



SEELER & DR. FELLMETH  
NOTARE

КОПИЯ

NOTARE SEELER & DR. FELLMETH · Q7, 23 · 68161 MANNHEIM

### Beglaubigte Ablichtung

Die Übereinstimmung nachstehender Fotokopie mit dem Original wird hiermit  
beglaubigt.

Mannheim, den 17.08.2020

Rolf Glenz

Notarvertreter des Notars

Dr. Fellmeth in Mannheim

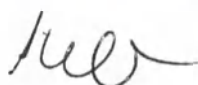


**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ****(INSTRUCTION FOR USE)****НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

**Первичное мышиное моноклональное антитело для качественного обнаружения V600E в белке BRAF иммуногистохимическим методом в диагностике in vitro к иммуноштейнерам автоматическим серии BenchMark (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody) производства Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany**

**РАЗРАБОТЧИК**

**«Ventana Medical Systems, Inc.», 1910 East Innovation Park Drive, Tucson, AZ 85755 USA**

**Approved by****Roche Diagnostics GmbH****Date: 17 August 2020****Andrea Weber****Manager Global Regulatory Affairs****Stamp****Roche Diagnostics GmbH**Sandhofer Straße 116  
68305 Mannheim**2020**

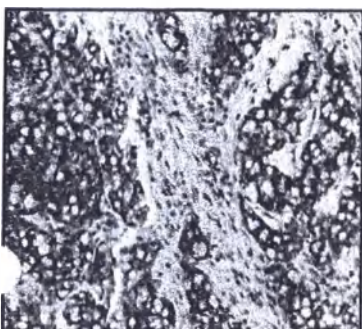
## VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody

Для использования с панелью VENTANA MMR IHC Panel

**REF** 760-5095

08033706001

**IVD**  50



**Рисунок 1. Окрашивание опухолевых клеток в раковой ткани толстой кишки антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody**

### ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) антитело) предназначено для качественного обнаружения V600E в белке BRAF в фиксированных формалином и залитых в парафин срезах ткани. Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) готово к применению на аппаратах серии BenchMark ULTRA, XT и GX с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit и вспомогательных реагентов.

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) является частью панели VENTANA MMR IHC Panel, в состав

которой входят VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody и VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody. Панель VENTANA MMR IHC Panel предназначена для обнаружения недостатка белка, участвующего в репарации неспаренных оснований ДНК, в качестве теста для идентификации лиц, находящихся под угрозой развития синдрома Линча, среди пациентов, которым диагностирован колоректальный рак (КРР), а также у которых выявлена мутация V600E в гене BRAF, в качестве вспомогательного средства для различения спорадического КРР и вероятного синдрома Линча в условиях отсутствия экспрессии белка MLH1.

Результаты анализов, выполненных с использованием данных продуктов, должны интерпретироваться квалифицированным патоморфологом с учетом результатов гистологического исследования, клинической картины и соответствующих контролей.

предназначено для диагностики *in vitro* (IVD).

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

Колоректальный рак является третьим наиболее распространенным видом рака и четвертой по распространенности причиной смерти в мире.<sup>1</sup> В большинстве случаев КРР наблюдается хромосомная нестабильность, однако примерно в 15 % случаев рак развивается по альтернативному пути, характеризующемуся дефектом функции системы репарации неспаренных оснований ДНК (MMR). Вследствие дефекта функции репарации неспаренных оснований (MMR) в опухолях наблюдается микросателлитная нестабильность (MSI), обусловленная неспособностью белков-репараторов (белки MMR) устранять ошибки репликации ДНК.

КРР с дефектами системы MMR обозначается как опухоль с дефицитом белков MMR (dMMR). И наоборот, КРР без дефектов системы MMR обозначается как опухоль с избытком белков MMR (pMMR). Колоректальный рак с дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR) в большинстве случаев имеет низкую дифференцировку и часто демонстрирует гистологические признаки преобладания в проксимальном отделе толстой кишки, а также муцинозного, медуллярного или перистнеовидноклеточного рака. Кроме того, он характеризуется увеличением числа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоли.<sup>2,3</sup> В общем, дефицит репарации неспаренных оснований может быть вызван мутациями зародышевой линии в одном

из генов MMR с последующей утратой соответствующей нормальной аллели посредством генетических или эпигенетических механизмов, соматическими мутациями в аллелях или эпигенетической инактивацией белка *MLH1* посредством метилирования.<sup>4</sup>

Наиболее часто мутациям подвержены следующие четыре гена MMR: *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* и *MSH6*. В нормальных клетках белок *MLH1* формирует комплекс (гетеродимер) с белком *PMS2*, в то время как белок *MSH2* формирует комплекс с белком *MSH6*.<sup>5,6</sup> При возникновении неспаренных оснований ДНК гетеродимер *MSH2/MSH6* связывается с неспаренным основанием ДНК, провоцируя конформационное изменение. Гетеродимер *MLH1/PMS2* связывается с ДНК-связанным комплексом *MSH2/MSH6*, вызывая эксцизионную репарацию поврежденной ДНК.

Белки *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* и *MSH6* являются клинически значимыми белками MMR, кодируемыми генами, которые могут мутировать у пациентов, имеющих в семейном анамнезе синдром Линча.<sup>7,8</sup> Носители этих мутаций имеют высокий пожизненный риск развития колоректального и других форм рака ввиду накопления ошибок репликации ДНК в пролиферирующих клетках. Синдром Линча составляет 1–6 % всех случаев КРР. Такие опухоли образуются по причине наследования аутосомно-доминантной мутации зародышевой линии в одном из четырех генов MMR; при этом для большинства случаев КРР, связанного с синдромом Линча, характерна потеря экспрессии белка *MLH1*.<sup>5,9,10</sup> У пациентов с синдромом Линча было выявлено более 300 различных мутаций в семействе белков MMR. Фенотип опухоли, связанной с синдромом Линча, обычно характеризуется иммуногистохимической потерей экспрессии в белках MMR, в частности в белках *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* и *MSH6*.<sup>10–13</sup> Исследование MMR методом IHC (иммуногистохимии) продемонстрировало эффективность при идентификации специфичного гена MMR, имеющего наибольшую вероятность обнаружения в нем изменения зародышевой линии или соматического изменения.<sup>14</sup>

Ген *BRAF* расположен на хромосоме 7q34, кодирующей цитоплазматическую серин-треонин киназу, которая действует после сигнального пути митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK). Онкогенные мутации в гене *BRAF*, происходящие исключительно в домене киназы, постоянно активируют сигнальный путь MAPK. Это приводит к усилению пролиферации клеток и повышению устойчивости к апоптозу. Наиболее распространенная из всех активирующих мутаций *BRAF* (точечная мутация T1799A) приводит к замещению валина (V) на глутаминовую кислоту (E) в положении 600 аминокислотной последовательности и обнаруживается в 12% всех случаев КРР.<sup>15,16</sup>

Являясь частью панели VENTANA MMR IHC Panel, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) помогает дифференцировать спорадический КРР и вероятный синдром Линча при отсутствии экспрессии белка *MLH1*.<sup>17,18</sup> При КРР отсутствие белка *MLH1* зачастую является результатом гиперметилирования промотора *MLH1* и указывает на спорадический характер заболевания.<sup>19</sup> Наличие белка *BRAF V600E* тесно связано с гиперметилированием промотора *MLH1*. В итоге положительный результат окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) указывает на спорадический КРР.

Помимо роли в стратификации КРР мутация *BRAF V600E* обнаруживается примерно в 8 % всех плотных опухолей, в том числе в меланомах (43 %), папиллярных карциномах (щитовидная железа) (39 %), серозных карциномах яичников (12 %), раковых образований в легком (2 %) и других раковых образованиях.<sup>16</sup> Кроме того, мутация *BRAF V600E* в недавнем времени была описана как молекулярный маркер волосатоклеточного лейкоза.<sup>20</sup>

### КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

В 1960-х годах был впервые описан синдром Линча и была установлена связь между потерей функции MMR и развитием рака.<sup>21</sup> Потеря экспрессии белков MMR (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2* или *MSH6*) может привести к MSI и повышенному пожизненному риску развития не только КРР, но также и рака желудка, мозга, поджелудочной железы, кожи, эндометрия и яичников. Пациенты с синдромом Линча имеют 50–80 % пожизненного риска развития КРР.<sup>5,22,23</sup> Синдром Линча уникальным образом отличается от других наследственных раковых синдромов, поскольку проведение прямого исследования опухолевой ткани помогает в идентификации пациентов, находящихся в группе риска потенциального развития синдрома Линча, и делает последующий генетический анализ зародышевой линии более информативным. Применение расширенных

протоколов скрининга онкологических заболеваний имеет благоприятное значение для семей с синдромом Линча.

Различные руководства, в том числе руководства Национальной комплексной сети онкологических учреждений (NCCN), рекомендуют проводить скрининг всех случаев КРР на предмет потенциального наличия синдрома Линча для идентификации пациентов и семей, которые получают пользу от дальнейшего генетического анализа и консультирования.<sup>21,24-27</sup> Использование панели VENTANA MMR IHC Panel будет способствовать определению статуса MMR КРР посредством классификации случаев КРР как имеющих неизмененную или потерянную экспрессию белка MMR. Обнаружение всех четырех белков MMR в опухоли указывает на нормальную или неизмененную функцию системы MMR. Потеря экспрессии MLH1 или MSH2 почти неизменно сопровождается потерей гетеродимерного белка-партнера PMS2 или MSH6 соответственно. Тем не менее, потеря экспрессии PMS2 или MSH6 не приводит к потере экспрессии MLH1 или MSH2. Потеря экспрессии PMS2, MSH2 и (или) MSH6 соотносится с вероятным синдромом Линча, поэтому пациентов следует направлять на дополнительное тестирование и консультацию согласно клинической практике.

Потеря экспрессии белка MLH1 может указывать на спорадическое возникновение рака или потенциальный синдром Линча. В 15 % или более случаев спорадического КРР потеря белка MLH1 происходит ввиду гиперметилирования промотора *MLH1*.<sup>5,28,29</sup> Важно отметить, что мутация BRAF V600E наблюдается приблизительно в двух третях случаев опухолей, характеризующихся потерей экспрессии MLH1 по причине гиперметилирования промотора *MLH1*. И напротив, мутация BRAF V600E очень редко наблюдается в опухолях, вызванных синдромом Линча.<sup>28</sup> Таким образом, если результат окрашивания антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-MLH1 (M1)) указывает на потерю экспрессии белка MLH1, антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) может четко определить опухоль как спорадический КРР или вероятный синдром Линча.<sup>5,30</sup> При КРР потеря экспрессии белка MLH1 с положительным статусом BRAF V600E однозначно указывает на то, что опухоль имеет спорадический характер, фактически исключая синдром Линча из списка первоочередных причин возникновения злокачественного новообразования.<sup>21,31</sup> Когда потеря экспрессии белка MLH1 сопровождается отрицательным статусом BRAF V600E, это указывает на высокую вероятность наличия синдрома Линча.<sup>32</sup>

## ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) является мышиним моноклональным антителом (клон VE1) к синтетическому пептиду, представляющему аминокислотную последовательность после мутации BRAF от аминокислоты 596 до 606 (GLATEKSRWSG). Окрашивание этим специфическим к мутации антителом имеет цитоплазматический характер. При помощи этого антитела осуществляется дифференциальная диагностика мутации V600E в белке BRAF и белка BRAF дикого типа, а также остальных белков с мутацией BRAF.<sup>33, 34</sup>

При исследовании MMR методом IHC для определения потенциального синдрома Линча идентификация мутации BRAF V600E в образцах с потерей экспрессии MLH1 свидетельствует о спорадическом колоректальном раке (КРР).<sup>32</sup>

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) связывается с белком мутации BRAF V600E в фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) срезах ткани. Антитело может быть обнаружено посредством гаптенного вторичного антитела с последующей обработкой мультимерным конъюгатом HRP (пероксидазы хрена) с антителом к гаптenu (OptiView DAB IHC Detection Kit, № по каталогу 760-700 / 06396500001). После этого специфический комплекс антитела и фермента визуализируется путем осаждения продукта ферментативной реакции. Каждый этап процедуры включает инкубацию в течение строго определенного промежутка времени при заданной температуре. В конце каждой инкубации каждый аппарат BenchMark ULTRA, XT и GX промывает срезы, чтобы остановить реакцию и удалить несвязавшиеся вещества, которые могут препятствовать протеканию необходимых реакций на последующих этапах. С помощью данного аппарата также наносится ULTRA LCS (ULTRA LCS (Predilute), № по каталогу 650-210 / 05424534001) или LCS (LCS predilute, № по каталогу 650-010 / 05264839001), который позволяет свести к минимуму испарение водных реагентов с поверхности предметного стекла, содержащего образец.

Помимо окраски антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), второе предметное стекло следует окрасить мышиним моноклональным реагентом для отрицательного контроля, Negative Control (Monoclonal) (№ 760-2014 / 05266670001). Реагент для отрицательного контроля используется для оценки фонового окрашивания.

## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 50 анализов.

Один 5 мл дозатор с антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) содержит приблизительно 60 мкг мышинного моноклонального антитела.

Антитело разведено в растворе фосфатного буфера 0,1 М (pH 7,3), содержащем 0,3% белка-носителя, 0,05% Brij 35 и 0,05% ProClin300 в качестве консерванта.

Общая концентрация белка в реагенте составляет приблизительно 3 мг/мл. Концентрация специфических антител составляет приблизительно 12 мкг/мл.

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) является мышиним моноклональным антителом, полученным из очищенного супернатанта клеточной культуры.

См. соответствующую часть листа-вкладыша в упаковке набора для обнаружения VENTANA, чтобы ознакомиться с более подробным описанием: 1) принципов действия; 2) необходимых материалов и реагентов, не входящих в комплект; 3) сбора образцов тканей и подготовки к анализу; 4) процесса контроля качества; 5) принципов поиска и устранения проблем; 6) результатов; 7) общих ограничений.

## НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

В комплект поставки не входят красящие реагенты, например наборы для обнаружения VENTANA, а также вспомогательные компоненты, в том числе отрицательные и положительные тканевые контроли.

Для окрашивания требуются следующие реагенты и материалы, не входящие в комплект поставки.

- Дополнительные антитела панели VENTANA MMR IHC Panel:
  - VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№ по каталогу 760-5091 / 08033668001)
  - VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№ по каталогу 760-5094 / 08033692001)
  - VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody (№ по каталогу 760-5093 / 08033684001)
  - VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (№ по каталогу 760-5092 / 08033676001)
- Negative Control (Monoclonal) (№ по каталогу 760-2014 / 05266670001)
- Предметные стекла для микроскопа (с положительным зарядом)
- Этикетки со штрих-кодами (соответствующие реагенту для отрицательного контроля и используемому первичному антителу)
- Ксилол (гистологической степени очистки)
- Этанол или спиртосодержащий реагент (гистологической степени очистки)
  - 100%-й раствор: неразбавленный этанол или спиртосодержащий реагент.
  - 95%-й раствор: смешать 95 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 5 частями деионизированной воды.
  - 80%-й раствор: смешать 80 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 20 частями деионизированной воды.
- Деионизированная или дистиллированная вода
- OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700 / 06396500001)
- Для VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, OptiView Amplification Kit (№ по каталогу 760-099 / 06396518001 или № по каталогу 860-099 / 06718663001)
- EZ Prep Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-102 / 05279771001)
- Reaction Buffer Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-300 / 05353955001)
- ULTRA LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-210 / 05424534001) или LCS (LCS predilute № по каталогу 650-010 / 05264839001)
- ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (№ по каталогу 950-224 / 05424569001) или Cell Conditioning 1 (CC1) № по каталогу 950-124 / 05279801001)
- Hematoxylin II (№ по каталогу 790-2208 / 05277965001)
- Bluing Reagent (№ по каталогу 760-2037 / 05266769001)
- Постоянная гистологическая среда для заливки образцов (Permount Fisher № по каталогу SP15-500 или эквивалентная)
- Покровное стекло (размера, достаточного для закрытия образцов ткани, например VWR, № по каталогу 48393-060)

18. Автоматический аппарат для заключения под покровное стекло (например, Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
19. Световой микроскоп
20. Гигроскопические салфетки

## ХРАНЕНИЕ

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

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

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

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Необходимо получить срезы толщиной приблизительно 4 мкм и нанести их на положительно заряженные предметные стекла. Для окрашивания следует использовать свежие срезы тканей, поскольку антигенность тканевых срезов со временем может уменьшаться.

Данное первичное антитело можно применять для окрашивания подготовленных стандартным образом, фиксированных формалином и залитых в парафин тканей, при условии использования OptiView DAB IHC Detection Kit, а также аппарата BenchMark ULTRA. В качестве фиксатора ткани рекомендуется нейтральный формалиновый буфер 10 %. <sup>35</sup>

При использовании VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) рекомендуется, чтобы ткань в течение 2 часов после иссечения была зафиксирована в 10 % нейтральном забуференном формалине (NBF) на 12 часов на основе моделей ксенотрансплантата, полученных из клеточной линии человека A2058 (меланома) и LS411N (KPP), которые демонстрируют положительный результат на экспрессию BRAF V600E. Однако фиксация до 72 часов в 10 % NBF дала эквивалентные результаты окрашивания BRAF V600E. Приемлемое окрашивание антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) также достигалось при фиксации цинк-формалином в течение 12–72 часов.

С VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) не рекомендуется использовать спиртовой раствор формалина (AFA), 95 % этиловый спирт, Z-5, и фиксаторы PREFER. Ткани ксенотрансплантата, зафиксированные в спиртовой растворе формалина, демонстрируют нестабильные результаты окрашивания или полное их отсутствие.

Используемое количество фиксатора должно составлять от 15 до 20 объемов ткани. За 24 часа фиксатор проникает в плотную ткань не более чем на 2–3 мм, а в пористую ткань — не более чем на 5 мм. Фиксацию следует проводить при комнатной температуре (15–25 °C). <sup>14</sup>

Необходимо получить залитые в парафин срезы толщиной приблизительно 4 мкм и нанести их на положительно заряженные предметные стекла. Срезы тканей следует окрашивать немедленно после среза с блока парафина, поскольку антигенность тканевых срезов может уменьшаться со временем. Тем не менее, неокрашенные предметные стекла с тканями KPP при хранении при 5±3 °C или 30±5 °C в течение 8 недель демонстрировали аналогичную интенсивность окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) в сравнении с образцами тканей, полученными из того же блока и окрашенными антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) в 1-й день.

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

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики *in vitro* (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. Раствор ProClim 300 используется в данном реагенте в качестве консерванта. Он относится к раздражающим средствам и при контакте с кожей может стать причиной сенсибилизации. При работе с реагентом соблюдайте меры предосторожности. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. Используйте защитную одежду и перчатки.
4. Материалы человеческого или животного происхождения следует считать биологически опасными материалами и утилизировать, соблюдая все необходимые меры предосторожности.

5. Избегайте контакта реагентов с глазами и слизистыми оболочками. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды.
6. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.
7. Проконсультируйтесь с местными и (или) государственными органами в отношении рекомендованного способа утилизации.
8. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте [www.ventana.com](http://www.ventana.com).

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) предназначено для использования на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX в комбинации с OptiView DAB IHC Detection Kit и вспомогательными реагентами. В таблице 1 приведен протокол окрашивания для применения с антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Сведения о влиянии других значений времени и температуры при демаскировке антигена на устойчивость анализа к возникновению ошибок отсутствуют. Поэтому отклонение от рекомендуемых условий для демаскировки антигена, представленных в указанном протоколе окрашивания, неизвестно и может сделать ожидаемые результаты недействительными. Следует использовать и документировать надлежащие контроли. Пользователи, которые отклоняются от указанного протокола, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

Параметры автоматических процедур могут быть отображены на экране, напечатаны и отредактированы согласно процедуре, описанной в руководстве пользователя, прилагаемом к соответствующим приборам. Для получения более подробной информации об этапах процедуры иммуногистохимического окрашивания см. листок-вкладыш в упаковку OptiView DAB IHC Detection Kit.

**Табл. 1.** Протокол окрашивания для VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) антитела с применением OptiView DAB IHC Detection Kit на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX.

| Тип процедуры                                               | Метод                                        |                                     |                                     |
|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|                                                             | BenchMark<br>ULTRA<br>Аппарат                | BenchMark<br>XT<br>Аппарат          | BenchMark<br>GX<br>Аппарат          |
| Депарафинирование                                           | Выбрано                                      | Выбрано                             | Выбрано                             |
| Кондиционирование<br>клеток<br>(демаскирование<br>антигена) | Cell<br>Conditioning 1<br>64 минут,<br>100°C | Cell<br>Conditioning 1<br>64 минуты | Cell<br>Conditioning 1<br>64 минуты |
| Pre-Primary Peroxidase<br>Inhibitor                         | Выбрано                                      | Выбрано                             | Выбрано                             |
| Антитела (первичные)                                        | 16 минут, 36°C                               | 16 минут, 37°C                      | 28 минут, 37°C                      |
| OptiView HQ Linker                                          | 8 мин (по умолчанию)                         |                                     |                                     |
| OptiView HRP Multimer                                       | 8 мин (по умолчанию)                         |                                     |                                     |
| Контрастное<br>окрашивание                                  | Hematoxylin II, 4 минуты                     |                                     |                                     |
| Обработка после<br>контрокрасивания                         | Bluing, 4 минуты                             |                                     |                                     |

Отклонение от рекомендуемых условий (особенно для демаскировки антигена), представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными. Тем не менее, в связи с различиями в фиксации и обработке тканей, а также в лабораторном оборудовании и внешних условиях может потребоваться увеличение или уменьшение времени инкубации первичных антител в зависимости от отдельных образцов и предпочтений эксперта. Подробную информацию о различиях в методиках фиксации см. в разделе Immunohistochemistry: Principles and Advances (Иммуногистохимический анализ: принципы и достижения). <sup>36</sup>

## ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

### Реагент для отрицательного контроля

Настоятельно рекомендуем использовать реагент для отрицательного контроля для окрашивания смежного среза образца ткани пациента на отдельном предметном стекле, а не на предметном стекле, где образец был окрашен антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Мышиный моноклональный реагент для отрицательного контроля (Negative Control (Monoclonal), № по каталогу 760-2014 / 05266670001) рекомендуется для использования вместо первичного антитела для оценки неспецифического окрашивания. Протокол окрашивания антитела, используемого с реагентом для отрицательного контроля, должен соответствовать параметрам окрашивания первичного антитела.

### Положительный тканевый контроль

При выполнении каждой процедуры окрашивания необходимо проводить положительный тканевый контроль. Оптимальная лабораторная практика — помещение среза для положительного контроля на одно стекло с образцом ткани пациента. Такая практика позволяет распознать случаи, когда первичное антитело или другой важный реагент не оказывают должного эффекта на образец ткани пациента. Для оптимального контроля качества лучше всего подойдет образец ткани, в норме показывающий положительное окрашивание. Положительно окрашиваемые компоненты ткани служат подтверждением того, что антитела нанесены и то прибор работает надлежащим образом. Данная ткань может содержать как положительно, так и отрицательно окрашиваемые клетки или компоненты ткани и использоваться в качестве как положительного, так и отрицательного тканевого контроля. В качестве контроля следует использовать свежие образцы тканей, полученные в ходе вскрытия, биопсии или хирургических операций. Образцы следует как можно скорее подготовить или зафиксировать по процедуре, используемой для исследуемых образцов. С использованием таких образцов должен контролироваться весь процесс исследования, начиная от подготовки ткани и заканчивая окрашиванием. Использование среза ткани, фиксированного или обработанного по процедуре, отличной от процедуры тестируемого образца, позволяет обеспечить контроль всех реагентов и этапов метода, кроме фиксации и обработки ткани.

Заведомо положительные тканевые контроли следует использовать только для контроля правильности работы с обработанными тканями и тестирования реагентов, а не в качестве вспомогательного средства при постановке конкретного диагноза на основании образцов пациента. Если не наблюдается положительного окрашивания положительных тканевых контролей, результаты окрашивания тестовых образцов следует считать неверными.

Соответствующий положительный тканевый контроль по предварительным анализам будет представлять собой случай KPP с положительным результатом на антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Положительный тканевый контроль должен демонстрировать цитоплазматическое окрашивание любой интенсивности в жизнеспособной опухоли, показатели интенсивности при этом должны превышать показатели фонового окрашивания.

### Отрицательный тканевый контроль

Отрицательный тканевый контроль по предварительным анализам будет представлять собой случай KPP, с отрицательными результатами на антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Отрицательный тканевый контроль следует использовать только для проверки характеристик обработанных тканей, исследуемых реагентов и аппаратов, но не для формулировки конкретного диагноза на основании образцов пациента.

### Верификация анализа

Перед начальным использованием антитела или системы окрашивания в диагностической процедуре следует верифицировать специфичность антитела. Для этого выполняется тестирование антитела на серии тканей с известными характеристиками эффективности ИHC, представляющими клинический статус мутации BRAF V600E как в ткани с положительными и отрицательными результатами. (См. «Процедуры контроля качества», описанные ранее в этом разделе листа-вкладыша, а также рекомендации по контролю качества Программы лабораторной аккредитации коллегии американских патологов (College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program), контрольной карты по патологической анатомии<sup>37</sup> или CLSI Approved Guideline.<sup>38</sup>)

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОКРАШИВАНИЯ/ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Характер окрашивания с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) в опухолевых клетках — цитоплазматический. Квалифицированный патоморфолог присваивает клинический статус образцам KPP, окрашенным с помощью антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), на основании собственной оценки наличия или отсутствия специфического цитоплазматического окрашивания в опухолевой ткани. Положительный клинический статус присваивается случаям с однозначным цитоплазматическим окрашиванием любой интенсивности в жизнеспособной опухоли, показатели интенсивности при этом должны превышать показатели фонового окрашивания. Отрицательный клинический статус присваивается образцам, когда цитоплазматическое окрашивание в жизнеспособной опухоли отсутствует или является слабым неоднозначным. Ядерное окрашивание (слабое или сильной интенсивности) изолированных жизнеспособных опухолевых клеток и (или) скопления опухолей следует считать отрицательным.

### ОСОБЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

Антитела и реагенты компании Ventana Medical Systems, Inc. имеют оптимальную концентрацию для применения в соответствии с прилагающейся инструкцией. Отклонение от условий протокола окрашивания неизвестно и может сделать ожидаемые результаты недействительными. Пользователи советуют воздержаться от использования кислотных буферов для демаскировки антигена, поскольку эти буферы могут привести к получению неоптимального окрашивания, которое трудно интерпретировать.<sup>39</sup> Пользователи, которые отклоняются от указанного протокола, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

Образцы ткани должны быть зафиксированы в течение 2 часов после забора на протяжении не менее 12 часов в 10 % нейтральном забуференном формалине. Не рекомендуется использование для фиксации тканей 95% спирта, фиксатора PREFER, фиксатора Z-5 или спиртового раствора формалина с уксусной кислотой (AFA).

Образцы, окрашенные антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), классифицируются как образцы с положительным результатом или отрицательным результатом в зависимости от наличия или отсутствия окрашивания во всей области опухолевой ткани. Окрашивание может варьироваться в зависимости от уровня интенсивности, которая, в свою очередь, может варьироваться в зависимости от опухоли; однако интенсивность не влияет на клинический статус BRAF V600E.

Анализ некоторых образцов может быть особенно сложным в связи со следующими проблемами:

- Было обнаружено, что антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) иногда вызывает слабое цитоплазматическое и ядерное окрашивание в гладких мышцах, клетках Пуркинье мозжечка, нормальных эпителиальных клетках кишечника, энтероцитах, интерстициальных клетках яичка, надпочечнике, гипофизе, ацинарных структурах поджелудочной железы, железистых клетках кишечника и некоторых опухолевых клетках. Однако такие образцы не следует рассматривать как положительные на BRAF V600.<sup>40</sup> Кроме того, это антитело вызывало умеренное окрашивание в нейроэндокринных клетках гипофиза. Кроме того, этот реагент окрашивает реснички респираторного эпителия легких.
- Неспецифическое фоновое окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать неспецифическое фоновое окрашивание по недостаточно понятным причинам. По этой причине оценка предметного стекла, окрашенного антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), должна включать в себя сравнение предметного стекла, окрашенного срезом ткани, окрашенным реагентом для отрицательного контроля, для определения уровня неспецифического фонового окрашивания. В отдельных случаях наблюдается окрашивание ядер клеток опухоли, однако значение этого не изучено.
- Тканевые артефакты или артефакты, вызванные окрашиванием. Гистологические артефакты, возникающие в ходе обработки образцов и микротомии, также могут осложнить определение клинического статуса антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). К таким артефактам относятся, кроме прочего, градиенты фиксации и краевые эффекты, захват DAB, образование пузырьков в ядре, недостаточное окрашивание на некоторых участках ткани, разрыв или складки ткани и потеря среза ткани. В некоторых случаях может потребоваться повторное окрашивание новых срезов или получение нового образца.

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИТЕЛА VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)

### Аналитическая чувствительность/специфичность

Аналитическая чувствительность и специфичность были определены посредством окрашивания множественных образцов нормальных и опухолевых тканей человека антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Результаты приведены в таблице 2 и таблице 3. В результате окрашивания нормальных и опухолевых тканей антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) непредвиденных результатов получено не было. Исключение составили образцы, указанные в разделе «ОСОБЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ».

Табл. 2. Аналитическая чувствительность/специфичность окрашивания FFPE нормальных тканей антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)

| Ткань            | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев | Ткань                 | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|------------------|---------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------|
| Надпочечник      | 0/3                                               | Легкое                | 0/3                                               |
| Мочевой пузырь   | 0/3                                               | Лимфоузлы             | 0/3                                               |
| Костный мозг     | 0/3                                               | Мезотелий             | 0/3                                               |
| Яичник           | 0/3                                               | Поджелудочная железа  | 2/3 *                                             |
| Молочная железа  | 0/3                                               | Паращитовидная железа | 0/3                                               |
| Мозжечок         | 1/3 *                                             | Периферический нерв   | 0/5                                               |
| Головной мозг    | 0/3                                               | Простата              | 0/3                                               |
| Шейка матки      | 0/3                                               | Скелетная мышца       | 0/3                                               |
| Толстая кишка    | 5/12 *                                            | Кожа                  | 0/3                                               |
| Эндометрий       | 0/3                                               | Селезенка             | 0/3                                               |
| Пищевод          | 0/3                                               | Желудок               | 0/3                                               |
| Сердце           | 0/3                                               | Яичко                 | 2/3 *                                             |
| Гипофиз          | 3/3 **                                            | Тимус                 | 0/3                                               |
| Стенка кишечника | 2/4 *                                             | Щитовидная железа     | 0/3                                               |
| Почка            | 0/3                                               | Язык/слюнная железа   | 0/3                                               |
| Печень           | 0/3                                               | Миндалины             | 0/3                                               |

Примечание. \*Цитоплазматическое и ядерное окрашивание слабой интенсивности в клетках Пуркинье мозжечка, гладких мышц и нормальных эпителиальных клетках толстой кишки, железистых клеток кишечника, ацинарных структур поджелудочной железы и интерстициальных клеток яичка.

\*\* Умеренное окрашивание в нейроэндокринных клетках гипофиза.

При анализе всех тканей положительный или отрицательный результат окрашивания определяли при наличии специфических для тканей элементов, клинический статус BRAF V600E таких образцов не следует считать положительным.<sup>16</sup>

Табл. 3. Аналитическая чувствительность/специфичность окрашивания различных FFPE опухолевых тканей антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)

| Патология                                                         | Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Глиобластома (головной мозг)                                      | 0/1                                               |
| Менингиома (головной мозг)                                        | 0/1                                               |
| Эпендимома (головной мозг)                                        | 0/1                                               |
| Олигодендроглиома (головной мозг)                                 | 0/1                                               |
| Серозная аденокарцинома (яичник)                                  | 0/1                                               |
| Аденокарцинома (яичник)                                           | 0/1                                               |
| Панкреато-нейроэндокринное новообразование (поджелудочная железа) | 0/1                                               |
| Семинома (яичко)                                                  | 0/2                                               |
| Медуллярная карцинома (щитовидная железа)                         | 0/1                                               |
| Папиллярная карцинома (щитовидная железа)                         | 21/28                                             |
| Протоковая карцинома in situ (молочная железа)                    | 0/1                                               |
| Микроинвазивная протоковая карцинома (молочная железа)            | 0/1                                               |
| Инвазивная протоковая карцинома (молочная железа)                 | 3/131                                             |
| В-клеточная лимфома, неутонченная (селезенка)                     | 0/1                                               |
| Аденокарцинома (легкое)                                           | 1/73                                              |
| Мелкоклеточная карцинома (легкое)                                 | 0/7                                               |
| Плоскоклеточная карцинома (легкое)                                | 0/90                                              |
| Нейроэндокринная карцинома (пищевод)                              | 0/1                                               |
| Аденокарцинома (пищевод)                                          | 0/1                                               |
| Перстневидноклеточная карцинома (желудок)                         | 0/1                                               |
| Аденокарцинома (тонкая кишка)                                     | 0/1                                               |
| Стромальная саркома (тонкая кишка)                                | 1/1                                               |
| Аденокарцинома (толстая кишка)                                    | 64/234                                            |
| Гастроинтестинальная стромальная опухоль (GIST) (толстая кишка)   | 0/1                                               |
| Аденокарцинома (прямая кишка)                                     | 0/1                                               |
| Гастроинтестинальная стромальная опухоль (GIST) (прямая кишка)    | 0/1                                               |
| Меланома (прямая кишка)                                           | 0/1                                               |
| Гепатоцеллюлярная карцинома (печень)                              | 0/1                                               |
| Гепатобластома (печень)                                           | 0/1                                               |
| Светлоклеточная карцинома (почка)                                 | 0/1                                               |
| Аденокарцинома (предстательная железа)                            | 0/2                                               |
| Лейомиома (матка)                                                 | 0/0                                               |

| Патология                                                       | Кол-во положительных случаев / общее кол-во случаев |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Аденокарцинома (матка)                                          | 0/1                                                 |
| Светлоклеточная карцинома (матка)                               | 0/1                                                 |
| Плоскоклеточная карцинома (шейка матки)                         | 0/2                                                 |
| Эмбриональная рабдомиосаркома (поперечно-полосатая мускулатура) | 0/1                                                 |
| Злокачественная меланома                                        | 10/24                                               |
| Базальноклеточная карцинома (кожа)                              | 0/1                                                 |
| Плоскоклеточная карцинома (кожа)                                | 0/1                                                 |
| Нейрофиброма (поясница)                                         | 0/0                                                 |
| Нейробластома (забрюшинное пространство)                        | 0/1                                                 |
| Мезотелиома (брюшина)                                           | 0/1                                                 |
| В-клеточная лимфома, неуточненная (лимфатический узел)          | 0/2                                                 |
| Лимфома Ходжкина (Hodgkin) (лимфатический узел)                 | 1/1                                                 |
| Переходноклеточная карцинома (мочевой пузырь)                   | 0/1                                                 |
| Лейомиосаркома (мочевой пузырь)                                 | 0/1                                                 |
| Остеосаркома                                                    | 0/1                                                 |
| Веретеноклеточная рабдомиосаркома (брюшина)                     | 0/1                                                 |
| Лейомиосаркома (гладкая мускулатура)                            | 0/1                                                 |

# Внутриутробная повторяемость и межсубъектная прецизионность

Повторяемость и прецизионность окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) оценивались на аппарате BenchMark ULTRA в сочетании с OptiView DAB IHC Detection Kit.

Внутриутробная повторяемость также оценивалась с использованием 10 образцов KPP (5 положительных и 5 отрицательных для определения клинического статуса мутации BRAF V600E). Пять реплицированных предметных стекол каждого из образцов KPP окрашивались антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) на одном аппарате BenchMark ULTRA в один день. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им статус «Положительный» или «Отрицательный».

Межсубъектная прецизионность также оценивалась с использованием 10 образцов KPP (5 положительных и 5 отрицательных для определения клинического статуса мутации BRAF V600E). Реплицированные предметные стекла каждого из образцов KPP окрашивались антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) на аппарате BenchMark ULTRA в каждый из 5 непоследовательных дней. Кроме того, одно предметное стекло из каждого образца было окрашено реагентом для отрицательного контроля. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им статус «Положительный» или «Отрицательный».

Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое

окрашивание составило  $\leq 0,5$ . На основании объединенных данных всех возможных парных сочетаний исследования внутриутробной повторяемости и межсубъектной прецизионности продемонстрировали 100%-е совпадение положительных результатов (PPA), 100%-е совпадение отрицательных результатов (NPA) и общее 100%-е совпадение результатов (OPA). Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 4.

**Табл. 4.** Внутриутробная повторяемость и межсубъектная прецизионность окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), согласно выявленному клиническому статусу (положительный или отрицательный)

| Повторяемость/Точность       | Клинический статус | Совпадение |         |       |               |
|------------------------------|--------------------|------------|---------|-------|---------------|
|                              |                    | Тип        | n/N     | %     | 95% CI        |
| Внутриутробная повторяемость | Положительный      | PPA        | 25/25   | 100,0 | (86,7; 100,0) |
|                              | Отрицательный      | NPA        | 25/25   | 100,0 | (86,7; 100,0) |
|                              | Всего              | OPA        | 50/50   | 100,0 | (92,9; 100,0) |
| Межсубъектная прецизионность | Положительный      | PPA        | 50/50   | 100,0 | (92,9; 100,0) |
|                              | Отрицательный      | NPA        | 50/50   | 100,0 | (92,9; 100,0) |
|                              | Всего              | OPA        | 100/100 | 100,0 | (96,3; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

# Прецизионность между разными аппаратами BenchMark

Прецизионность между разными аппаратами BenchMark ULTRA для антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) определялась методом окрашивания реплицированных предметных стекол с 10 образцами KPP (5 с положительным и 5 с отрицательным клиническим статусом BRAF V600E) на 3 аппаратах BenchMark ULTRA с применением антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и использованием OptiView DAB IHC Detection Kit. Кроме того, одно предметное стекло из каждого образца было окрашено реагентом для отрицательного контроля.

Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им клинический статус «Положительный» или «Отрицательный». Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило  $\leq 0,5$ .

При определении прецизионности между разными аппаратами BenchMark ULTRA был проведен сравнительный анализ пар клинического статуса предметных стекол для каждого образца между аппаратами и продемонстрированными 100% PPA, NPA и OPA. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 5.

**Табл. 5.** Прецизионность между разными аппаратами BenchMark ULTRA для антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), согласно выявленному клиническому статусу (положительный или отрицательный)

| Точность                 | Клинический статус | Совпадение |       |       |               |
|--------------------------|--------------------|------------|-------|-------|---------------|
|                          |                    | Тип        | n/N   | %     | 95% CI        |
| Между разными аппаратами | Положительный      | PPA        | 30/30 | 100,0 | (88,6; 100,0) |
|                          | Отрицательный      | NPA        | 30/30 | 100,0 | (88,6; 100,0) |
|                          | Всего              | OPA        | 60/60 | 100,0 | (94,0; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

Кроме того, прецизионность между разными аппаратами для антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) определялась методом окрашивания реплицированных предметных стекол с 6 образцами KPP (2 образца, отрицательные на KPP, 2 образца KPP и 2 образца, положительные на рак щитовидной железы для определения клинического статуса BRAF V600E) на 3 аппаратах BenchMark XT и 3 аппаратах BenchMark GX с применением антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и использованием OptiView DAB IHC Detection Kit.

Было проведено 15 наблюдений на каждый образец при объединении 3 аппаратов; медиана для каждого образца определялась по этим 15 наблюдениям. Индивидуальные наблюдения одного и того же образца считались согласующимися с медианой интенсивностью сигнала образца, если их интенсивность находилась в пределах 0,5. При определении прецизионности между аппаратами BenchMark XT и BenchMark GX для каждого образца был выполнен сравнительный анализ пар по уровню интенсивности окрашивания предметного стекла. Результаты были следующими: 98,9 % OPA между 3 аппаратами BenchMark XT и 100 % OPA между 3 аппаратами BenchMark GX. Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило  $\leq 0,5$  на обоих аппаратах BenchMark XT или GX.

#### Конкордантность платформ BenchMark

Конкордантность между аппаратами BenchMark ULTRA, XT и GX для антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) была определена методом окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) образцов KPP, образцов с раком щитовидной железы и образцов с меланомой с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit. Клинический статус всех предметных стекол (положительный/отрицательный) оценивался одним и тем же патоморфологом.

Сравнение клинического статуса 228 образцов (177 образцов KPP, 27 образцов рака щитовидной железы и 24 образцов меланомы) было выполнено между GX и ULTRA, а также XT и ULTRA. Сравнения, выполненные на платформах BenchMark GX и ULTRA, продемонстрировали 98,0 %-е среднее совпадение положительных результатов (APA), 99,0 %-е среднее совпадение отрицательных результатов (ANA) и 98,7 %-е общее совпадение результатов (OPA). Сравнения, выполненные на платформах BenchMark XT и ULTRA, продемонстрировали 96,6 %-е среднее совпадение положительных результатов (APA), 98,4 %-е среднее совпадение отрицательных результатов (ANA) и 97,8 %-е OPA. Сравнение 230 образцов (179 образцов KPP, 27 образцов рака щитовидной железы и 24 образцов меланомы) для BenchMark GX и XT было выполнено на разных платформах. Сравнения, выполненные на платформах BenchMark GX и XT, продемонстрировали 98,7 %-е среднее совпадение положительных результатов (APA), 99,4 %-е среднее совпадение отрицательных результатов (ANA) и 99,1 %-е OPA.

#### Исследования прецизионности оценок эксперта

Прецизионность по каждому эксперту и между экспертами оценивалась по 20 образцам KPP (10 положительных на мутацию BRAF V600E и 10 отрицательных на мутацию BRAF V600E), окрашенным антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) при использовании OptiView DAB IHC Detection Kit на аппарате BenchMark ULTRA. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца.

Пары предметных стекол были рандомизированы и оценивались патоморфологами на предмет положительного или отрицательного клинического статуса BRAF V600E. Патоморфологам был неизвестен диагноз образцов. После четырехнедельного отмычного периода окрашенные антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) предметные стекла были повторно рандомизированы для проведения второй оценки клинического статуса BRAF V600E каждым из патоморфологов. Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило  $\leq 0,5$ .

Для определения прецизионности по каждому эксперту сравнивали исходную и повторную оценки слайда, полученные от одного и того же патоморфолога. Всего было выполнено сравнение 20 предметных стекол с срезов KPP на каждого патоморфолога. Сравнения 3 патоморфологов были объединены и продемонстрировали 100 % APA, 100 % ANA и общее 100 %-е совпадение

результатов (OPA) для прецизионности по каждому эксперту. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 6.

Для определения прецизионности между экспертами сравнивали все оценки предметных стекол (20 KPP x 2 оценки/образец x 3 патоморфолога = 120 оценок предметных стекол) со статусом модального образца для каждого образца KPP. Результаты демонстрируют 100 % PPA, NPA и OPA для прецизионности между экспертами. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 6.

**Табл. 6.** Прецизионность по каждому эксперту и между экспертами антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) для образцов KPP, согласно выявленному клиническому статусу BRAF V600E (положительный/отрицательный)

| Точность            | Клинический статус | Совпадение |         |       |               |
|---------------------|--------------------|------------|---------|-------|---------------|
|                     |                    | Тип        | n/N     | %     | 95% CI        |
| По каждому эксперту | Положительный      | APA        | 60/60   | 100,0 | (93,9; 100,0) |
|                     | Отрицательный      | ANA        | 60/60   | 100,0 | (93,9; 100,0) |
|                     | Всего              | OPA        | 60/60   | 100,0 | (94,0; 100,0) |
| Между экспертами    | Положительный      | PPA        | 60/60   | 100,0 | (94,0; 100,0) |
|                     | Отрицательный      | NPA        | 60/60   | 100,0 | (94,0; 100,0) |
|                     | Всего              | OPA        | 120/120 | 100,0 | (96,9; 100,0) |

Примечание. Для оценки по каждому эксперту 95% доверительные интервалы для APA и ANA были рассчитаны по методу Клоппера-Пирсона; 95% доверительный интервал для OPA 95% CI был рассчитан по методу бутстреп. Для оценки между экспертами 95% доверительные интервалы были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

#### Прецизионность между партиями

Прецизионность между партиями антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) была определена методом анализа 3 производственных партий антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), каждая с использованием предметных стекол из 10 образцов KPP (5 с положительным и 5 с отрицательным результатом на мутацию BRAF V600E) на аппарате BenchMark ULTRA с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit.

Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем их оценку провел один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов и номер партии антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило  $\leq 0,5$ .

При определении прецизионности между партиями антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) клинический статус BRAF V600E, полученный при оценке каждого предметного стекла, сравнивался со статусом модального образца для каждого образца. Показатели OPA, PPA, и NPA между партиями антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) составили 100 %, продемонстрировав, что окрашивание антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) является воспроизводимым между партиями антитела.

Сводные данные полученных результатов прецизионности между партиями антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) приведены в таблице 7.

**Табл. 7.** Прецизионность между партиями для антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), согласно выявленному клиническому статусу (положительный или отрицательный)

| Точность       | Клинический статус | Совпадение |       |       |               |
|----------------|--------------------|------------|-------|-------|---------------|
|                |                    | Тип        | n/N   | %     | 95% CI        |
| Между партиями | Положительный      | PPA        | 45/45 | 100,0 | (92,1; 100,0) |
|                | Отрицательный      | NPA        | 45/45 | 100,0 | (92,1; 100,0) |
|                | Всего              | OPA        | 90/90 | 100,0 | (95,9; 100,0) |

Примечание. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

### Исследование воспроизводимости результата между лабораториями

Исследование воспроизводимости результата между лабораториями для панели VENTANA MMR IHC Panel было проведено для демонстрации воспроизводимости каждого анализа панели VENTANA MMR IHC Panel для определения клинического статуса. В исследование было включено 6 образцов ткани KPP (3 с неизменной экспрессией и 3 с потерянной экспрессией) для каждого белка MMR и 16 образцов ткани KPP (8 положительных и 8 отрицательных) для определения BRAF V600E. Циклы проводились на 3 аппаратах BenchMark ULTRA в каждый из 5 непоследовательных дней за 21-дневный период в трех независимых лабораториях. Каждое окрашенное антителом предметное стекло объединялось с H&E (гематоксилином и эозином) и предметным стеклом, окрашенным реагентом для отрицательного контроля, из того же образца. Все наборы предметных стекол были рандомизированы и оценены в общей сложности 6 экспертами (по 2 в каждом исследовательском центре), которые не знали заранее, каков клинический статус MMR в образцах набора исследования. Для каждого из 40 образцов в исследовании было проведено 30 наблюдений по всем дням, исследовательским центрам и экспертам. Эталонный статус модального образца был получен для каждого образца на основании наиболее часто наблюдаемого статуса в 30 наблюдениях. Всего в исследовании было проведено 1200 наблюдений для всех пяти белков. Для всех оцениваемых образцов уровень приемлемости в отношении морфологических структур и фона в данном исследовании составил 100 %. Сводные данные по объединенным (для всех пяти белков) статистическим показателям совпадений и индивидуальных наблюдений приведены в таблице 8.

**Табл. 8.** Совпадения между панелью VENTANA MMR IHC Panel и эталонным статусом модального образца

| Межлабораторная повторяемость | Клинический статус       | Совпадение |           |      |               |
|-------------------------------|--------------------------|------------|-----------|------|---------------|
|                               |                          | Тип        | n/N       | %    | 95% CI        |
| Все белки                     | Неизменная/положительный | PPA        | 598/600   | 99,8 | (98,7; 100,0) |
|                               | Потерянная/отрицательный | NPA        | 593/600   | 98,9 | (97,4; 99,5)  |
|                               | Всего                    | OPA        | 1191/1200 | 99,4 | (98,6; 99,7)  |

Примечание. Клинический статус определяется как «Неизменная» или «Потерянная» для экспрессии белка MMR и «Положительный» или «Отрицательный» для белка BRAF V600E. Значения 95 % доверительного интервала были рассчитаны с использованием подхода на основе обобщенной оценочной модели (GLMM).

Кроме того, для антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) были проведены парные сравнения между исследовательскими центрами, межсубъектными показателями и показателями между экспертами. Для BRAF V600E этот набор исследований включал в общем 480 наблюдений. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 9. Данные обозначают повторяемость анализа по 5 дням, 3 исследовательским центрам и 6 экспертам.

**Табл. 9.** Показатели парных совпадений межлабораторной повторяемости для антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), согласно выявленному клиническому статусу (положительный или отрицательный)

| Межлабораторная повторяемость                                     |               | Совпадение |         |       |               |
|-------------------------------------------------------------------|---------------|------------|---------|-------|---------------|
|                                                                   |               | Тип        | n/N     | %     | 95% CI        |
| Между исследовательскими центрами<br>(3 исследовательских центра) |               | APA        | 960/972 | 98,8  | (97,2; 100,0) |
|                                                                   |               | ANA        | 936/948 | 98,7  | (97,0; 100,0) |
|                                                                   |               | OPA        | 948/960 | 98,8  | (97,1; 100,0) |
| Межсубъектная<br>(5 непоследовательных<br>дней)                   | Лаборатория А | APA        | 320/320 | 100,0 | (98,8; 100,0) |
|                                                                   |               | ANA        | 320/320 | 100,0 | (98,8; 100,0) |
|                                                                   |               | OPA        | 320/320 | 100,0 | (98,8; 100,0) |
|                                                                   | Лаборатория В | APA        | 320/320 | 100,0 | (98,8; 100,0) |
|                                                                   |               | ANA        | 320/320 | 100,0 | (98,8; 100,0) |
|                                                                   |               | OPA        | 320/320 | 100,0 | (98,8; 100,0) |
|                                                                   | Лаборатория С | APA        | 320/332 | 96,4  | (92,0; 100,0) |
|                                                                   |               | ANA        | 296/308 | 96,1  | (90,4; 100,0) |
|                                                                   |               | OPA        | 308/320 | 96,3  | (91,3; 100,0) |
| Между экспертами (2 патоморфолога на<br>исследовательский центр)  |               | APA        | 242/243 | 99,6  | (98,8; 100,0) |
|                                                                   |               | ANA        | 236/237 | 99,6  | (98,7; 100,0) |
|                                                                   |               | OPA        | 239/240 | 99,6  | (98,8; 100,0) |

Примечание. Значения 95 % доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп; в случаях, где показатель точечной оценки составлял 100 %, использовался метод оценки Уилсона.

### Исследование точности: сравнение метода получения результатов с использованием панели VENTANA MMR IHC Panel и молекулярного тестирования (секвенирование ДНК и гиперметилирование промотора MLH1)

Исследование было проведено для сравнения эффективности использования панели VENTANA MMR IHC Panel и молекулярного тестирования, в том числе комплексной панели образцов тканей толстой кишки для секвенирования ДНК с целью идентификации KPP, который (i) характеризуется дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR) и (ii) содержит мутацию BRAF V600E. Панель образцов тканей толстой кишки для секвенирования ДНК включала геномный анализ вариаций, присутствующих в генах MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, EPCAM), BRAF, играющих важное значение при канцерогенезе (например PIK3CA, KRAS, NRAS, ERBB2). Секвенирование включало все экзоны, интронные и фланкирующие последовательности, а также значимые делеции, дупликации и мозаицизм.

Для исследования последовательности образцов KPP окрашивались H&E (гематоксилином и эозином) и оценивались на предмет надлежащей фиксации и морфологии, включая наличие клеточных элементов (опухоль и клетки внутренних контролей). Каждый образец оценивали, чтобы определить, состоит ли образец из опухолевых клеток как минимум на 50 %. Такая оценка была проведена для обеспечения достаточного количества опухолевых клеток в образце согласно рекомендациям для проведения молекулярного тестирования. После оценки в исследование было включено 105 образцов, соответствующих этим критериям. Кроме того, были включены 13 образцов KPP, демонстрирующих клинический статус «Потерянная», установленный методом ИHC, чтобы гарантировать, что потеря экспрессии каждого маркера будет отражена в исследовании. Срезы всех образцов исследования были окрашены методом ИHC с использованием панели VENTANA MMR IHC Panel и соответствующих реагентов для отрицательного контроля. Дополнительные срезы были обработаны с помощью панели образцов ткани толстой

ишки для секвенирования ДНК. Гиперметилирование промотора *MLH1* — один из механизмов, который может привести к потере экспрессии белка *MLH1*, и его связывают со спорадическим КРП, а не с потенциальным синдромом Линча. Поэтому все образцы с потерей экспрессии *MLH1*, идентифицированные методом ИНС при проведении исследования, были проанализированы на предмет гиперметилирования промотора *MLH1*.

С окончательным набором исследования, состоящим из 118 образцов, в анализ были включены показатели PPA и NPA для всех объединенных маркеров (т. е. все объединенные наблюдаемые значения), при этом молекулярное тестирование выступало в качестве эталона для сравнения ИНС. Анализ включал в себя сравнение статуса белка MMR (неизменная/потерянная) с молекулярным статусом, определенным как «нормальный» (нет патогенных мутаций, отрицателен в отношении гиперметилирования промотора *MLH1* и BRAF дикого типа (отсутствие мутации V600E)) или «аномальный» (наличие патогенных мутаций, положителен в отношении гиперметилирования промотора *MLH1* и (или) положителен в отношении мутации BRAF V600E). Показатели точечной оценки составили 99,4 % PPA, 93,5 % NPA и 98,8 % OPA, как показано в таблице 10.

Также был проведен сводный анализ для сравнения четырех ИНС маркеров MMR (без антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) с результатами молекулярного тестирования. Показатели точечной оценки составили 99,3 % PPA, 89,7 % NPA и 98,5 % OPA, как показано в таблице 11.

В рамках дополнительного анализа сравнили результаты исследования методом ИНС для четырех маркеров MMR с результатами молекулярного тестирования генов MMR на уровне одного образца, чтобы включить в исследование статус всех маркеров и получить результат dMMR/pMMR при использовании двух методов. Результаты данного анализа представлены в таблице 12, OPA при применении двух методов составляет 97,4 %.

В рамках исследования было выполнено сравнение статуса MMR при исследовании методом ИНС и статуса молекулярного тестирования генов MMR для отдельных маркеров MMR. Показатель OPA для каждого маркера MMR при сравнении с объединенными результатами панели образцов ткани толстой кишки для секвенирования ДНК и анализа гиперметилирования промотора *MLH1* составлял 100,0 % для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), 99,1 % для VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, 98,3 % для VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody и 96,6 % для антитела VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

Клинический статус BRAF V600E в образцах КРП, полученных методом ИНС с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), также сравнивался с результатами оценки мутационного статуса BRAF, определенными с помощью секвенирования ДНК. Показатели PPA, NPA и OPA ИНС тестирования с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и применением метода секвенирования ДНК в качестве эталона составили 100 % (таблица 13). Было проведено дополнительное тестирование для подтверждения способности антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) к четкому определению образцов КРП, демонстрирующих потерю экспрессии белка *MLH1*. Из 23 образцов, положительных в отношении BRAF V600E, в 20 методом ИНС была выявлена потеря экспрессии белка *MLH1*, и они были положительны в отношении гиперметилирования промотора *MLH1*. Эти данные указывают на тесную связь положительного статуса BRAF V600E и статуса гиперметилирования промотора *MLH1*. Оставшиеся образцы представляли собой образцы с pMMR (неизменная экспрессия для всех белков MMR). Все образцы, положительные на BRAF V600E, идентифицировали как образцы со спорадическим КРП. Результаты подтвердили, что антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) правильно идентифицирует образцы КРП, имеющие мутацию BRAF V600E. Также данные подтвердили возможность использования антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) для дифференциации спорадического КРП и вероятного синдрома Линча при отсутствии экспрессии белка *MLH1*.

**Табл. 10.** Совокупный анализ для совпадений панели VENTANA MMR IHC Panel между ИНС и молекулярным тестированием

| Статус*<br>(Молекулярное<br>тестирование/ИНС) | Совпадение |         |      |               |
|-----------------------------------------------|------------|---------|------|---------------|
|                                               | Тип        | n/N     | %    | 95% CI        |
| Нормальный/неизменная                         | PPA        | 523/526 | 99,4 | (98,7; 100,0) |
| Аномальный/потерянная                         | NPA        | 58/62   | 93,5 | (87,1; 98,6)  |

| Статус*<br>(Молекулярное<br>тестирование/ИНС) | Совпадение |         |      |              |
|-----------------------------------------------|------------|---------|------|--------------|
|                                               | Тип        | n/N     | %    | 95% CI       |
| Всего                                         | OPA        | 581/588 | 98,8 | (98,0; 99,7) |

\* При использовании метода ИНС статус экспрессии белка системы MMR — неизменная или потерянная. Для этого анализа отрицательные и положительные на BRAF V600E образцы были включены в категории «Неизменная» или «Потерянная» соответственно. Молекулярное тестирование указывает на отсутствие (нормальный) или присутствие (аномальный) потенциальных патогенных мутаций или гиперметилирования промотора *MLH1*. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп.

**Табл. 11.** Совокупный анализ совпадений четырех маркеров MMR (без антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) между ИНС и молекулярным тестированием

| Статус* (Молекулярное<br>тестирование/ИНС) | Совпадение |         |      |               |
|--------------------------------------------|------------|---------|------|---------------|
|                                            | Тип        | n/N     | %    | 95% CI        |
| Нормальный/неизменная                      | PPA        | 428/431 | 99,3 | (98,4; 100,0) |
| Аномальный/потерянная                      | NPA        | 35/39   | 89,7 | (79,4; 97,7)  |
| Всего                                      | OPA        | 463/470 | 98,5 | (97,3; 99,6)  |

\* При использовании метода ИНС статус экспрессии белка — неизменная или потерянная. Молекулярное тестирование указывает на отсутствие (нормальный) или присутствие (аномальный) потенциальных патогенных мутаций или гиперметилирования промотора *MLH1*. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны по методу бутстреп.

**Табл. 12.** Совпадения четырех маркеров MMR и результатов молекулярного тестирования для определения статуса MMR (dMMR/pMMR)

| Статус MMR* | Совпадение |         |      |              |
|-------------|------------|---------|------|--------------|
|             | Тип        | n/N     | %    | 95% CI       |
| pMMR        | PPA        | 79/80   | 98,8 | (93,3; 99,8) |
| dMMR        | NPA        | 35/37   | 94,6 | (82,3; 98,5) |
| Всего       | OPA        | 114/117 | 97,4 | (92,7; 99,1) |

\* При использовании метода ИНС статус pMMR образца формулируется как «Неизменная» для всех MMR-белков, в то время как при статусе dMMR наблюдается потеря экспрессии одного или нескольких MMR-белков. В рамках молекулярного тестирования статус pMMR представляет собой отсутствие патогенных мутаций или гиперметилирования промотора *MLH1*, в то время как статус dMMR представляет собой наличие патогенных мутаций или гиперметилирования промотора *MLH1*. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

**Табл. 13.** Совпадения между методом ИНС с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и молекулярным тестированием

| BRAF V600E<br>Статус<br>(Молекулярное<br>тестирование/ИНС) | Совпадение |         |       |               |
|------------------------------------------------------------|------------|---------|-------|---------------|
|                                                            | Тип        | n/N     | %     | 95% CI        |
| Положительный/аномальный                                   | PPA        | 23/23   | 100,0 | (85,7; 100,0) |
| Отрицательный/нормальный                                   | NPA        | 95/95   | 100,0 | (96,1; 100,0) |
| Всего                                                      | OPA        | 118/118 | 100,0 | (96,8; 100,0) |

Статус для BRAF V600E был определен как «положительный» или «отрицательный» по результатам ИНС и «аномальный» (присутствие мутации V600E) или «нормальный» (BRAF дикого типа) по результатам молекулярного тестирования.

Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием метода оценки Уилсона.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yuan L, Chi Y, Chen W, Chen X, Wei P, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(11):20988-21000.
2. Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(10):1269-1277.
3. Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(11):1393-1406.
4. Tiwari AK, Roy HK, Lynch HT. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. *QJM*. 2016;109(3):151-158.
5. Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(5):591-604.
6. Silva FCC, Torrezan GT, Ferreira JRO, Oliveira LP, Begnami M, et al. Germline Mutations in MLH1 Leading to Isolated Loss of PMS2 Expression in Lynch Syndrome: Implications for Diagnostics in the Clinic. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(6):861-864.
7. Boyer JC, Umar A, Risinger JI, Lipford JR, Kane M, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 1995;55(24):6063-6070.
8. Lawes DA, Pearson T, Sengupta S, Boulos PB. The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. *Br J Cancer*. 2005;93(4):472-477.
9. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(10):919-932.
10. Peltomäki P. Role of DNK mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(6):1174-1179.
11. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer*. 1996;78(6):1149-1167.
12. Caldes T, Godino J, Sanchez A, Corbacho C, De la Hoya M, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2004;12(3):621-629.
13. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, et al. Value of immunohistochemical detection of DNK mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(1):96-104.
14. Cunningham JM, Tester DJ, Thibodeau SN. Mutation detection in colorectal cancers: direct sequencing of DNK mismatch repair genes. *Methods Mol Med*. 2001;50:87-98.
15. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-954.
16. Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol*. 2011;223(2):219-229.
17. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet*. 2004;41(9):664-668.
18. Jin M, Hampel H, Zhou X, Schunemann L, Yearsley M, et al. BRAF V600E mutation analysis simplifies the testing algorithm for Lynch syndrome. *Am J Clin Pathol*. 2013;140(2):177-183.
19. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(1 Pt 1):191-195.
20. Tacci E, Schiavoni G, Forconi F, Santi A, Trentin L, et al. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. *Blood*. 2012;119(1):192-195.
21. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, et al. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2014;57(8):1025-1048.
22. Egoavil C, Alenda C, Castillejo A, Paya A, Peiro G, et al. Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers. *PLoS One*. 2013;8(11):e79737.
23. Connell LC, Mota JM, Braghiroli MI, Hoff PM. The Rising Incidence of Younger Patients With Colorectal Cancer: Questions About Screening, Biology, and Treatment. *Curr Treat Options Oncol*. 2017;18(4):23.
24. Provenzale D, Gupta S, Ahnen DJ, Bray T, Cannon JA, et al. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016;14(8):1010-1030.
25. Balmana J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D, Group EGW. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 2013;24 Suppl 6:v73-80.
26. Evaluation of Genomic Applications in P, Prevention Working G. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet Med*. 2009;11(1):35-41.
27. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(4):261-268.
28. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet*. 2012;49(3):151-157.
29. Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting DNK mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. *Semin Diagn Pathol*. 2015;32(5):352-361.
30. Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, Gylling A, Lahtinen L, et al. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Virchows Arch*. 2013;463(5):613-621.
31. Toon CW, Chou A, DeSilva K, Chan J, Patterson J, et al. BRAFV600E immunohistochemistry in conjunction with mismatch repair status predicts survival in patients with colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2014;27(5):644-650.
32. Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer*. 2004;108(2):237-242.
33. Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, et al. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathol*. 2011;122(1):11-19.
34. Capper D, Berghoff AS, Magerle M, Ilhan A, Wohrer A, et al. Immunohistochemical testing of BRAF V600E status in 1,120 tumor tissue samples of patients with brain metastases. *Acta Neuropathol*. 2012;123(2):223-233.
35. Carson FL, Hladik C, Cappellano CH, Pathology ASfC. Histotechnology: A Self-Instructional Text: American Society for Clinical Pathology; 2015.
36. Roche PC, Hsi ED, Firfer BL. Immunohistochemistry: Principles and Advances. Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology, 7th Edition: American Society of Microbiology; 2006.
37. Rabinovitch A. The College of American Pathologists laboratory accreditation program. Accreditation and Quality Assurance. 2002;7(11):473-476.
38. C.S.I. Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. C.S.I document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). C.S.I, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
39. Kuan SF, Navina S, Cressman KL, Pai RK. Immunohistochemical detection of BRAF V600E mutant protein using the VE1 antibody in colorectal carcinoma is highly concordant with molecular testing but requires rigorous antibody optimization. *Hum Pathol*. 2014;45(3):464-472.
40. Day F, Muranyi A, Singh S, Shanmugam K, Williams D, et al. A mutant BRAF V600E-specific immunohistochemical assay: correlation with molecular mutation status and clinical outcome in colorectal cancer. *Target Oncol*. 2015;10(1):99-109.

#### ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW и логотип VENTANA являются товарными знаками Roche.

Все остальные товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

© 2019 Ventana Medical Systems, Inc. и Roche Diagnostics International, Inc.

#### КОНТАКТЫ



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
D-68305 Mannheim  
Germany

[www.ventana.com](http://www.ventana.com)



## Приложение 1 (Раздел специально предназначен для инструкции по применению на русском языке.) V1.0

### Полное наименование изделия на русском языке

Первичное мышиное моноклональное антитело для качественного обнаружения V600E в белке BRAF иммуногистохимическим методом в диагностике *in vitro* к иммуногистохимическим автоматическим серии BenchMark (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody)

(далее по тексту может использоваться антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Primary Antibody, антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), реагент, антитело)

### Назначение для обращения на территории Российской Федерации

Первичное мышиное моноклональное антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody предназначено для качественного обнаружения V600E в белке BRAF в фиксированных формалином и залитых в парафин срезах ткани иммуногистохимическим методом в диагностике *in vitro* к иммуногистохимическим автоматическим серии BenchMark и является частью панели VENTANA MMR IHC Panel (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody). Результаты анализировать должны интерпретироваться квалифицированным патоморфологом с учетом результатов гистологического исследования, клинической картины и соответствующих контролей. Данные антитела предназначены для профессиональной диагностики *in vitro* (IVD).

### Состав (дополнение)

Первичное мышиное моноклональное антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody содержит следующие материалы животного происхождения:

1.Название материала – Козий глобулин (P/N 10043)

Характер – Потенциальный возбудитель инфекции\*

Тип – Белок

Источник – Животное (коза)

2.Название материала – Казеин (P/N 10105)

Характер – Потенциальный возбудитель инфекции\*

Тип – Белок из коровьего молока

Источник – Животное (корова)

3.Название материала – ЭМБРИОНАЛЬНАЯ БЫЧЬЯ СЫВОРОТКА (FETAL BOVINE SERUM — FBS) (P/N 12010)

Характер – Потенциальный возбудитель инфекции\*

Тип – Белок, полученный из плазмы

Источник – Кровь эмбрионов крупного рогатого скота

\* Известно либо крайне вероятно, что биологические материалы, являющиеся потенциальными возбудителями инфекции, содержат жизнеспособные микроорганизмы или иные инфекционные агенты, которые могут вызывать болезни человека. Для определения инфекционного характера этих материалов были проведены соответствующие испытания. Используемые в производстве материалы животного происхождения получены от животных прошедших надлежащий ветеринарный контроль.

### Принцип процедуры (дополнение)

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) является мышиным моноклональным антителом (клон VE1) к синтетическому пептиду, представляющему аминокислотную последовательность после мутации BRAF от аминокислоты 596 до 606 (GLATEKSRWVG). Окрашивание этим

специфическим к мутации антителом имеет цитоплазматический характер. При помощи этого антитела осуществляется дифференциальная диагностика мутации V600E в белке BRAF и белка BRAF дикого типа, а также остальных белков с мутацией BRAF.

При исследовании MMR методом IHC для определения потенциального синдрома Линча идентификация мутации BRAF V600E в образцах с потерей экспрессии MLH1 свидетельствует о спорадическом колоректальном раке (КРР).

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) связывается с белком мутации BRAF V600E в фиксированных формалином и залитых в парафин срезах ткани. Антитело может быть обнаружено посредством гаптенного вторичного антитела с последующей обработкой мультимерным конъюгатом HRP (пероксидазы хрена) с антителом к гаптену (OptiView DAB IHC Detection Kit). После этого специфический комплекс антитела и фермента визуализируется путем осаждения продукта ферментативной реакции. Каждый этап процедуры включает инкубацию в течение строго определенного промежутка времени при заданной температуре. В конце каждой инкубации каждый аппарат VENTANA BenchMark ULTRA, VENTANA BenchMark XT и VENTANA BenchMark GX промывает срезы, чтобы остановить реакцию и удалить несвязавшиеся вещества, которые могут препятствовать протеканию необходимых реакций на последующих этапах. С помощью данного аппарата также наносится ULTRA LCS (Жидкое покрывное стекло высокотемпературное, разведенное) или LCS (Pre-dilute) (Жидкое покрывное стекло высокотемпературное, разведенное), которое позволяет свести к минимуму испарение водных реагентов с поверхности предметного стекла, содержащего образец.

Помимо окраски антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), второе предметное стекло следует окрасить отрицательным контролем Mouse IG (Negative Control Mouse IG).

Реагент для отрицательного контроля используется для оценки фонового окрашивания.

Процедура окрашивания данным антителом различных тканевых срезов идентична.

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

### Клиническое значение (дополнение)

**Обзор репарации неспаренных оснований ДНК (MMR) — клиническое применение**

Репарация неспаренных оснований ДНК (MMR) — хорошо описанный механизм идентификации и удаления несовпадающих нуклеотидных оснований в ДНК. Несовпадение пар оснований вызывает структурные изменения в ДНК. Четыре ключевых белка MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) распознают неспаренные основания ДНК и координируют процессы его удаления и устранения последующего разрыва цепочки ДНК. MSH2 и MSH6 образуют гетеродимер, который сканирует ДНК и связывает несоответствующие участки. Затем конформация комплекса MSH2/MSH6 изменяется с расходом АТФ, и связывает гетеродимер MLH1/PMS2. Этот комплекс облегчает связывание нуклеаз, ДНК-полимераз и связанных с ними белков, что приводит к удалению несоответствующего нуклеотида и репарации образовавшегося разрыва. Несовпадение оснований может быть обусловлено ошибками в репликации или рекомбинации ДНК, либо повреждением под действием факторов окружающей среды. Накопление ошибок может привести к потере активности MMR и увеличению количества мелких

## Приложение 1 (Раздел специально предназначен для инструкции по применению на русском языке.) V1.0

вставок или делеций в микросателлитных областях ДНК, и этот фенотип называют микросателлитной нестабильностью (microsatellite instability — MSI). По мере накопления в геноме этих ошибок накапливаются и мутации в генах, связанных с развитием рака, что в итоге может привести к появлению злокачественных новообразований.

При спорадическом KPP могут возникать соматические мутации и/или эпигенетические изменения, такие как промоторное гиперметилирование, которые могут инактивировать оба аллеля гена MMR. Это приводит к потере экспрессии белков и статусу дефицита MMR. Синдром Линча — наследственное заболевание, при котором доминантная аутосомная генеративная мутация инактивирует один из аллелей гена MMR. Однако второй аллель функционирует, и активность MMR сохранена. Мутации или эпигенетические изменения, влияющие на второй аллель, могут привести к потере экспрессии белка MMR в отдельных клетках, и таким образом вызвать дефицит MMR. Это может привести к накоплению мутаций во всем геноме, потенциально в генах, связанных с раком, что увеличивает риск развития рака.

### Панель антител MMR и BRAF V600E для dMMR и при подозрении на синдром Линча.

Статус MMR в опухоли можно определить методом иммуногистохимии для MLH1, PMS2, MSH2, MSH6. Обнаружение всех четырех белков в ткани опухоли указывает на нормальное (т. е. неизмененное) состояние системы репарации ошибок репликации. Потеря экспрессии MLH1 почти всегда сопровождается потерей партнера-гетеродимера PMS2. При спорадическом KPP экспрессия гена MLH1 может быть подавлена гиперметилированием его промотора. При KPP с гиперметилированием промотора MLH1 и потерей белка MLH1 оказалось тесно связано наличие мутации BRAF V600E. Опухоли, положительные на BRAF V600E, обычно оказываются спорадическими. Поэтому, если результаты анализа на anti-MLH1 (M1) указывают на потерю белка MLH1, для стратификации опухоли как спорадической или вероятного синдрома Линча можно использовать IGHX тест с anti-BRAF V600E. Если в опухоли выявлена потеря MLH1 и тест с BRAF V600E отрицательный, необходимо провести дополнительное тестирование для определения состояния гиперметилирования промотора MLH1. Если тесты на состояние BRAF V600E и гиперметилирование промотора MLH1 отрицательные, потеря белка MLH1 указывает на вероятный синдром Линча, и необходимо дополнительное тестирование в соответствии с действующими рекомендациями.

Использование метода иммуногистохимии для PMS2, MSH2 и MSH6 позволяет более прямо оценить мутационный статус генеративной линии микроорганизмов. Потеря PMS2 на фоне экспрессии MLH1 или потеря экспрессии MSH2 или MSH6 свидетельствует, что в опухоли потерян соответствующий белок MMR, и согласуется с диагнозом вероятного синдрома Линча. Всех лиц с подозрением на синдром Линча следует направлять на генетическое консультирование и дальнейшее генетическое тестирование для подтверждения предполагаемой генеративной мутации. Таким образом, всем лицам с диагностированным KPP следует провести тестирование на синдром Линча в соответствии с действующими клиническими рекомендациями.

### Срок годности

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Primary Antibody стабильно максимально 24 месяца с даты производства. Дату производства см. на упаковке.

VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Primary Antibody следует хранить при 2-8°C. Не замораживать!

При вскрытой упаковке флакон-дозатор с раствором антител необходимо хранить в холодильнике в вертикальном положении до истечения срока годности, указанного на этикетке.

На каждом флаконе-дозаторе с раствором антител указан срок годности. Не использовать антитело после истечения срока годности.

### Стабильность

До вскрытия упаковки дозатор с реагентом можно хранить — максимально 24 месяца с даты производства (дату производства см. на упаковке).

После вскрытия дозатор с реагентом можно хранить при 2-8 °C — максимально 24 месяца с даты производства (дату производства см. на упаковке).

Стабильность установленного на прибор антитела после вскрытия дозатора — не менее 8 дней при температуре не более 32°C.

### Меры предосторожности и предупреждения (дополнение)

-Только для in vitro диагностики (IVD).

-Только для профессионального использования медицинским персоналом клиничко-диагностических лабораторий.

### Предупреждения:



-H317 — Может вызывать аллергическую кожную реакцию.

-P261 — Избегать вдыхания пыли/дыма/газа/тумана/паров/распылителей жидкости.

-P272 — Не выносить загрязненную одежду с рабочего места.

-P280 — Пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/средствами защиты глаз/лица.

-P333+P313 — При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.

-P362+P364 — Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.

-P501 — Удалить содержимое/контейнер в ...

### Сбор и подготовка материала для исследования (дополнение)

Необходимо получить срезы толщиной приблизительно 4-6 мкм и нанести их на положительно заряженные предметные стекла.

Процедура получения тканевых срезов идентична для разных видов ткани.

### Комплект поставки

Первичное мышиное моноклональное антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody поставляется в пластиковом дозаторе, упакованном в коробку из мелованной бумаги. Один дозатор содержит достаточное количество реагента для проведения 50 анализов.

На каждой картонной коробке находится магнитная «кнопка памяти», которая содержит всю необходимую информацию о реагенте. Более подробно о «кнопке памяти» читайте в Руководстве по эксплуатации к иммуноштейнерам автоматическим серии Ventana BenchMark.

### Показания к применению

Первичное мышиное моноклональное антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody предназначено для качественного обнаружения V600E в белке BRAF в фиксированных формалином и залитых в парафин срезах ткани иммуногистохимическим методом в диагностике in vitro к иммуноштейнерам автоматическим серии BenchMark и является частью панели VENTANA MMR IHC Panel (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody). Результаты анализов должны интерпретироваться квалифицированным патоморфологом с учетом результатов гистологического исследования, клинической картины и соответствующих контролей. Данные антитела предназначены для профессиональной диагностики in vitro (IVD).

### Противопоказания к применению

Противопоказаний в рамках установленного назначения не имеет.

### Побочные действия

Не применимо, т.к. медицинское изделие предназначено для лабораторной диагностики.

# **Приложение 1 (Раздел специально предназначен для инструкции по применению на русском языке.) V1.0**

## **Интерпретация окрашивания / ожидаемые результаты (дополнение)**

### **Ткань пациента**

Квалифицированный специалист классифицирует ткани по общей интенсивности специфического окрашивания по шкале 0 – 3+ только в справочных целях. Ткань пациента должна оцениваться в соответствии с критериями оценки интенсивности окрашивания, приведенными в Таблице 1.

Таблица 1. Критерии оценки интенсивности окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1).

| Наблюдение под микроскопом                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Оценка        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Клетки не имеют окрашивания цитоплазмы, соответствующего антителу anti-BRAF V600E (VE1)                                                                                                                                                                                                                                                               | 0             |
| Клетки со слабым окрашиванием цитоплазмы, соответствующим антителу anti-BRAF V600E (VE1)                                                                                                                                                                                                                                                              | 1             |
| Клетки с умеренным окрашиванием цитоплазмы, соответствующим антителу anti-BRAF V600E (VE1)                                                                                                                                                                                                                                                            | 2             |
| Клетки с сильным окрашиванием цитоплазмы, соответствующим антителу anti-BRAF V600E (VE1)                                                                                                                                                                                                                                                              | 3             |
| Определение реактивности невозможно. Включает некроз, отсутствие опухоли, краевые эффекты, отсутствие ткани или артефакты. Краевые эффекты определяются в присутствии биоптатов ткани, но в связи с гидрофобными недостатками предметных стекол с срезами ткани края ткани остаются неокрашенными после первичного окрашивания или контр-окрашивания. | Неоднозначный |

Клинический статус ткани, окрашенной антителом anti-BRAF V600E (VE1), присваивается как «Положительный клинический статус» случаям с однозначным цитоплазматическим окрашиванием любой интенсивности (равной 1 или более) в жизнеспособной опухоли, показатели интенсивности при этом должны превышать показатели фоновое окрашивания.

«Отрицательный клинический статус» присваивается образцам, когда цитоплазматическое окрашивание в жизнеспособной опухоли отсутствует или является слабым неоднозначным.

Ядерное окрашивание (слабой или сильной интенсивности) изолированных жизнеспособных опухолевых клеток и (или) скопления опухолей следует считать отрицательным.

Приемлемость морфологии тканей оценивают для каждого отдельного случая, используя критерии, описанные в Таблице 2.

Таблица 2 - Критерии приемлемости морфологии

| Интерпретация | Наблюдение с помощью микроскопа                                                                              |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Приемлемое    | Исследуемые клеточные элементы визуализируются, что позволяет провести клиническую интерпретацию окрашивания |
| Неприемлемое  | Исследуемые клеточные элементы не визуализируются, что мешает провести клиническую интерпретацию окрашивания |

Морфология тканей, окрашенных антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1), должна сохраняться как минимум у 90% окрашенных образцов.

### **Неспецифическое фоновое окрашивание антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)**

Неспецифическое фоновое окрашивание представляет собой непредвиденное окрашивание, отличающееся от типичной картины окрашивания. Неспецифическое фоновое окрашивание антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) оценивается в соответствии с критериями, приведенными в Таблице 3.

Таблица 3. Критерии неспецифического фоновое окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)

| Оценка      | Наблюдение под микроскопом                                                                                   | Оценка |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Приемлемо   | Нет фоновое окрашивание                                                                                      | 0      |
|             | Слабо выраженное неспецифическое окрашивание, не мешающее интерпретации специфического окрашивания           | 0,25   |
|             | Более выраженное неспецифическое окрашивание, не мешающее интерпретации специфического окрашивания           | 0,5    |
| Неприемлемо | Более выраженное неспецифическое окрашивание, слегка мешающее интерпретации специфического окрашивания       | 0,75   |
|             | Неспецифическое окрашивание мешает интерпретации специфического окрашивания                                  | 1      |
|             | Неспецифическое окрашивание очень мешает интерпретации специфического окрашивания                            | 1,5    |
|             | Неспецифическое окрашивание чрезвычайно мешает, но не такое интенсивное, как специфическое окрашивание       | 2      |
|             | Интенсивность неспецифического окрашивания практически эквивалентна интенсивности специфического окрашивания | 2,5    |
|             | Неспецифическое окрашивание невозможно отличить от специфического окрашивания                                | 3      |

### **Тканевый контроль**

При выполнении каждой процедуры окрашивания необходимо проводить положительный тканевый контроль. Оптимальная лабораторная практика — помещение среза для положительного контроля на одно стекло с образцом ткани пациента. Такая практика позволяет распознать случаи, когда первичное антитело или другой важный реагент не оказывают должного эффекта на образец ткани пациента. Для оптимального контроля качества лучше всего подойдет образец ткани, в норме показывающий положительное окрашивание. Положительно окрашиваемые компоненты ткани служат подтверждением того, что антитела нанесены и что прибор работает надлежащим образом. Данная ткань может содержать как положительно, так и отрицательно окрашиваемые клетки или компоненты ткани и использоваться в качестве как положительного, так и отрицательного тканевого контроля. В качестве контроля следует использовать свежие образцы тканей, полученные в ходе вскрытия, биопсии или хирургических операций. Образцы следует как можно скорее подготовить или зафиксировать по процедуре, используемой для исследуемых образцов. С использованием таких образцов должен контролироваться весь процесс исследования, начиная от подготовки ткани и заканчивая окрашиванием. Использование среза ткани, фиксированного или обработанного по процедуре, отличной от процедуры тестируемого образца, позволяет обеспечить контроль всех реагентов и этапов метода, кроме фиксации и обработки ткани. Заведомо положительные тканевые контроли следует использовать только для контроля правильности работы с обработанными тканями и тестирования реагентов, а не в качестве вспомогательного средства при постановке конкретного диагноза на основании образцов пациента. Если не наблюдается положительного окрашивания положительных тканевых контролей, результаты окрашивания тестовых образцов следует считать неверными.

Соответствующий положительный тканевый контроль по предварительным анализам будет представлять собой случай KPP с положительным результатом на антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Положительный тканевый контроль (Ткань KPP с заведомо положительным результатом на антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) должен демонстрировать цитоплазматическое окрашивание

## Приложение 1 (Раздел специально предназначен для инструкции по применению на русском языке.) V1.0

любой интенсивности в жизнеспособной опухоли, показатели интенсивности при этом должны превышать показатели фонового окрашивания.

Ткань KPP с положительным результатом на антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) должна оцениваться на приемлемость в соответствии с критериями, описанными в Таблице 4.

Таблица 4. Критерии приемлемости ткани KPP с положительным результатом на антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)

| Приемлемо                                                                                                                                             | Неприемлемо                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Наличие однозначного цитоплазматического окрашивания любой интенсивности в жизнеспособных опухолевых клетках сильнее показателем фонового окрашивания | Отсутствие однозначного цитоплазматического окрашивания любой интенсивности в жизнеспособных опухолевых клетках сильнее показателей фонового окрашивания |

Интенсивность фонового окрашивания должна быть не более 0,5 балла в соответствии с Таблицей 3.

### Отрицательный тканевый контроль

Отрицательный тканевый контроль по предварительным анализам будет представлять собой случай KPP, с отрицательными результатами на антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1). Отрицательный тканевый контроль следует использовать только для проверки характеристик обработанных тканей, исследуемых реагентов и аппаратов, но не для формулировки конкретного диагноза на основании образцов пациента.

### Реагент для отрицательного контроля

Отрицательный контроль Mouse IG (Negative Control Mouse IG) используется для оценки фонового окрашивания, не связанного с антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1).

Интенсивность фонового окрашивания, которое наблюдается у образца, окрашенного отрицательным контролем Mouse IG (Negative Control Mouse IG), должна составлять не более 0,5 для окрашенных образцов ткани.

### Эксплуатационные характеристики – аналитическая чувствительность / специфичность (дополнение)

В таблицах 2 и 3 (основная часть инструкции) приводятся результаты проведенных исследований с применением антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1).

Оценка иммунореактивности антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) проводилась на множественных образцах нормальных и опухолевых тканей человека, а также на образцах тканей нормального мочевого пузыря, парашитовидной железы, яичника, шейки матки, скелетной мышцы, кожи, ткани толстого и тонкого кишечника и тканевые блоки, содержащие ткань периферического нерва и мезотелия. В качестве контроля на системном уровне в данном исследовании использовали один образец ткани колоректального рака, положительный на мутацию V600E в гене BRAF.

Кроме того, предметные стекла были окрашены отрицательным контролем Mouse IG (Negative Control Mouse IG) с применением системы детекции (OptView DAB IHC Detection Kit) на иммуноштейнере автоматическом VENTANA BenchMark ULTRA.

Оценка интенсивности окрашивания проводилась по шкале 0-3+ в соответствии с критериями, перечисленными в Таблице 1, оценка приемлемости фонового окрашивания по критериям, приведенным в Таблице 3. Морфология ткани оценивалась в соответствии с критериями, приведенными в Таблице 2. Ткань положительного контроля оценивалась на приемлемость в соответствии с критериями, представленными в Таблице 4.

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) показало положительное цитоплазматическое окрашивание на 13,8% (15/109) множественных образцах нормальных тканей человека.

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) показало положительное цитоплазматическое окрашивание на 8% (4/51) множественных образцах опухолевых тканей человека.

У 100% (160/160) оцениваемых образцов нормальных тканей имели приемлемую ( $\leq 0,5$  балла) интенсивность фонового окрашивания. Морфология тканей была приемлемой у 100% (160/160) оцениваемых образцов.

**Критерий приемлемости:** Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) должно демонстрировать фоновую/перекрестную иммунореактивность интенсивностью не более, чем 0,5 балла по шкале 0-3+ как минимум у 90% окрашенных образцов.

### Повторяемость и Прецизионность (дополнение)

#### Внутрисуточная повторяемость и межсуточная прецизионность

В качестве положительного контроля в данном исследовании использовали один образец ткани KPP с положительным результатом на антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1).

#### Критерии приемлемости:

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) должно продемонстрировать одинаковый клинический статус как минимум для 90% образцов, испытываемых в пределах одного дня.

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) должно продемонстрировать одинаковый клинический статус как минимум для 90% образцов, испытываемых на протяжении 5 непоследовательных дней.

#### Прецизионность между разными аппаратами серии BenchMark (внутриплатформенная воспроизводимость)

В качестве положительного контроля в данном исследовании использовали один образец ткани KPP с положительным результатом на антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1).

#### Критерии приемлемости:

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) должно продемонстрировать одинаковый клинический статус как минимум для 90% испытываемых образцов между тремя приборами одной и той же платформы на приборе VENTANA BenchMark ULTRA.

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) должно продемонстрировать одинаковый клинический статус как минимум для 90% испытываемых образцов между тремя приборами одной и той же платформы на приборе VENTANA BenchMark XT.

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) должно продемонстрировать одинаковый клинический статус как минимум для 90% испытываемых образцов между тремя приборами одной и той же платформы на приборе VENTANA BenchMark GX.

#### Конкордантность платформы BenchMark (межплатформенная воспроизводимость)

Кроме того, одно предметное стекло из каждого образца было окрашено отрицательным контролем Mouse IG (Negative Control Mouse IG). В качестве положительного контроля в данном исследовании использовали один образец ткани KPP с положительным результатом на антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1).

#### Критерии приемлемости:

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) должно продемонстрировать одинаковый клинический статус как минимум для 90% испытываемых образцов в трех приборах на одной платформе.

#### Исследования прецизионности оценок эксперта

В качестве положительного контроля в данном исследовании использовали один образец ткани KPP с положительным результатом на антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1).

#### Критерии приемлемости:

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) должно продемонстрировать одинаковый клинический статус как минимум для 90% испытываемых образцов по каждому эксперту.

## Приложение 1 (Раздел специально предназначен для инструкции по применению на русском языке.) V1.0

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) должно продемонстрировать одинаковый клинический статус как минимум для 90% испытуемых образцов между экспертами.

### Прецизионность между партиями

В качестве положительного контроля в данном исследовании использовали один образец ткани KPP с положительным результатом на антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1).

### Критерии приемлемости:

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) должно продемонстрировать одинаковый клинический статус как минимум для 90% испытуемых образцов для различных партий.

### Исследование воспроизводимости результата между лабораториями

В качестве положительного контроля в данном исследовании использовали один образец ткани KPP с положительным результатом на антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1).

### Критерии приемлемости:

Антитела из панели VENTANA MMR IHC Panel должны продемонстрировать значения положительной и отрицательной процентных согласованностей по всем наблюдениям для всех антител с 95% нижним граничным доверительным интервалом  $\geq 85\%$  для всех исследуемых образцов.

### Исследование точности: сравнение метода получения результатов с использованием панели VENTANA MMR IHC Panel и молекулярного тестирования (секвенирование ДНК и гиперметилирование промотора MLH1) (дополнение)

### Критерий приемлемости:

Процентная согласованность между результатами молекулярного и иммуногистохимического тестирования для всех маркеров должна быть  $\geq 90\%$  для всех объединенных маркеров.

### Упаковка

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) поставляется в пластиковом дозаторе, упакованном в коробку из мелованной бумаги. Один дозатор содержит достаточное количество реагента для проведения 50 анализов.

На каждой упаковочной коробке находится магнитная «кнопка памяти», которая содержит всю необходимую информацию о реагенте.

Более подробно о «кнопке памяти» читайте в Руководстве по эксплуатации к иммунотейнерам автоматическим серии Ventana BenchMark.

### Первичная упаковка - дозатор.

Материал: полипропилен  
Вес: 20,5 гр ( $\pm 0,2$  гр)  
Объем: 34,1 мл ( $\pm 0,2$  мл)  
Размеры дозатора:  
Высота: 126,7 мм ( $\pm 2$  мм)  
Длина: 62,7 мм ( $\pm 1$  мм)  
Ширина: 37,9 мм ( $\pm 1$  мм)  
Толщина стенок: 0,98 мм ( $\pm 0,03$  мм)

Вторичная упаковка: коробка из мелованной бумаги (размеры (длина x ширина x высота) не более (66,7 x 54,0 x 149,2) мм, магнитная «кнопка памяти» (диаметр не более 17 мм).

Упаковка изделия обеспечивает достаточную защиту от механических, климатических воздействий при условии соблюдения правил транспортировки.

### Маркировка

Производитель использует следующие символы и знаки:

| Символ                                                                            | Определение                          | Символ                                                                              | Определение                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
|  | Смотрите инструкцию по применению    |  | Для диагностики in vitro           |
|  | Каталожный номер                     |  | Код партии                         |
|  | Производитель                        |  | Использовать до (срок годности)    |
|  | СЕ-маркировка                        |  | Пригоден для вторичной переработки |
|  | Содержит достаточно для исследований |  | Опасность для здоровья             |
|  | Температурные ограничения            |  | QR-код                             |
|  | Дата изготовления                    |  | Глобальный номер предмета торговли |
|  | Предупреждения                       |                                                                                     |                                    |

### Маркировка дозатора

Логотип производителя  
Наименование изделия  
Объем реагента в дозаторе (концентрация специфических антител)  
Каталожный номер  
Код партии  
Срок годности (использовать до)  
Глобальный номер предмета торговли  
Количество анализов, которые можно сделать  
Температурные ограничения  
Штрих-код  
СЕ-маркировка  
QR-код  
Предупреждение для диагностики in vitro  
Знак «Смотрите инструкцию по применению»  
Название и адрес производителя  
Знак «Опасность для здоровья»

### Маркировка картонной упаковки

Логотип производителя  
Наименование изделия  
Объем реагента в дозаторе (концентрация специфических антител)  
Каталожный номер  
Код партии  
Дата производства  
Срок годности  
Количество анализов, которые можно сделать  
Температура хранения  
Предупреждение для диагностики in vitro  
СЕ-маркировка  
Штрих-код  
QR-код  
Производственный код  
Глобальный номер предмета торговли  
Предупреждение - не использовать повторно  
Полное название, адрес, телефон производителя  
Ссылка на электронную инструкцию на русском языке  
Страна происхождения  
Обозначение, что пригодно для вторичной переработки  
Знак «Предупреждения»  
Знак «Опасность для здоровья»

## Приложение 1 (Раздел специально предназначен для инструкции по применению на русском языке.) V1.0

### Предупреждения:



- H317 – Может вызывать аллергическую кожную реакцию.
- P261 – Избегать вдыхания пыли/дыма/газа/ тумана/паров/распылителей жидкости.
- P272 – Не выносить загрязненную одежду с рабочего места.
- P280 – Пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/ средствами защиты глаз/лица.
- P333+P313 – При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.
- P362+P364 – Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.
- P501 – Удалить содержимое/контейнер в ...

### Маркировка на русском языке

Первичное мышиное моноклональное антитело для качественного обнаружения V600E в белке BRAF иммуногистохимическим методом в диагностике in vitro к иммуноштейнерам автоматическим серии BenchMark (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody)

Регистрационное удостоверение № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_  
 Срок годности см. на упаковке.  
 Дата производства см. на упаковке.  
 Температура хранения см. на упаковке.  
 Номер лота см. на упаковке.  
 Производитель: «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностика ГмбХ"), Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany  
 Изделие предназначено для диагностики in vitro  
 Уполномоченный представитель производителя на территории РФ:  
 Общество с ограниченной ответственностью «Рош Диагностика Рус» (ООО «Рош Диагностика Рус»), 107031, Москва, Трубная площадь, д.2  
 Тел: +7 495 229-69-99, факс: +7 495 229-62-64. E-mail: moscow.reception\_dia@roche.com

Кат.номер 08033706001 (760-5095)

### Условия транспортировки

Перед отправкой с завода продукт проходит контрольные проверки. Международные символы на упаковке и специальные инструкции по обращению указывают транспортировщику, как следует обращаться с этим продуктом. При получении продукта внимательно осмотрите упаковку. При наличии любых следов неправильного обращения или повреждения немедленно обратитесь в отдел обслуживания клиентов компании «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностика ГмбХ") или к региональному поставщику. Транспортировка осуществляется всеми видами транспорта в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на каждом виде транспорта. Температура при транспортировке 2-8°C.

### Требования к охране окружающей среды

Медицинское изделие при использовании, транспортировке и хранении не оказывает негативного воздействия на человека и окружающую среду при соблюдении условий применения и мер предосторожности, указанных в инструкции.

### Стерилизация

Изделие поставляется нестерильным. Не подлежит повторному использованию и/или стерилизации пользователем.

### Утилизация

Во избежание возможного загрязнения окружающей среды Первичное мышиное моноклональное антитело для качественного обнаружения V600E в белке BRAF иммуногистохимическим методом в диагностике in vitro к иммуноштейнерам автоматическим серии BenchMark (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody) с истекшим сроком годности или использованные дозаторы, а также отходы, использованных реагентов, должны

утилизироваться в соответствии с местными государственными и/или больничными нормативными требованиями.

Правильное уничтожение и утилизация будет поддерживать сохранение природных ресурсов и содействовать защите здоровья человека и окружающей среды.

### Утилизация отходов упаковки.

Упаковка продукции «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностика ГмбХ") разработана с целью сведения к минимуму загрязнения окружающей среды при сохранении целостности продукта во время транспортировки и хранения. Упаковочные отходы должны утилизироваться в местных пунктах сбора упаковки, в специализированные контейнеры, расположенные в муниципалитетах.

### Утилизация изделия с истекшим сроком годности и отходов, использованных реагентов.

При утилизации и уничтожении изделий с истекшим сроком годности, а также отходов, использованных реагентов, необходимо действовать в соответствии с гигиеническими нормативами и следовать официальным инструкциям по утилизации и уничтожению потенциально инфекционного и химического материала, принятым на территории Российской Федерации и в данном ЛПУ.

Ключевыми вопросами в стратегии управления отходами является оптимизация тактик и подходов к конечным продуктам, а также минимизация возможного загрязнения окружающей среды.

Более подробную информацию можно получить у производителя / уполномоченного представителя производителя.

Утилизация должна проводиться в соответствии с местными нормами законодательства, а также в соответствии с протоколами медицинского учреждения, где используются данные медицинские изделия.

Не утилизировать совместно с бытовыми отходами.

### Гарантийные обязательства

Производитель (компания «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностика ГмбХ")) гарантирует, Первичное мышиное моноклональное антитело для качественного обнаружения V600E в белке BRAF иммуногистохимическим методом в диагностике in vitro к иммуноштейнерам автоматическим серии BenchMark (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody) соответствуют спецификациям, заявленным на этикетке. Производитель несет ответственность за работу изделий только в случае их правильного использования в соответствии с инструкцией, а также соблюдения правил хранения и транспортировки.

Производитель гарантирует стабильность VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) до окончания срока годности при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, указанных в инструкции. Производитель гарантирует безопасность медицинского изделия, отсутствие недопустимого риска причинения вреда жизни, здоровью человека и окружающей среде при использовании VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) по назначению в условиях, предусмотренных производителем.

Изделия должны использоваться только до истечения срока годности, который указан на упаковке.

НАСТОЯЩАЯ ОГРАНИЧЕННАЯ ГАРАНТИЯ ЗАМЕНЯЕТ СОБОЙ ИНЫЕ ГАРАНТИИ, ОДНОЗНАЧНО ВЫРАЖЕННЫЕ ИЛИ ПОДРАЗУМЕВАЕМЫЕ, ВКЛЮЧАЯ ЛЮБУЮ ПОДРАЗУМЕВАЕМУЮ ГАРАНТИЮ ПРИГОДНОСТИ ДЛЯ КОММЕРЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЛИ ДЛЯ ЛЮБОЙ ИНОЙ ЦЕЛИ. КОМПАНИЯ ROCHE DIAGNOSTICS GmbH НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА СЛУЧАЙНЫЕ, НЕПРЯМЫЕ, СПЕЦИАЛЬНЫЕ ИЛИ КОСВЕННЫЕ УБЫТКИ.

По вопросам, связанным с качеством изделий, а также с их работой, нужно обращаться к Уполномоченному представителю производителя на территории РФ:

Общество с ограниченной ответственностью «Рош Диагностика Рус» (ООО «Рош Диагностика Рус»), 107031, Москва, Трубная площадь, д.2, тел.: (495) 229-69-99, факс: (495) 229-62-64

### Претензии по качеству (рекламация)

Порядок предъявления рекламаций и ответов на них регулируется гражданским правом. Рекламация может предъявляться только по таким

## Приложение 1 (Раздел специально предназначен для инструкции по применению на русском языке.) V1.0

вопросам, которые не являлись предметом приемки товара, произведенной в соответствии с условиями договора.

По всем вопросам, связанным с обслуживанием изделия, необходимо обратиться к Уполномоченному представителю производителя.

В случае рекламации обращаться к производителю и / или уполномоченному представителю производителя.

Уполномоченный представитель производителя на территории РФ:

Общество с ограниченной ответственностью «Рош Диагностика Рус» (ООО «Рош Диагностика Рус»), 107031, Москва, Трубная площадь, д.2, тел.: (495) 229-69-99, факс: (495) 229-62-64

### Примечание:

Антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) предназначено для использования со следующими иммуноштейнерами автоматическими серии VENTANA BenchMark:

- BenchMark GX (Иммуногистостейнер автоматический BenchMark GX с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011-08976 от 27.01.2017 г.))

- BenchMark XT (Иммуноштейнер автоматический Ventana BenchMark XT с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05251 от 28.01.2016 г.))

- BenchMark ULTRA (Иммуноштейнер автоматический Ventana BenchMark ULTRA с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05250 от 28.01.2016 г.)).

### Рекомендуемые материалы для использования:

1) Отрицательный контроль Mouse IG (Negative Control Mouse IG) в составе: антитело, не реагирующее ни с одним известным антигеном человека, в растворе солевого фосфатного буфера (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011-11166 от 30.12.2011 г.)

2) Система детекции (OptiView DAB IHC Detection Kit) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2012-12679 от 17.08.2012 г.)

3) EZ Prep Concentrate (10X) (Раствор для проведения депарафинизации, концентрированный) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 03.02.2016 г.)

4) Reaction Buffer Concentrate (10X) (Реакционный буфер (концентрат – 10X)) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 03.02.2016 г.)

5) ULTRA LCS (Жидкое покрывное стекло высокотемпературное, разведенное) или LCS (Pre-dilute) (Жидкое покрывное стекло высокотемпературное, разведенное) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 03.02.2016 г.)

6) ULTRA CC1 (TRIS/Борат/ЭДТА буфер (CC1) для демаскировки антигена, разведенный) или CC1 (Pre-dilute) (TRIS/Борат/ЭДТА буфер (CC1) для демаскировки антигена, разведенный) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 03.02.2016 г.)

7) Hematoxylin II (Гистологический краситель Гематоксилин II ≤ 60%) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 03.02.2016 г.)

8) Bluing Reagent (Реагент для придания окраске синего цвета) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 03.02.2016 г.)

[Перевод с немецкого и английского языков на русский язык]

[На бланке нотариальной конторы «Нотариальная контора Зеелер энд Д-р. Феллмет»]

«Нотариальная контора Зеелер энд Д-р. Феллмет» (Seeler & Dr. Fellmeth) • Q7, 23 • 68161 МАННХАЙМ

Удостоверение копии

Настоящим удостоверяется соответствие приведенной ниже фотокопии представленному мне оригиналу.

г. Маннхайм, 17 августа 2020 г.

/подпись/

Рольф Гленц (Rolf Glenz),  
заместитель нотариуса г. Маннхайма  
Д-ра Феллмета (Dr. Fellmeth)

[Печать:

Д-р Штефан Феллмет (Stefan Fellmeth)  
Нотариус в г. Маннхайм]

[На бланке компании «Рош Диагностика ГмбХ»]

[Логотип компании «Вентана Медикал Системс, Инк.»]

[Логотип компании «Рош»]

Вер. 1.0

[Заголовок документа «Инструкция по применению на медицинское изделие „Первичное мышечное моноклональное антитело для качественного обнаружения V600E в белке BRAF иммуногистохимическим методом в диагностике *in vitro* к иммуноштейнерам автоматическим серии BenchMark (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody)“ производства компании „Рош Диагностика ГмбХ“, Сандхофер Штрассе 116, D-68305 Маннхайм, Германия», представленный на русском языке.]

**«Вентана Медикал Системс, Инк.» (Ventana Medical Systems, Inc.), 1910 Ист Инновейшн Парк Драйв, Тусон, Аризона 85755, США (1910 East Innovation Park Drive, Tucson, AZ 85755 USA)**

**Утверждено**

**«Рош Диагностика ГмбХ»**

**(Roche Diagnostics GmbH)**

**Дата: 17 августа 2020 г.**

/подпись/

**Андреа Вебер (Andrea Weber)**

**Руководитель проекта по международно-правовому регулированию**

**Штамп:**

[Штамп:

«Рош Диагностика ГмбХ»

(Roche Diagnostics GmbH)

Сандхофер Штрассе 116

68305 Маннхайм

(Sandhofer Straße 116

68305 Mannheim)]

**2020 г.**

«Рош Диагностика ГмбХ» (Roche Diagnostics GmbH); Сандхофер Штрассе 116; D-68305 Маннхайм (Sandhofer Strasse 116; D-68305 Mannheim); телефон: +49-621-759-0; телефакс: +49-621-759-2890

Юридический адрес: Маннхайм — регистрационный суд: Участковый суд Маннхайма HRB 3962, Руководство: Клаус Хаберда (Claus Haberda), Андреас Шмитц (Andreas Schmitz) — Председатель наблюдательного совета: Д-р Томас Шинекер (Dr. Thomas Schinecker)

[Далее следует текст документа «Инструкция по применению на медицинское изделие „Первичное мышинное моноклональное антитело для качественного обнаружения V600E в белке BRAF иммуногистохимическим методом в диагностике *in vitro* к иммуноштейнерам автоматическим серии BenchMark (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody) “», представленного на русском языке.]

1. Л. Юань, Ю. Чи, В. Чэнь, Кс. Чэнь, П. Вей и соавт. Иммуногистохимия и анализ микросателлитной нестабильности в молекулярном субтипировании колоректальной карциномы на основе компетенции репарации неспаренных оснований. Международный журнал клинической и экспериментальной медицины, 2015 г.;8(11):20988-21000 (Yuan L, Chi Y, Chen W, Chen X, Wei P, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. Int J Clin Exp Med. 2015;8(11):20988- 21000).
2. К. Б. Гайерсбах, У. С. Самович. Микросателлитная нестабильность и колоректальный рак. Архивы патологической лабораторной медицины, 2011 г.;135(10):1269-1277 (Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. Arch Pathol Lab Med. 2011;135(10):1269-1277).
3. К. Л. Райт, И. Д. Стюарт. Гистопатология и статус репарации неспаренных оснований 458 последовательных колоректальных карциномах. Американский журнал хирургической патологии, 2003 г.;27(11):1393-1406 (Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. Am J Surg Pathol. 2003;27(11):1393-1406).
4. А. К. Тивари, Х. К. Рой, Х. Т. Линч. Синдром Линча в 21 веке: клинические перспективы. Международный медицинский журнал QJM, 2016 г.;109(3):151-158 (Tiwarei AK, Roy HK, Lynch HT. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. QJM. 2016;109(3):151-158).
5. Н. Буза, Цз. Цзыай, П. Хуэй. Тестирование дефицита репарации неспаренных оснований в клинической практике. Экспертный обзор молекулярной диагностики, 2016 г.;16(5):591-604 (Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. Expert Rev Mol Diagn. 2016;16(5):591 -604).
6. Ф. К. К. Сильва, Дж. Т. Торрезан, Дж. Р. О. Феррейра, Л. П. Оливейра, М. Беннами и соавт. Герминативная мутация в MLH1, приводящая к изолированной утрате экспрессии PMS2 при синдроме Линча: значение для диагностики в клинике. Американский журнал хирургической патологии, 2017 г.;41(6):861-864 (Silva FCC, Torrezan GT, Ferreira JRO, Oliveira LP, Begnami M, et al. Germline Mutations in MLH1 Leading to Isolated Loss of PMS2 Expression in Lynch Syndrome: Implications for Diagnostics in the Clinic. Am J Surg Pathol. 2017;41(6):861-864).
7. Дж. К. Бойер, А. Умар, Дж. Л. Ризингер, Дж. Р. Липфорд, М. Кэйн и соавт. Микросателлитная нестабильность, дефицит репарации неспаренных оснований и генетические дефекты в клеточных линиях рака человека. Исследования рака, 1995 г.;55(24):6063-6070 (Boyer JC, Umar A, Risinger JL, Lipford JR, Kane M, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. Cancer Res. 1995;55(24):6063-6070).
8. Д. А. Лоус, Т. Пирсон, С. Сенгупта, П. Б. Булос. Роль MLH1, MSH2 и MSH6 в развитии множественного колоректального рака. Британский журнал рака, 2005 г.;93(4):472-477 (Lawes DA, Pearson T, Sengupta S, Boulos PB. The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. Br J Cancer. 2005;93(4):472-477).
9. Х. Т. Линч, А. де ла Чапель. Наследственный колоректальный рак. Медицинский журнал Новой Англии, 2003 г.;348(10):919-932 (Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med. 2003;348(10):919-932).

10. П. Пельтомаки. Роль дефектов репарации неспаренных оснований ДНК в патогенезе рака у человека. Журнал клинической онкологии, 2003 г.; 21 (6):1174-1179 (Peltomaki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. J Clin Oncol. 2003;21 (6):1174-1179).
11. Х. Т. Линч, Т. Смырк. Наследственный неполипозный колоректальный рак (синдром Линча). Обновленный обзор. Рак, 1996 г.; 78(6):1149-1167 (Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. Cancer. 1996;78(6):1149-1167).
12. Т. Калдес, Дж. Годино, А. Санчез, К. Корбачо, М. Де ла Ойа и соавт. Иммуногистохимия и тестирование микросателлитной нестабильности для определения носителей мутаций MLH1, MSH2 и MSH6 при наследственном неполипозном колоректальном раке. Отчеты по онкологии, 2004 г.; 12(3):621-629 (Caldes T, Godino J, Sanchez A, Corbacho C, De la Hoya M, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. Oncol Rep. 2004; 12(3):621-629).
13. Дж. Ши, Д. С. Климстра, К. Нафа, К. Оффит, Дж. Г. Гуйлем и соавт. Значимость иммуногистохимического обнаружения белков репарации неспаренных оснований ДНК для прогноза герминативной мутации при наследственных колоректальных образованиях. Американский журнал хирургической патологии, 2005 г.; 29(1):96-104 (Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, et al. Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. Am J Surg Pathol. 2005; 29(1):96-104).
14. Дж. М. Каннингэм, Д. Дж. Тестер, С. Н. Тибоду. Обнаружение мутаций при колоректальном раке: прямое секвенирование генов репарации неспаренных оснований ДНК. Методы молекулярной медицины, 2001 г.; 50:87-98 (Cunningham JM, Tester DJ, Thibodeau SN. Mutation detection in colorectal cancers: direct sequencing of DNA mismatch repair genes. Methods Mol Med. 2001; 50:87-98).
15. Х. Дэвис, Г. Р. Биннелл, К. Кокс, П. Стивенс, С. Эдкинс и соавт. Мутации гена BRAF при раке у человека. Природа, 2002 г.; 417(6892):949-954 (Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002;417(6892):949-954).
16. Э. Вакиани, Д.Б. Солит «KRAS и BRAF: медикаментозные цели и прогностические биомаркеры». Журнал патологии 2011 г.; 223(2):219-229 (Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. J Pathol. 2011;223(2):219-229).
17. Э. Доминго, П. Лайхо, М. Олликайнен, М. Пинто, Л. Ван и соавт. Скрининг BRAF как эффективная и недорогая стратегия упрощения генетического тестирования наследственного неполипозного колоректального рака (ННКР). Журнал медицины и генетики, 2004 г.; 41(9):664-668 (Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. J Med Genet. 2004;41(9):664-668).
18. М. Цзинь, Х. Хампель, Кс. Чжу, Л. Шунеманн, М. Ирсли и соавт. Анализ мутаций BRAF V600E упрощает алгоритм при синдроме Линча. Американский журнал клинической патологии, 2013 г.; 140(2):177-183 (Jin M, Hampel H, Zhou X, Schunemann L, Yearsley M, et al. BRAF V600E mutation analysis simplifies the testing algorithm for Lynch syndrome. Am J Clin Pathol. 2013;140(2):177-183).
19. Г. Дэн, И. Белл, С. Кроули, Дж. Гум, Дж. П. Тердиман и соавт. Мутация BRAF часто встречается при спорадическом колоректальном раке с метилированным hMLH1, но не при наследственном неполипозном колоректальном раке. Клинические исследования рака, 2004 г.; 10(1 часть 1):191-195 (Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated

- hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2004;10(1 Pt 1):191-195).
20. И. Тиаччи, Г. Шиавони, Ф. Форкони, А. Санти, Л. Трентин и соавт. Простая генетическая диагностика волосатоклеточного лейкоза чувствительным обнаружением мутации BRAF-V600E. Кровь, 2012 г.;119(1):192-195 (Tiacchi E, Schiavoni G, Forconi F, Santi A, Trentin L, et al. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. Blood. 2012;119(1):192-195).
  21. Ф. М. Джардьелло, Дж. И. Аллен, Дж. Э. Аксилбунд, К. Р. Боланд, К. А. Бурке и соавт. Руководство по генетической оценке и ведению синдрома Линча: консенсусное заявление многопрофильной рабочей группы США по колоректальному раку. Заболевания толстой и прямой кишки, 2014 г.;57(8):1025-1048 (Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, et al. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. Diseases of the Colon & Rectum. 2014;57(8):1025-1048).
  22. К. Эгоавил, К. Аланда, А. Кастиллео, А. Пайа, Г. Пейро и соавт. Частота синдрома Линча у пациентов с недавно диагностированным эндометриальным раком. Журнал «ПЛОС ВАН», 2013 г.;8(11):e79737 (Egoavil C, Alenda C, Castillejo A, Paya A, Peiro G, et al. Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers. PLoS One. 2013;8(11):e79737).
  23. Л. К. Коннелл, Дж. М. Мота, М. И. Брагироли, П. М. Хофф. Рост частоты колоректального рака у молодых пациентов: вопросы о скрининге, биологии и лечении. Текущие варианты лечения онкологических заболеваний, 2017 г.;18(4):23 (Connell LC, Mota JM, Braghiroli MI, Hoff PM. The Rising Incidence of Younger Patients With Colorectal Cancer: Questions About Screening, Biology, and Treatment. Curr Treat Options Oncol. 2017;18(4):23).
  24. Д. Провензале, С. Гупта, Д. Дж. Анен, Т. Брэй, Дж. А. Каннон и соавт. Оценка генетического/семейного высокого риска: колоректальный рак. Версия 1.2016, Руководство NCCN по клинической практике при онкологии. Журнал Национальной всеобщей сети рака, 2016 г.;14(8):1010-1030 (Provenzale D, Gupta S, Ahnen DJ, Bray T, Cannon JA, et al. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Cane Netw. 2016;14(8):1010-1030).
  25. Дж. Бальмана, Ф. Бэлагер, А. Сервантес, Д. Арнольд, группа EGW. Семейный риск колоректального рака: Руководство ESMO по клинической практике. Анналы онкологии, 2013 г.;24 прил. 6: сс. 73-80 (Balmana J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D, Group EGW. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. Ann Oncol. 2013;24 Suppl 6:vi73-80).
  26. Оценка геномного применения в профилактике. Профилактическая работа. Рекомендации рабочей группы EGAPP: стратегии генетического тестирования у лиц с недавно диагностированным колоректальным раком, направленного на снижение заболеваемости и смертности от синдрома Линча у родственников. Генетика в медицине, 2009 г.;11 (1):35-41 (Evaluation of Genomic Applications in P, Prevention Working G. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. Genet Med. 2009;11 (1):35-41).
  27. А. Умар, К. Р. Боланд, Дж. П. Тердиман, С. Сингал, А. де ла Чапель и соавт. Пересмотренные рекомендации Бетесда по наследственному непוליпозному колоректальному раку. Журнал национального института рака, 2004 г.;96(4):261-268 (Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. J Natl Cancer Inst. 2004;96(4):261-268).

28. М. Т. Парсонс, Д. Д. Буханан, Б. Томпсон, ДЖ. П. Ян, А. Б. Спурдл. Связь мутаций BRAF опухоли и метилирования MLH1 со статусом генной мутации репарации неспаренных герминальных оснований (MMR): обзор литературы для оценки характеристик опухолей с целью классификации вариантов MMR. Журнал медицинской генетики, 2012 г.;49(3):151-157 (Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. J Med Genet. 2012;49(3):151-157).
29. Дж. Ши. Разработка подхода и клиническая значимость обнаружения недостаточной репарации неспаренных оснований ДНК при колоректальных карциномах. Семинары по диагностической патологии, 2015 г.;32(5):352-361 (Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting DNA mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. Semin Diagn Pathol. 2015;32(5):352-361).
30. А. Тиль, М. Хейнонен, Дж. Кантонен, А. Джиллинг, Л. Латинен и соавт. Мутации BRAF при sporadic колоректальном раке и синдроме Линча. Архивы Вирчоуса, 2013 г.;463(5):613-621 (Thiel A, Heinonen M, Kantonen J, Gylling A, Lahtinen L, et al. BRAF mutation in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. Virchows Arch. 2013;463(5):613-621).
31. К. У. Тун, А. Чу, К. ДеСильва, Дж. Чань, Дж. Паттерсон и соавт. Иммуногистохимия BRAFV600E в сочетании со статусом репарации неспаренных оснований прогнозирует выживаемость пациентов с колоректальным раком. Современная патология, 2014 г.;27(5):644-650 (Toon CW, Chou A, DeSilva K, Chan J, Patterson J, et al. BRAFV600E immunohistochemistry in conjunction with mismatch repair status predicts survival in patients with colorectal cancer. Mod Pathol. 2014;27(5):644-650).
32. К. Койнума, К. Шито, И. Миякура, Т. Фурукава, И. Ямасита и соавт. Мутации BRAF связаны с обширным метилированием промотора hMLH1 при sporadic колоректальных карциномах. Международный журнал рака, 2004 г.;108(2):237-242 (Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. Int J Cancer. 2004;108(2):237-242).
33. Д. Каппер, М. Пруссер, А. Хабель, Ф. Зам, У. Акерманн и соавт. Оценка статуса мутации BRAF V600E методом иммуногистохимии с использованием специфичного к мутациям моноклонального антитела. Работы по нейропатологии, 2011 г.;122(1):11-19 (Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, et al. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. Acta Neuropathol. 2011;122(1):11-19).
34. Д. Каппер, А. С. Бергхофф, М. Магерле, А. Ильхан, А. Ворер и соавт. Иммуногистохимическое тестирование статуса BRAF V600E в 1120 образцах опухолевых тканей с метастазами мозга. Работы по нейропатологии, 2012 г.;123(2):223-233 (Capper D, Berghoff AS, Magerle M, Ilhan A, Wohrer A, et al. Immunohistochemical testing of BRAF V600E status in 1,120 tumor tissue samples of patients with brain metastases. Acta Neuropathol. 2012;123(2):223-233).
35. Ф. Л. Карсон, К. Хладик, К. Х. Каппеллано, патология ASfC. Гистотехнология: текст для самообучения: Американское общество клинической патологии, 2015 г. (Carson FL, Hladik C, Cappellano CH, Pathology ASfC. Histotechnology: A Self-Instructional Text: American Society for Clinical Pathology; 2015).
36. П. К. Рош, Э. Д. Хси, Б. Л. Фирфер. Иммуногистохимия: принципы и достижения. Руководство по молекулярной и клинической лабораторной диагностике, 7-е изд.: Американское общество микробиологии, 2006 г. (Roche PC, Hsi ED, Firfer BL. Immunohistochemistry: Principles and Advances. Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology, 7th Edition: American Society of Microbiology; 2006).

37. А. Рабинович. Программа лабораторной аккредитации Американского колледжа патологов. Аккредитация и обеспечение качества, 2002 г.;7(11):473-476 (Rabinovitch A. The College of American Pathologists laboratory accreditation program. Accreditation and Quality Assurance. 2002;7(11):473-476).
38. Институт клинических и лабораторных стандартов (CLSI). Обеспечение качества контроля проектирования и применения иммуногистохимических анализов: утвержденное руководство — второе издание. Документ Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). Институт клинических и лабораторных стандартов (CLSI), 940 Вест Вэлли Роуд, оф. 1400, Уэйн, Пенсильвания 19087-1898 США, 2011 г. (CLSI. Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011).
39. С. Ф. Куань, С. Навина, К. Л. Крессман, Р. К. Пай. Иммуногистохимическое обнаружение белка мутации BRAF V600E с использованием антитела VE1 при колоректальной карциноме дает результаты, очень схожие с молекулярным тестированием, но требует тщательной оптимизации антител. Патология человека, 2014 г.;45(3):464472 (Kuan SF, Navina S, Cressman KL, Pai RK. Immunohistochemical detection of BRAF V600E mutant protein using the VE1 antibody in colorectal carcinoma is highly concordant with molecular testing but requires rigorous antibody optimization. Hum Pathol. 2014;45(3):464472).
40. Ф. Дэй, А. Мураный, С. Сингх, К. Шанмугам, Д. Вильямс и соавт. Иммуногистохимический анализ, специфичный к мутациям BRAF V600E: связь с молекулярным статусом мутаций и клиническим исходом колоректального рака. Цели онкологии, 2015 г.;10(1):99-109 (Day F, Muranyi A, Singh S, Shanmugam K, Williams D, et al. A mutant BRAF V600E-specific immunohistochemical assay: correlation with molecular mutation status and clinical outcome in colorectal cancer. Target Oncol. 2015;10(1):99-109).

© «Вентана Медикал Системс, Инк.» (Ventana Medical Systems, Inc.) и «Рош Диагностикс Интернэшнл, Инк.» (Roche Diagnostics International, Inc.), 2019 г.

«Рош Диагностикс ГмбХ»  
(Roche Diagnostics GmbH)  
Сандхофер Штрассе 116  
D-68305 Маннхайм  
Германия  
(Sandhofer Straße 116  
D-68305 Mannheim  
Germany)

*[Далее следует текст документа «Приложение 1 к инструкции по применению на медицинское изделие „Первичное мышечное моноклональное антитело для качественного обнаружения V600E в белке BRAF иммуногистохимическим методом в диагностике in vitro к иммуностейнерам автоматическим серии BenchMark (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody) “», представленного на русском языке.]*

[Рельефная печать:  
Д-р Штефан Феллмет (Stefan Fellmeth)  
Нотариус в г. Маннхайм]

Перевод данного текста сделан мной, переводчиком Марычевым Юрием Игоревичем.



Российская Федерация

Город Москва

Семнадцатого сентября две тысячи двадцатого года

Я, Мартынова Наталия Андреевна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Акимов Глеба Борисовича, свидетельствую подлинность подписи переводчика Марычева Юрия Игоревича.

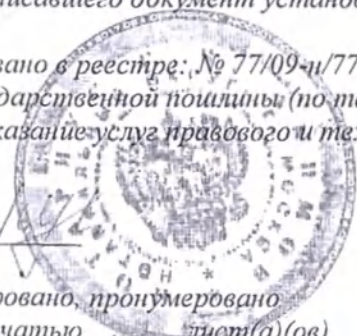
Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

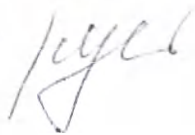
Зарегистрировано в реестре: № 77/09-н/77-2020- 59-395

Взыскано государственной пошлины (по тарифу): 100 руб.

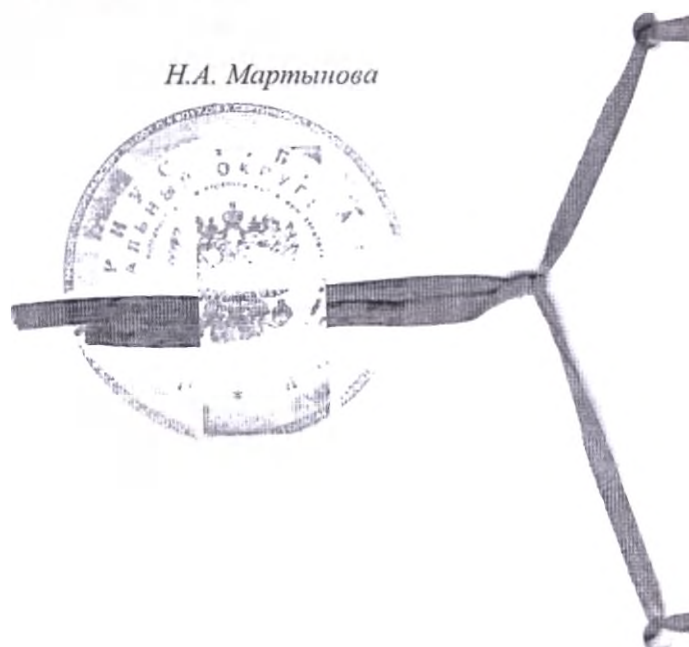
Уплачено за оказание услуг правового и технического характера: 300 руб.

  
Всего прошнуровано, пронумеровано  
и скреплено печатью \_\_\_\_\_ лист(а)(ов)

ВРИО нотариуса



Н.А. Мартынова

Российская Федерация  
Город Москва

Семнадцатого сентября две тысячи двадцатого года

Я, Дейнеко Людмила Валерьевна, временно исполняющая  
обязанности нотариуса города Москвы Прокошечковой Елены  
Евгеньевны, свидетельствую верность копии с представленного  
мне документа.

Зарегистрированное свидетельство N 21/86-н/77-2020.

Взыскано государственной пошлины (по тарифу):

Уплачено за оказание услуг правового и технического характера

Л.В. Дейнеко



Всего прошнуровано,  
пронумеровано и скреплено  
печатью 28 лист(-а, -ов)