генов HER2/CEP17 <2.0 и как положительные с вычисленным соотношением генов HER2/CEP17 ≥2.0. Затем был выполнен анализ данных на конкордантность, положительное окрашивание и отрицательное окрашивание.

## Результаты конкордантности 2х2 BOND-MAX System - Грудь

Данные были сгруппированы как отрицательные (<2.00) или положительные (≥2.00) для анализа 2х2. Наблюдаемая согласованность у 300 образцов между двумя исследованиями в анализе 2х2 показывает конкордантность 99,33% (298/300) с ДИ 95% из 97,61–99,92% для BOND-MAX System

Процент положительного согласования (чувствительность) или способность Leica HER2 FISH System - 30 Test правильно идентифицировать положительные случаи в анализе Abbott Molecular PathVysion HER-2 с зондом ДНК (процент образцов с положительным результатом на основании Leica HER2 FISH System - 30 Test, и ручного Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit из всех положительных случаев Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) составил 99,03% (102/103).

Процент отрицательного согласования (специфичность) или способность правильно идентифицировать отрицательные случаи Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (процент образцов с отрицательным результатом на основании Leica HER2 FISH System - 30 Test и Abbott Molecular PathVysion HER-2 с ДНК-зондом из всех отрицательных случаев Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) составил 99,49% (196/197). См. Таблицу 4.

|                                            |                     | Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit |                     |       |
|--------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------|---------------------|-------|
|                                            |                     | Отрицательный(<2.0)                             | Положительный(≥2.0) | Всего |
| Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-MAX. | Отрицательный(<2.0) | 196                                             | 1                   | 197   |
|                                            | Положительный(≥2.0) | 1                                               | 102                 | 103   |
|                                            | Всего               | 197                                             | 103                 | 300   |

Общая конкордантность (ДИ 95%) = 99.33% (97.61 – 99.92%)

Таблица 4. Конкордантность 2х2 Leica HER2 FISH System - 30 Test в рамках системы BOND-MAX с Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit на образцах тканей молочной железы.

#### Результаты конкордантности BOND-III System 2х2 - Грудь

Данные были сгруппированы как отрицательные (<2.00) или положительные (≥2.00) для анализа 2х2. Наблюдаемая согласованность у 300 образцов между двумя исследованиями в анализе 2х2 показывает конкордантность 99,67% (299/300) с ДИ 95% из 98,16–99,99% для BOND-III System.

Процент положительного согласования (чувствительность) или способность Leica HER2 FISH System - 30 Test правильно идентифицировать положительные случаи в Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (процент образцов с положительным результатом на основании и Leica HER2 FISH System - 30 Test, и ручного Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit из всех положительных случаев Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) составил 99,03% (102/103).

Процент отрицательного согласования (специфичность) или способность правильно идентифицировать отрицательные случаи Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (процент образцов с отрицательным результатом на основании Leica HER2 FISH System - 30 Test и Abbott Molecular PathVysion HER-2 с ДНК-зондом из всех отрицательных случаев Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) составил 100% (197/197). См. Таблицу 5.

|                                           |                     | Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit |                     |       |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------|---------------------|-------|
|                                           |                     | Отрицательный(<2.0)                             | Положительный(≥2.0) | Всего |
| Leica HER2 FISH System - 30 Test BOND-III | Отрицательный(<2.0) | 197                                             | 1                   | 198   |
|                                           | Положительный(≥2.0) | 0                                               | 102                 | 102   |
|                                           | Всего               | 197                                             | 103                 | 300   |

Общая конкордантность (ДИ 95%) = 99.67% (98.16 – 99.99%)

Таблица 5. Конкордантность 2х2 Leica HER2 FISH System - 30 Test в рамках системы BOND-III с Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit на образцах тканей молочной железы.

Резюмируя, можно сказать, что полученные в этом исследовании данные подтверждают возможность использования Leica HER2 FISH System - 30 Test в оценке пациентов, для которых рассматривается лечение препаратом Herceptin (trastuzumab), на основании его высокой конкордантности с Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, ранее апробированным диагностическим тестом для этого показателя.

## Клиническая конкордантность системы Leica HER2 FISH - 30 Test по сравнению с Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit - желудок

В данном исследовании изучалась пригодность системы Leica HER2 FISH - 30 Test к использованию при определении лечения препаратом Герцептин (Трастузумаб). Целью исследования было изучить конкордантность между системой Leica HER2 FISH - 30 Test и ранее принятым диагностическим прибором Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, считающимся «золотым стандартом» для анализа образцов опухоли желудка. Испытание считалось успешным, если нижняя граница 95%-го одностороннего доверительного интервала превышала 90 % между системой Leica HER2 FISH - 30 Test и ручным Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit, между положительным (усиление) и отрицательным (без усиления) случаями у фиксированных формалином и пропитанных парафином (FFPE) аденокарцином желудка (включая гастроэзофагеальный переход).

Исследование проводилось с оценкой клинических образцов инвазивной карциномы желудка. Исследование выполнялось на архивированных, фиксированных формалином и пропитанных парафином блоках тканей аденокарциномы желудка с известными уровнями экспрессии гена HER2. В группу из 109 образцов входили 50 амплифицированных и 59 неамплифицированных образцов.

Все образцы были окрашены с помощью ручного анализа Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit в соответствии с инструкциями изготовителя, указанными на буклете в упаковке. Затем последовательные секции из каждого случая были окрашены с помощью системы Leica HER2 FISH - 30 Test в системе BOND-MAX.

Все окрашенные предметные стекла были оценены в случайном порядке одним обученным наблюдателем. Результаты интерпретировались как отрицательные с вычисленным соотношением генов HER2/CEP17  $< 2.0$  и как положительные с вычисленным соотношением генов HER2/CEP17  $\geq 2.0$ . Затем был выполнен анализ данных на конкордантность, положительное окрашивание и отрицательное окрашивание.

### Результаты конкордантности 2x2, BOND-MAX System - желудок

Данные были сгруппированы как отрицательные ( $< 2.0$ ) или положительные ( $\geq 2.0$ ) для анализа 2x2. Наблюдаемая согласованность у 109 образцов между двумя исследованиями в анализе 2x2 показывает конкордантность 98,17 % (107/109) с ДИ 95 % 93,53-99,78 % для системы BOND-MAX.

Процент положительного согласования (чувствительность), или способность системы Leica HER2 FISH - 30 Test правильно идентифицировать положительные случаи в анализе Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe (процент образцов с положительным результатом на основании системы Leica HER2 FISH - 30 Test и ручного анализа Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit из всех положительных случаев Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) составил 96,00% (48/50).

Процент отрицательного согласования (специфичность), или способность правильно идентифицировать отрицательные случаи Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit (процент образцов с отрицательным результатом на основании системы Leica HER2 FISH - 30 Test и Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit из всех отрицательных случаев Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit) составил 100% (59/59). См. Таблицу 6.



|                                            |                      | Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit |                      |       |
|--------------------------------------------|----------------------|-------------------------------------------------|----------------------|-------|
|                                            |                      | Отрицательный (<2.0)                            | Положительный (≥2.0) | Всего |
| Система Leica HER2 FISH - 30 Test BOND-MAX | Отрицательный (<2,0) | 59                                              | 2                    | 61    |
|                                            | Положительный (≥2,0) | 0                                               | 48                   | 48    |
|                                            | Всего                | 59                                              | 50                   | 109   |

Общая конкордантность (ДИ 95 %) = 98,17 % (93,53 -99,78 %)

Таблица 6. Конкордантность 2х2 системы Leica HER2 FISH - 30 Test в системе BOND-MAX с Abbott Molecular PathVysion HER-2 DNA Probe Kit на тканях желудка.

Русский

## Проверка точности – BOND-MAX System

### A. Внутрисерийная проверка точности

Внутрисерийная проверка точности была выполнена методом случайной выборки. Внутрисерийная точность Leica HER2 FISH System - 30 Test оценивалась в одной лаборатории на 540 ранее охарактеризованных образцах HER2 TMA со случаями рака груди, фиксированными формалином и пропитанными парафином. Использование TMA для определения внутрисерийной точности позволило проверять большее количество случаев с более широким диапазоном выраженности HER2 за одну серию на одном инструменте.

При исчислении предметных стекол, окрашенных при внутрисерийной проверке точности, 532/540 оцененных случаев показали конкордантный результат с общей конкордантностью 98,52% с более низким 95% ДИ – 97,10%.

### B. Внутринструментальная проверка точности

Внутринструментальная проверка точности была выполнена методом случайной выборки. Внутринструментальная точность Leica HER2 FISH System - 30 Test оценивалась в одной лаборатории на 1620 ранее охарактеризованных образцах HER2 TMA со случаями рака груди, фиксированными формалином и пропитанными парафином. Использование TMA для определения внутринструментальной точности позволило получить большее количество случаев с более широким диапазоном выраженности HER2 за несколько серий на одном инструменте.

При исчислении предметных стекол, окрашенных при внутринструментальной проверке точности, 1620/1620 оцененных случаев показали конкордантный результат с общей конкордантностью 100% с более низким 95% ДИ – 99,82%.

### C. Межсерийная проверка точности

Межсерийная проверка точности была выполнена методом случайной выборки. Межсерийная точность Leica HER2 FISH System - 30 Test оценивалась в одной лаборатории на 900 ранее охарактеризованных образцах HER2 TMA со случаями рака груди, фиксированными формалином и пропитанными парафином. Использование TMA для межсерийной проверки точности позволило проверять большее количество случаев с более широким диапазоном выраженности HER2 у разных серий в разные дни.

При исчислении предметных стекол, окрашенных при межсерийной проверке точности, 894/900 оцененных случаев показали конкордантный результат с общей конкордантностью 99,33% с более низким 95% ДИ – 98,55%.

### D. Межлабораторная проверка точности

Межлабораторная проверка точности была выполнена методом случайной выборки. Межлабораторная точность Leica HER2 FISH System - 30 Test оценивалась в трех лабораториях на 513 ранее охарактеризованных образцах HER2 TMA со случаями рака груди, фиксированными формалином и пропитанными парафином. Использование TMA для межлабораторной проверки точности позволило проверять большее количество случаев с более широким диапазоном выраженности HER2 у разных серий на разных инструментах.

При исчислении предметных стекол, окрашенных при межлабораторной проверке точности, 510/513 оцененных случаев показали конкордантный результат с общей конкордантностью 99,42% с более низким 95% ДИ – 98,30%.

### E. Межнаблюдательная проверка точности

Межнаблюдательная проверка точности была выполнена методом случайной выборки. Воспроизводимость Leica HER2 FISH System - 30 Test у разных наблюдателей оценивалась в трех лабораториях. В каждой лаборатории работало по одному опытному наблюдателю. Для проверки было использовано восемнадцать целных случаев рака груди, отражающие типы образцов, используемых в клинических исследованиях.

При исчислении предметных стекол, окрашенных при межнаблюдательной проверке точности, 53/54 оцененных случаев показали конкордантный результат с общей конкордантностью 98,15% с более низким 95% ДИ – 90,11%.

#### F. Проверка точности от партии к партии

Проверка точности от партии к партии была выполнена методом случайной выборки. Точность от партии к партии определялась на трех партиях Leica HER2 FISH System - 30 Test, независимо изготовленных с применением зарекомендовавших себя технологий (GMP). Каждая партия испытывалась в одной лаборатории на 540 ранее охарактеризованных образцах HER2 TMA со случаями рака груди, фиксированными формалином и пропитанными парафином. Использование TMA для проверки воспроизводимости между партиями позволило проверять большее количество случаев с более широким диапазоном выраженности HER2 в разных партиях.

При исчислении предметных стекол, окрашенных при проверке точности от партии к партии, 534/540 оцененных случаев показали конкордантный результат с общей конкордантностью 98,89% с более низким 95% ДИ – 97,60%.

#### Проверка точности – BOND-III System

#### G. Внутрисерийная проверка точности

Внутрисерийная проверка точности была выполнена методом случайной выборки. Внутрисерийная точность Leica HER2 FISH System - 30 Test оценивалась в одной лаборатории на 540 ранее охарактеризованных образцах HER2 TMA со случаями рака груди, фиксированными формалином и пропитанными парафином. Использование TMA для определения внутрисерийной точности позволило проверять большее количество случаев с более широким диапазоном выраженности HER2 за одну серию на одном инструменте.

При исчислении предметных стекол, окрашенных при внутрисерийной проверке точности, 540/540 оцененных случаев показали конкордантный результат с общей конкордантностью 100% с более низким 95% ДИ – 99,45%.

#### H. Внутринструментальная проверка точности

Внутринструментальная проверка точности была выполнена методом случайной выборки. Внутринструментальная точность Leica HER2 FISH System - 30 Test оценивалась в одной лаборатории на 1620 ранее охарактеризованных образцах HER2 TMA со случаями рака груди, фиксированными формалином и пропитанными парафином. Использование TMA для определения внутринструментальной точности позволило получить большее количество случаев с более широким диапазоном выраженности HER2 за несколько серий на одном инструменте.

При исчислении предметных стекол, окрашенных при внутрисерийной проверке точности, 1620/1620 оцененных случаев показали конкордантный результат с общей конкордантностью 100% с более низким 95% ДИ – 99,82%.

#### I. Межсерийная проверка точности

Межсерийная проверка точности была выполнена методом случайной выборки. Межсерийная точность Leica HER2 FISH System - 30 Test оценивалась в одной лаборатории на 900 ранее охарактеризованных образцах HER2 TMA со случаями рака груди, фиксированными формалином и пропитанными парафином. Использование TMA для межсерийной проверки точности позволило проверять большее количество случаев с более широким диапазоном выраженности HER2 у разных серий в разные дни.

При исчислении предметных стекол, окрашенных при межсерийной проверке точности, 891/900 оцененных случаев показали конкордантный результат с общей конкордантностью 99,00% с более низким 95% ДИ – 98,11%.

#### J. Межлабораторная проверка точности

Межлабораторная проверка точности была выполнена методом случайной выборки. Межлабораторная точность Leica HER2 FISH System - 30 Test оценивалась в трех лабораториях на 513 ранее охарактеризованных образцах HER2 TMA со случаями рака груди, фиксированными формалином и пропитанными парафином. Использование TMA для межлабораторной проверки точности позволило проверять большее количество случаев с более широким диапазоном выраженности HER2 у разных серий на разных инструментах.

При исчислении предметных стекол, окрашенных при межлабораторной проверке точности, 511/513 оцененных случаев показали конкордантный результат с общей конкордантностью 99,61% с более низким 95% ДИ – 98,60%.

## К. Межнаблюдательная проверка точности

Межнаблюдательная проверка точности была выполнена методом случайной выборки. Воспроизводимость Leica HER2 FISH System - 30 Test у разных наблюдателей оценивалась в трех лабораториях. В каждой лаборатории работало по одному опытному наблюдателю. Для проверки было использовано 18 цельных случаев рака груди, отражающие типы образцов, используемых в клинических исследованиях.

При исчислении предметных стекол, окрашенных при межнаблюдательной проверке точности, 53/54 оцененных случаев показали конкордантный результат с общей конкордантностью 98,15% с более низким 95% ДИ – 90,11%.

## Л. Проверка точности от партии к партии

Проверка точности от партии к партии была выполнена методом случайной выборки. Точность от партии к партии определялась на трех партиях Leica HER2 FISH System - 30 Test, независимо изготовленных с применением зарекомендовавших себя технологий (GMP). Каждая партия испытывалась в одной лаборатории на 540 ранее охарактеризованных образцах HER2 TMA со случаями рака груди, фиксированными формалином и пропитанными парафином. Использование TMA для проверки воспроизводимости между партиями позволило проверять большее количество случаев с более широким диапазоном выраженности HER2 в разных партиях.

При исчислении предметных стекол, окрашенных при проверке точности от партии к партии, 540/540 оцененных случаев показали конкордантный результат с общей конкордантностью 100% с более низким 95% ДИ – 99,45%.

## Надежность анализа

Надежность изучалась на системе BOND-MAX и BOND-III для определения области допустимых значений времени и температуры извлечения тепла; времени, температуры и концентрации извлечения энзимов; времени и температуры денатурирования; времени и температуры гибридизации; времени и температуры промывки. Надежность с использованием протокола системы BOND-MAX и BOND-III по умолчанию также изучалась в выходе за рекомендуемые пределы по температуре и влажности, указанные в директиве FDA/ORA ORA LAB5.3 Rev 1.7.

- При повышении температуры по умолчанию на каждом теплозависимом этапе на 4°C или ее понижении на 4°C не наблюдалось никакого изменения усиления по сравнению со стандартным протоколом Leica HER2 FISH System - 30 Test. Высочайшие уровни качества наблюдались при стандартных температурах, и рекомендуются именно эти температуры.
- При выполнении термического извлечения эпитопа (HIER) в течение 20 минут и 30 минут при 97 °C с BOND ER1 не наблюдалось никаких изменений усиления по сравнению со стандартным протоколом Leica HER2 FISH System - 30 Test. Наивысшие уровни качества наблюдались в течение стандартного времени 25 минут, и рекомендуется именно это время инкубации.
- При выполнении энзимного извлечения эпитопа (EIER) в течение 15 минут и 35 минут при 37 °C не наблюдалось никаких изменений усиления по сравнению со стандартным протоколом Leica HER2 FISH System - 30 Test. Наивысшие уровни качества наблюдались в течение стандартного времени 25 минут, и рекомендуется именно это время инкубации.
- При выполнении энзимного извлечения эпитопа (EIER) с соотношениями концентрата/разбавителя энзимов 1:200 – 1:500 с использованием стандартного протокола Leica HER2 FISH System - 30 Test не наблюдалось никаких изменений усиления. Наивысшие уровни качества наблюдались при концентрации энзимов 1:300, и рекомендуется именно эта концентрация.
- При выполнении денатурирования в течение 5 минут и 15 минут не наблюдалось никаких изменений усиления по сравнению со стандартным протоколом Leica HER2 FISH System - 30 Test. Наивысшие уровни качества наблюдались в течение стандартного времени 10 минут, и рекомендуется именно это время денатурирования.
- При выполнении гибридизации в течение 9 часов и 15 часов не наблюдалось никаких изменений усиления по сравнению со стандартным протоколом Leica HER2 FISH System - 30 Test. Наивысшие уровни качества наблюдались в течение стандартного времени 12 часов, и рекомендуется именно это время гибридизации.

- При выполнении послегибридизационной промывки в течение 2, 5 и 7 минут не наблюдалось никаких изменений усиления по сравнению со стандартным протоколом Leica HER2 FISH System - 30 Test. Наивысшие уровни качества наблюдались в течение стандартного времени 4 минут, и рекомендуется именно это время послегибридизационной промывки.
- Не наблюдалось никаких изменений усиления при выполнении Leica HER2 FISH System - 30 Test при 28 °C и относительной влажности 30% и 16 °C и относительной влажности 80% по сравнению со стандартным протоколом Leica HER2 FISH System - 30 Test, выполняемым при окружающих условиях.

Операции, выполненные за пределами рекомендуемых параметров надежности анализа, не прошли валидацию. Использование любых других параметров исследований может отменить валидацию анализа.

Приведенный выше текст описывает протестированные условия и результаты этого исследования. Обратите внимание, что Leica не тестировала все возможные комбинации условий, и для всех условий не рекомендует использовать нестандартные диапазоны. Протокол окрашивания Leica HER2 FISH по умолчанию описан в Таблице 2.



## Поиск и устранение неисправностей

| Проблема                                                       | Вероятная причина                                                                                                                                                                                                                   | Способ устранения                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Отсутствует или очень слаб флуоресцентный сигнал / окрашивание | Неправильная фиксация или обработка исследуемого образца                                                                                                                                                                            | Должен использоваться фиксаж на основе формалина, а графики обработки должны быть пригодны для исследуемого образца.                                                                                                                                                                                                                                  |
|                                                                | Leica HER2 FISH System - 30 Test используется по истечении срока годности                                                                                                                                                           | Убедитесь, что срок годности используемого Leica HER2 FISH System - 30 Test еще не истек.                                                                                                                                                                                                                                                             |
|                                                                | Неправильный выбор протокола                                                                                                                                                                                                        | В поле «Протокол окрашивания» (Staining Protocol) в окне «Add slide» (Добавить предметное стекло) в качестве значения по умолчанию нужно выбрать *FISH Protocol A.                                                                                                                                                                                    |
|                                                                | Дозируются не те сыпучие реактивы                                                                                                                                                                                                   | Проследите, чтобы для всех реактивов BOND имелись соответствующие емкости, поставленные в нужные положения на инструменте.                                                                                                                                                                                                                            |
|                                                                | Некорректная депарафинизация предметных стекол                                                                                                                                                                                      | В поле «Preparation» (Подготовка) в окне «Add slide» (Добавить предметное стекло) нужно выбрать режим *Dewax.                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                | Некорректная предварительная обработка                                                                                                                                                                                              | Убедитесь, что выбраны стандартные протоколы предварительной обработки (HIER и энзимный гидролиз). При необходимости откорректируйте протоколы предварительной обработки (HIER или энзимный гидролиз).                                                                                                                                                |
|                                                                | Неправильное денатурирование                                                                                                                                                                                                        | Убедитесь, что выбрано стандартное денатурирование *D10.                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                                                                | Неправильная гибридизация                                                                                                                                                                                                           | Убедитесь, что выбрана стандартная гибридизация *H12. При необходимости увеличьте время гибридизации.                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                                                | Избыточное время послегибридизационной промывки                                                                                                                                                                                     | Уменьшите время послегибридизационной промывки.                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                                                | Серия прервана до ее завершения                                                                                                                                                                                                     | С помощью ПО BOND проверьте наличие ошибок во время серии окрашивания и действуйте в соответствии с инструкциями в ПО BOND.                                                                                                                                                                                                                           |
|                                                                | Неподходящее оборудование флуоресцентной микроскопии <ul style="list-style-type: none"> <li>• Неподходящий набор фильтров</li> <li>• Неподходящая лампа</li> <li>• Истек срок годности лампы</li> <li>• Не тот тип масла</li> </ul> | Убедитесь, что все используемое оборудование флуоресцентной микроскопии подходит для выполняемого анализа, и что используются: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Подходящий набор фильтров</li> <li>• Подходящая лампа</li> <li>• Лампа хорошей мощности</li> <li>• Подходящее масло для использования в маслопогружной микроскопии</li> </ul> |
|                                                                | Выдержка в УФ-лучах (фотообесцвечивание)                                                                                                                                                                                            | Храните предметные стекла до и после оценки в темном месте, чтобы сохранить флуоресцентные сигналы. Для сохранения сигналов в течение длительного времени храните предметные стекла при -20 °C.                                                                                                                                                       |

| Проблема                                                                                      | Вероятная причина                                                                       | Способ устранения                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Неспецифический фоновый флуоресцентный сигнал / окрашивание                                   | Недостаточная послегибри-<br>дизационная промывка                                       | Увеличьте время послегибридизационной про-<br>мывки                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                                                                                               | Дозируются не те сыпучие<br>реактивы                                                    | Проследите, чтобы для всех реактивов BOND<br>имелись соответствующие емкости, поставлен-<br>ные в нужные положения на инструменте.                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                               | Некорректная<br>депарафинизация<br>предметных стекол                                    | В поле «Preparation» (Подготовка) в окне «Add<br>slide» (Добавить предметное стекло) нужно вы-<br>брать режим *Dewax.                                                                                                                                                                                                                                      |
|                                                                                               | Неспецифическая<br>перекрестная реакция с<br>областями некроза ткани                    | Должен использоваться фиксаж на основе<br>формалина, а графики обработки должны быть<br>пригодны для исследуемого образца. По возмож-<br>ности повторно исследуйте случай с помощью<br>другого блока. Если это невозможно, оцените и<br>выберите области, показывающие наилучшие<br>рисунки фиксации в увязке с соответствующей<br>окрашенной секцией H&E. |
|                                                                                               | Секции прилипли к<br>предметным стеклам<br>с использованием<br>альтернативных адгезивов | Используйте BOND Plus Slides (S21.2113).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Плохое<br>сохранение<br>морфологии<br>ткани                                                   | Неправильная фиксация и<br>обработка ткани                                              | Должен использоваться фиксаж на основе<br>формалина, а графики обработки должны быть<br>пригодны для исследуемого образца. По возмож-<br>ности повторно исследуйте случай с помощью<br>другого блока. Если это невозможно, оцените и<br>выберите области, показывающие наилучшие<br>рисунки фиксации в увязке с соответствующей<br>окрашенной секцией H&E. |
|                                                                                               | Некорректная<br>предварительная обработка                                               | Откорректируйте протокол предварительной<br>обработки (HIER или Enzymatic Digestion).                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| От предметных<br>стекол пациента<br>/ контрольных<br>предметных<br>стекол отрывается<br>ткань | Используется не тот тип<br>предметных стекол или<br>плохой дренаж секции                | Используйте предметные стекла нужного типа<br>для секций пациента / контрольных секций<br>(например, BOND Plus Slides – код продукта<br>S21.2113). Необходимо обеспечить достаточный<br>дренаж предметных стекол и инкубировать их в<br>течение 1 часа при 60 °C.                                                                                          |

Таблица 7. Руководство по устранению неисправностей Leica HER2 FISH System - 30 Test.

При возникновении любых проблем с выходом Leica HER2 FISH System - 30 Test за рамки руководства по устранению неисправностей обращайтесь за помощью в региональный отдел техобслуживания Leica Biosystems или к дистрибьютору.

Русский



## Справочный материал

1. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor related protein. *Nature* 1986;319:226–30.
2. Lonardo F, Di Marco E, King CR, Pierce JH, Segatto O, Aaronson SA, et al. The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biologist* 1990; 2: 992–1003.
3. Wolff A.C., Hammond E.H., Schwartz J.N., et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 25, 1-28, 2007.
4. 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.
5. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1992;10:7:1049-1056.
6. Gullick WJ, Love SB, Wright C, et al. c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *British Journal of Cancer* 1991;63:434-438.
7. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Research* 1990;50:4332-4337.
8. Tandon AK, Clark GM, Chamness AU, et al. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1989; 7:1120-1128.
9. Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F et. al. Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27: LBA4509.
10. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1992; 89: 4285–9.
11. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Molecular & Cell Biology* 1989; 9: 1165–72.
12. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 1993; 37: 255–63.
13. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y-M, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Research* 1998; 58: 2825–31.
14. Ellis I.O., Bartlett J., Dowsett M., Humphreys S., Jasani B., Miller K., Pinder S.E., Rhodes A. and Walker R. Best practise No. 176: Updated recommendations for Her-2 testing in the UK. *Journal of Clinical Pathology* 57: 233-237, 2004.
15. Walker R.A, Bartlett, J., Dowsett, M., Ellis, I., Hanby, A., Jasani, Miller, K., Pinder, S. HER2 Testing in the UK – further update to recommendations. *Journal of Clinical Pathology* 2007.054866
16. Press MF, Zhou JY, Ma Y, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridization in invasive breast carcinoma. In: *FISH: Clinical Applications in Cancer and Genetics* February 8-11, 1994; Lake Tahoe, CA.
17. Pauletti G, Singh R, Press MF, et al. HER-2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization: A comparative study with other techniques. Abstract 3247, *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 1994 35:545.
18. Szollosi J, Balázs M, Feuerstein BG, et al. Phenotype genotype relationship in erbB-2 amplification. *International Society for Analytical Cytology* 1994 Abstracts. 92. Abstract 536D.
19. Kallioniemi O, Kallioniemi A, Kurisu W, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992;89:5321-5325.
20. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Quality assurance for immunocytochemistry: Approved guideline. NCCLS document MM4-A (1-56238-396-5) NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1999; 19087–1898: USA
21. Nadji, M. and Morales, A. R. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Laboratory Medicine* 1983; 14: 767.
22. Jackson P. 2007. Quality Assurance in Immunohistochemistry. In: *Immunohistochemistry*, 2007 (ed. Renshaw S), PP 205–237. Scion Publishing Ltd.
23. Bartlett JMS, Ibrahim M, et al External Quality Assurance of HER2 FISH Testing: Results of a UK NEQAS Pilot Scheme. *Journal of Clinical Pathology*. 2006.

Стр. 25 из 26 Leica Biosystems Leica HER2 FISH System - 30 Test Инструкции по использованию TA9217 EU-RU-CE-Rev\_EU-RU-CE-Rev\_G 05/05/2016



## Лицензионное соглашение

Данный продукт содержит FISH-пробы PathVysion, предоставленные Abbott Molecular Inc. PathVysion, LSI и CEP являются торговыми марками Abbott Molecular Inc. Все права защищены. Используется по лицензии.

## Гарантия

Leica Biosystems Newcastle Ltd заверяет, что данное изделие прошло комплексную проверку качества по внутренним критериям компании Leica, не имеет дефектов и обладает всеми заявленными техническими характеристиками и/или соответствующими договору свойствами. Объем гарантии зависит от содержания заключенного договора. Обязывающими являются только условия гарантии вашего дилера Leica или компании, в которой вы приобрели изделие. При соблюдении условий хранения и методических рекомендаций, производитель гарантирует высокое качество работы изделия на протяжении всего срока годности, указанного на упаковке.

## Сервисная информация

Для получения дополнительных услуг или поддержки свяжитесь с Вашим местным дистрибьютором Leica

### Российская Федерация:

ООО «БиоЛайн»

Российская Федерация, 197101, г. Санкт-Петербург, Пинский переулок, 3, литер А

Эл. почта: main@bioline.ru

Тел.: (812) 320-49-49

Факс: (812) 320-49-40

«Горячая линия» службы технической поддержки: 8-800-333-00-49

Изделие не подлежит техническому обслуживанию (повседневному уходу) и ремонту.

## Прекращение использования и утилизация

Изделие и его компоненты должны утилизироваться с соблюдением действующих локальных предписаний, применительно к классу "Б" (эпидемиологически опасные отходы).

## Изменения и дополнения к предыдущему изданию

Добавлены Гарантия, Сервисная информация, Прекращение использования и утилизация.

## Дата издания

05 Мая 2016

## Значение символов

|                                                                                     |                                                    |                                                                                     |                                          |                                                                                     |                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
|  | Код партии                                         |  | Хранение                                 |  | № каталога                 |
|  | Медицинский прибор для диагностики <i>In vitro</i> |  | Изготовитель                             |  | Серийный номер             |
|  | См. Инструкции по использованию                    |  | Содержит достаточно для <n> исследований |  | Использовать до ГГГГ-ММ-ДД |

Herceptin является торговой маркой Genentech, Inc. и F. Hoffmann-La Roche Ltd.

[Логотип]  
Джонатан Кемп  
Государственный нотариус

НАСТОЯЩИМ ДОВОДИТСЯ ДО ВСЕОБЩЕГО СВЕДЕНИЯ, что Я, ДЖОНАТАН РИЧАРД КЕМП, Ньюкасл-апон-Тайн, Англия, ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НОТАРИУС, надлежаще назначенный и приведенный к присяге, уполномоченный вести свою деятельность на территории Англии и Уэльса, УДОСТОВЕРЯЮ, что приложенные и перечисленные далее два документа, были представлены мне сегодня в г. Ньюкасл-апон-Тайн Викторией Рейд, главой Департамента разработок и исследований [компания] **ЛЕЙКА БИОСИСТЕМС НЬЮКАСЛ ЛИМИТЕД**, компании, осуществляющей свою деятельность в Соединенном Королевстве и зарегистрированной Бюро регистрации компаний Англии и Уэльса под номером 02163063, (далее – «Компания»), которая поставила подпись от имени Компании в моем присутствии. Я также удостоверяю, что подпись, поставленная в документе от имени Рэйчел Осборн, является подписью Рэйчел Осборн, Старшего специалиста по регуляторным делам Компании, после сличения с подписью, выполненной Рэйчел Осборн в моем присутствии ранее;

«А» Заявление к эксплуатационной документации на Набор Leica для выявления с помощью FISH метода амплификации гена HER2 (Leica HER2 FISH System); а также «В» Откорректированные [инструкции по использованию] Набора Leica для выявления с помощью FISH метода амплификации гена HER2 (Leica HER2 FISH System) – 30 исследований, TA9217 EU-RU-CE.

ПОДПИСАНО И СКРЕПЛЕНО печатью моего офиса в Ньюкасл-апон-Тайн, Англия, сего двенадцатого мая две тысячи шестнадцатого года.

**<ПОДПИСЬ>**

Джонатан Ричард Кемп  
Государственный нотариус, Англия и Уэльс  
Протокол № 2016/224.В

Пломба: Джонатан Ричард Кемп  
Государственный нотариус

Тайм Централ/ Комната 6.6/ Галлоуэйт 32/ Ньюкасл-апон-Тайн/ NE1 4BF/ Т: 0788 572 1559/ Эл. почта: [notary@irkemp.com](mailto:notary@irkemp.com) / [www.notarynorth.com](http://www.notarynorth.com)  
Регулируется Дополнительным офисом Архиепископа Кентерберийского

**В Федеральную службу  
по надзору в сфере здравоохранения  
Российской Федерации  
(РОСЗДРАВНАДЗОР)**

11 мая 2016 г.

**ЗАЯВЛЕНИЕ**

Уважаемые господа,

И. Мы, **Лейка Биосистемс Ньюкасл Лтд. (Баллиол Бизнес Парк Уэст, Бэнтон Лэйн, Ньюкасл-апон-Тайн, NE12 8EW, Соединенное Королевство)**, в соответствии с запросом РОСЗДРАВНАДЗОРА № 04-14153/16 от 08.04.2016 г., направленным нашему уполномоченному представителю ООО «БиоЛайн» (ИНН 7813118690, Россия) и перенаправленным затем к нам, настоящим ходатайствуем

**дополнить** регистрационное досье на Набор Leica для выявления с помощью FISH метода амплификации гена HER2 (Leica HER2 FISH System) обновленными инструкциями по использованию, в которые включена следующая информация:

**а) Гарантия.**

«Лейка Биосистемс Ньюкасл Лтд. заверяет, что данное изделие прошло комплексную проверку качества по внутренним критериям компании Лейка, не имеет дефектов и обладает всеми заявленными техническими характеристиками и/или соответствующими договору свойствами.

Объем гарантии зависит от содержания заключенного договора. Обязывающими являются только условия гарантии вашего дилера компании Лейка или компании, в которой Вы приобрели изделие.

При соблюдении условий хранения и методических рекомендаций, производитель гарантирует высокое качество работы изделия на протяжении всего срока годности, указанного на упаковке».

**б) Сервисная информация**

«Для получения дополнительных услуг или поддержки свяжитесь с Вашим местным дистрибьютором компании Лейка.

Российская Федерация:

ООО «БиоЛайн»

Российская Федерация, 197101, г. Санкт-Петербург, Пинский переулок, 3, литер А

Эл. почта: main@bioline.ru

Тел.: (812) 320-49-49

Факс: (812) 320-49-40

«Горячая линия» службы технической поддержки: 8-800-333-00-49

Изделие не подлежит техническому обслуживанию (повседневному уходу) и ремонту».

**с) Прекращение использования и утилизация**

«Изделие и его компоненты должны утилизироваться с соблюдением действующих местных положений, применительно к классу "Б" (эпидемиологически опасные отходы)».

Круглая печать: Джонатан Ричард Кемп  
Государственный нотариус

II. Вышеуказанная информация должна быть приобщена к технической документации.

Дата: 11 мая 2016 г.

Подпись: <ПОДПИСЬ>

Рэйчел Осборн, Старший специалист по  
регуляторным делам

Дата: 12 мая 2016 г.

Подпись: <ПОДПИСЬ>

Виктория Рейд, глава Департамента разработок и  
исследований

Круглая печать: Джонатан Ричард Кемп  
Государственный нотариус

Лейка Биосистемс Ньюкасл Лтд. · Баллиол Бизнес Парк, Бентон Лэйн, Ньюкасл-апон-Тайн NE12 8EW Соединенное Королевство  
[www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)  
Т +44(0) 191 215 0567 · Ф +44(0) 191 215 1152

Инструкции по использованию Набора Leica для выявления с помощью FISH метода амплификации гена HER2 [Leica HER2 FISH System] – 30 исследований

Лейка Биосистемс Ньюкасл Лтд  
Баллиол Бизнес Парк Уэст  
Бэнтон Лэйн  
Ньюкасл-Апон-Тайн  
NE12 8EW  
Соединенное Королевство  
Тел. +44 191 215 4242

Лейка Биосистемс Канада  
Фор Вэли Драйв 71  
Конкорд, Онтарио L4K 4V8  
Канада  
+1 800 248 0123

Лейка Биосистемс Инк  
Лейдер Лейн 1700  
Буффало Гроув,  
Иллинойс 60089  
США  
+1 800 248 0123

Лейка Биосистемс Мельбурн Пти Лтд  
495 Блэкбёрн Роуд  
Маунт Уэйверли, Виктория 3149  
Австралия  
+61 2 8870 3500

<ПОДПИСЬ> 11 мая 2016 г.

<ПОДПИСЬ> 12 мая 2016 г.

Круглые печати: Джонатан Ричард Кемп  
Государственный нотариус

[Текст на русском языке]

Круглые печати: Джонатан Ричард Кемп  
Государственный нотариус

27  
Перевод с английского языка на русский язык выполнен переводчиком Любимовой Анастасией Васильевной. Подтверждаю, что выполненный мной перевод является правильным, точным и полным.

 *Ольга Сергеевна Николаева*

Санкт-Петербург,  
семнадцатого мая две тысячи шестнадцатого года.

Я, **Николаева Ольга Сергеевна**, временно исполняющая обязанности  
нотариуса нотариального округа Санкт-Петербурга **Остапенко Елены  
Константиновны**, свидетельствую подлинность подписи, сделанной  
переводчиком **Любимовой Анастасией Васильевной** в моем присутствии.  
Личность его установлена.

Зарегистрировано в реестре за № *3-1461*  
Взыскано **500 рублей**, в т. ч. по тарифу и по ст. 15, 23 ОЗН РФ

Временно исполняющая  
обязанности нотариуса:



Бюро переводов «Аврора»  
197342, г. Санкт-Петербург,  
ст. м. «Черная Речка» БЦ «Оптим»  
ул. Торжковская, д. 5, офис 407.  
тел/факс: (812) 441-39-10

ОГРН: 1089847219043  
ИНН/КПП: 7841388560/781401001  
p/c 40702810507380000118  
к/с 30101810400000000766  
БИК 044030766

«AURORA» Translation Services  
197342, Saint-Petersburg,  
subway st. «Chernaya Rechka»  
«Optima» Business Center  
5 Torzhkovskaya str, of. 407  
tel/fax: (812) 441-39-10

PSRN: 1089847219043  
ITN/CRR: 7841388560/781401001  
s/a 40702810507380000118  
c/a30101810400000000766  
BIC 044030766



Итого в настоящем документе  
**34 (тридцать четыре)** листа

Вр. и.о. нотариуса