



SEELER & DR. FELLMETH

NOTARE

Handwritten signature in blue ink.

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

Handwritten signature of Rolf Glenz.

Rolf Glenz

Notarvertreter des Notars

Dr. Fellmeth in Mannheim

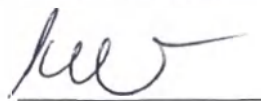


ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**(INSTRUCTION FOR USE)****НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

Первичное мышинное моноклональное антитело для качественного обнаружения белка MLH1 иммуногистохимическим методом в диагностике in vitro к иммуноштейнерам автоматическим серии BenchMark (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-MLH1 (M1) 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-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody

Для использования с панелью VENTANA MMR IHC Panel

REF 760-5091

08033668001

IVD  50

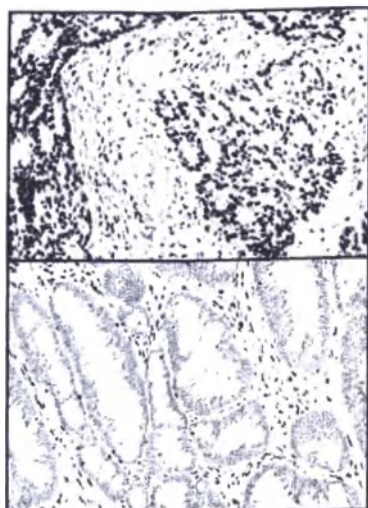


Рисунок 1. Окрашивание антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody с неизменной экспрессией (сверху) или потерянной экспрессией (снизу) в раковой ткани толстой кишки

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-MLH1 (M1)) предназначено для качественного обнаружения белка MLH1 в фиксированных формалином и залитых в парафин срезах ткани. Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) готово к применению на аппаратах серии BenchMark ULTRA, XT и GX с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit и вспомогательных реагентов.

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) является частью панели VENTANA MMR IHC Panel, в состав которой входят VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody и VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody. Панель VENTANA MMR IHC Panel предназначена для обнаружения

недостатка белка, участвующего в репарации неспаренных оснований ДНК, в качестве теста для идентификации лиц, находящихся под угрозой развития синдрома Линча, среди пациентов, которым диагностирован колоректальный рак (КРР), а также у которых выявлена мутация V600E в гене BRAF, в качестве вспомогательного средства для различения спорадического КРР и вероятного синдрома Линча в условиях отсутствия экспрессии белка MLH1.

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

Предназначено для диагностики *in vitro* (IVD).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

Колоректальный рак является третьим наиболее распространенным видом рака и четвертой по распространенности причиной смерти в мире.¹ В большинстве случаев КРР наблюдается хромосомная нестабильность, однако примерно в 15 % случаев рак развивается по альтернативному пути, 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 перстневидноклеточного рака. Кроме того, он характеризуется увеличением числа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоли.^{2,3} В общем, дефицит репарации неспаренных оснований может быть вызван мутациями зародышевой линии в одном из генов MMR с последующей утратой соответствующей нормальной аллели посредством генетических или эпигенетических механизмов, соматическими мутациями в аллелях или эпигенетической инактивацией белка MLH1 посредством метилирования.⁴

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

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

Являясь частью панели VENTANA MMR IHC Panel, VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) помогает дифференцировать спорадический КРР и вероятный синдром Линча при отсутствии экспрессии белка MLH1.^{15,16} При КРР потеря экспрессии белка MLH1 зачастую является результатом гиперметилирования промотора MLH1 и указывает на спорадический характер заболевания.¹⁷ Наличие белка BRAF V600E тесно связано с гиперметилированием промотора MLH1. В итоге положительный результат окрашивания антителом VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) указывает на спорадический КРР.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

В 1960-х годах был впервые описан синдром Линча и была установлена связь между потерей функции MMR и развитием рака.¹⁸ Потеря экспрессии белков MMR (MLH1, PMS2, MSH2 или MSH6) может привести к MSI и повышенному пожизненному риску развития не только КРР, но также и рака желудка, мозга, поджелудочной железы, кожи, эндометрия и яичников. Пациенты с синдромом Линча имеют 50–80 % пожизненного риска развития КРР.^{5,19,20} Синдром Линча уникальным образом отличается от других наследственных раковых синдромов, поскольку проведение прямого исследования опухолевой ткани помогает в идентификации пациентов, находящихся в группе риска развития синдрома Линча, и делает последующий генетический анализ зародышевой линии более информативным. Применение расширенных протоколов скрининга онкологических заболеваний имеет благоприятное значение для семей с синдромом Линча.

Различные руководства, в том числе руководства Национальной комплексной сети онкологических учреждений (NCCN), рекомендуют проводить скрининг всех случаев КРР на предмет потенциального наличия синдрома Линча для идентификации пациентов и семей, которые получают пользу от дальнейшего генетического анализа и консультирования.^{18,21-24} Использование панели VENTANA MMR IHC Panel будет способствовать определению статуса MMR КРР посредством классификации случаев КРР как имеющих неизменную или потерянную экспрессию белка MMR. Обнаружение всех четырех белков MMR в опухоли указывает на нормальную или неизменную 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 KPP потеря экспрессии белка MLH1 происходит ввиду гиперметилирования промотора *MLH1*.^{5,25,26} Важно отметить, что мутация BRAF V600E наблюдается приблизительно в двух третях случаев опухолей, характеризующихся потерей экспрессии MLH1 по причине гиперметилирования промотора *MLH1*. И напротив, мутация BRAF V600E очень редко наблюдается при опухолях, вызванных синдромом Линча.²⁵ Таким образом, если результат окрашивания антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (антитело VENTANA anti-MLH1 (M1)) указывает на потерю экспрессии белка MLH1, антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) может четко определить опухоль как спорадический KPP или вероятный синдром Линча.^{5,27} При KPP 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.^{17,28} Когда потеря экспрессии белка MLH1 сопровождается отрицательным статусом BRAF V600E, потеря экспрессии MLH1 соотносится с высокой вероятностью наличия синдрома Линча.²⁹

ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) представляет собой мышиное моноклональное антитело, вырабатываемое против полноцепочечного рекомбинантного белка MLH1 с маркером GST. Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) связывается с белком MLH1 в фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) срезах ткани. Антитело может быть обнаружено посредством гаптенированного вторичного антитела с последующей обработкой мультимерным конъюгатом HRP (пероксидазы хрена) с антителом к гаптenu (OptiView DAB IHC Detection Kit, Neno каталог 760-700 / 06396500001). После этого специфический комплекс антитела и фермента визуализируется путем осаждения продукта ферментативной реакции. Каждый этап процедуры включает инкубацию в течение строго определенного промежутка времени при заданной температуре. В конце каждой инкубации аппарат BenchMark ULTRA, XT или GX промывает срезы, чтобы остановить реакцию и удалить не связавшиеся вещества, которые могут препятствовать протеканию необходимых реакций на последующих этапах. С помощью данного аппарата также наносится ULTRA LCS (Predilute), Neno каталог 650-210 / 05424534001 или LCS (LCS predilute, № по каталогу 650-010 / 05264839001), который позволяет свести к минимуму испарение водных реагентов с поверхности предметного стекла, содержащего образец.

Помимо окраски антителом VENTANA anti-MLH1 (M1), второе предметное стекло следует окрасить мышиным моноклональным реагентом для отрицательного контроля, Negative Control (Monoclonal) (№ по каталогу 760-2014 / 05266670001). Реагент для отрицательного контроля используется для оценки фонового окрашивания.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 50 анализов.

Один 5 мл дозатор с антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) содержит приблизительно 5 мкг мышиного моноклонального антитела.

Антитело разведено в TBS буфере, содержащем 0,3 % белка-носителя.

Общая концентрация белка в реагенте составляет приблизительно 3 мг/мл.

Концентрация специфических антител составляет около 1 мкг/мл. Неспецифической реактивности антител у данного продукта не обнаружено.

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) является мышиным моноклональным антителом, полученным из супернатанта клеточной культуры.

См. соответствующую часть 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, НО НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ МАТЕРИАЛЫ

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

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

- Дополнительные антитела панели VENTANA MMR IHC Panel:
 - VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody (Neno каталог 760-5094 / 08033692001)
 - VENTANA anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody (Neno каталог 760-5093 / 08033684001)
 - VENTANA anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (Neno каталог 760-5092 / 08033676001)
 - VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Primary Antibody (Neno каталог 760-5095 / 08033706001)
- Negative Control (Monoclonal) (Neno каталог 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 (Neno каталог 760-700 / 06396500001)
- Для VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody, OptiView Amplification Kit (Neno каталог 760-099 / 06396518001 или Neno каталог 860 099 / 06718663001)
- EZ Prep Concentrate (10X) (Neno каталог 950-102 / 05279771001)
- Reaction Buffer Concentrate (10X) (Neno каталог 950-300 / 05353955001)
- ULTRA LCS (Predilute) (Neno каталог 650-210 / 05424534001) или LCS (LCS predilute, № по каталогу 650-010 / 05264839001)
- ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (Neno каталог 950-224 / 05424569001) или Cell Conditioning 1 (CC1) (№ по каталогу 950-124 / 05279801001)
- Hematoxylin II (Neno каталог 790-2208 / 05277965001)
- Bluing Reagent (Neno каталог 760-2037 / 05266769001)
- Постоянная гистологическая среда для заливки образцов (Permount Fisher Neno каталог SP15-500 или эквивалентная)
- Покровное стекло (размера, достаточного для закрытия образцов ткани, например VWR, Neno каталог 48393-060)
- Автоматический аппарат для заключения под покровное стекло (например, Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
- Световой микроскоп
- 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

Данное первичное антитело можно применять для окрашивания подготовленных стандартным образом, фиксированных формалином и залитых в парафин тканей, при условии использования OptiView DAB IHC Detection Kit, а также аппаратов серии BenchMark ULTRA, XT и GX.

Необходимо получить срезы толщиной приблизительно 4 мкм и нанести их на положительно заряженные предметные стекла. Для окрашивания следует использовать свежие срезы тканей, поскольку антигенность тканевых срезов со временем может уменьшаться. Одновременно с исследованием неизвестных образцов рекомендуется провести исследование на положительном и отрицательном тканевых контролях.

При использовании панели VENTANA MMR IHC Panel рекомендуется, чтобы ткань в течение 6 часов после иссечения была зафиксирована в 10 % нейтральном забуференном формалине (NBF) на 6–24 часа из расчета окрашивания в миндаликах. Приемлемое окрашивание также достигалось при фиксации цинк-формалином и фиксаторами Z-5 в течение 6–24 часов. С панелью VENTANA MMR IHC Panel не рекомендуется использовать спиртовой раствор формалина (AFA), 95 % этиловый спирт и фиксаторы PREFER, поскольку в этих случаях ткани демонстрируют нестабильные результаты окрашивания или полное их отсутствие. Используемое количество фиксатора должно составлять от 15 до 20 объемов ткани. За 24 часа фиксатор проникает в плотную ткань не более чем на 2–3 мм, а в пористую ткань — не более чем на 5 мм. Фиксирование следует проводить при комнатной температуре (15–25 °C), 30,31

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики *in vitro* (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. Раствор ProClin 300 используется в данном реагенте в качестве консерванта. Он относится к раздражающим средствам и при контакте с кожей может стать причиной сенсибилизации. При работе с реагентом соблюдайте меры предосторожности. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. Используйте защитную одежду и перчатки.
4. Материалы человеческого или животного происхождения следует считать биологически опасными материалами и утилизировать, соблюдая все необходимые меры предосторожности.
5. Избегайте контакта реагентов с глазами и слизистыми оболочками. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды.
6. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.
7. Проконсультируйтесь с местными и (или) государственными органами в отношении рекомендованного способа утилизации.
8. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.

ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) предназначено для использования на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX в комбинации с OptiView DAB IHC Detection Kit и вспомогательными реагентами. В таблице 1 приведен протокол окрашивания для применения с антителом VENTANA anti-MLH1 (M1). Сведения о влиянии других значений времени и температуры при демаскировке антигена на устойчивость анализа к возникновению ошибок отсутствуют. Поэтому отклонение от рекомендуемых условий для демаскировки антигена, представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными. Следует использовать и документировать надлежащие контроли. Пользователи, которые отклоняются от указанного протокола, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

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

Табл. 1. Протокол окрашивания для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX.

Тип процедуры	Метод		
	BenchMark ULTRA Аппарат	BenchMark XT Аппарат	BenchMark GX Аппарат
Депарафинирование	Выбрано	Выбрано	Выбрано
Кондиционирование клеток (демаскирование антигена)	Cell Conditioning 1, 64 минуты при 100 °C	Cell Conditioning 1, 64 мин	Cell Conditioning 1, 64 мин
Pre-Primary Peroxidase Inhibitor	Выбрано	Выбрано	Выбрано
Антитела (первичные)	24 минут, 36 °C	24 минут, 37 °C	24 минут, 37 °C
OptiView HQ Linker	8 мин (по умолчанию)		
OptiView HRP Multimer	8 мин (по умолчанию)		
Контрастное окрашивание	Hematoxylin II, 4 минуты		
Обработка после контрастирования	Bluing, 4 минуты		

Отклонение от рекомендуемых условий (особенно для демаскировки антигена), представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными. Тем не менее, в связи с различиями в фиксации и обработке тканей, а также в лабораторном оборудовании и внешних условиях может потребоваться увеличение или уменьшение времени инкубации первичных антител в зависимости от отдельных образцов и предпочтений эксперта. Подробную информацию о различиях в методиках фиксации см. в разделе Immunohistochemistry: Principles and Advances (Иммуногистохимический анализ: принципы и достижения).³²

ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Реагент для отрицательного контроля

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-MLH1 (M1). Мышиный моноклональный реагент для отрицательного контроля (Negative Control (Monoclonal), № по каталогу 760-2014 / 05266670001) рекомендуется для использования вместо первичного антитела для оценки неспецифического окрашивания. Параметры окрашивания антитела, используемого с реагентом для отрицательного контроля, должны соответствовать параметрам окрашивания первичного антитела.

Положительный тканевый контроль

При выполнении каждой процедуры окрашивания необходимо проводить положительный тканевый контроль. Оптимальная лабораторная практика — помещение среза для положительного контроля на одно стекло с образцом ткани пациента. Такая практика позволяет распознать случаи, когда первичное антитело или другой важный реагент не оказывают должного эффекта на образец ткани пациента. Для оптимального контроля качества лучше всего подойдет образец ткани, в норме показывающий положительное окрашивание. Положительно окрашиваемые компоненты ткани служат подтверждением того, что антитела нанесены и что прибор работает надлежащим образом. Данная ткань может

содержать как положительно, так и отрицательно окрашиваемые клетки или компоненты ткани и использоваться в качестве как положительного, так и отрицательного тканевого контроля. В качестве контроля следует использовать свежие образцы тканей, полученные в ходе вскрытия, биопсии или хирургических операций. Образцы следует как можно скорее подготовить или зафиксировать по процедуре, используемой для исследуемых образцов. С использованием таких образцов должен контролироваться весь процесс исследования, начиная от подготовки ткани и заканчивая окрашиванием. Использование среза ткани, фиксированного или обработанного по процедуре, отличной от процедуры тестируемого образца, позволяет обеспечить контроль всех реагентов и этапов метода, кроме фиксации и обработки ткани.

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

Ткань KPP с белком MLH1, имеющим клинический статус «Неизменная», или нормальной тканью толстой кишки после предварительной обработки антителом VENTANA anti-MLH1 (M1), может использоваться в качестве положительного тканевого контроля. Нормальная ткань толстой кишки будет иметь результат окрашивания белка MLH1 с использованием антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) «Неизменная». Положительный тканевый контроль должен демонстрировать однозначное ядерное окрашивание в жизнеспособной опухоли и (или) элементах здоровой ткани толстой кишки. Внутренние клетки положительных контролей (например, лимфоциты, фибробласты или здоровый эпителий вблизи опухоли) для всех тканей должны иметь положительный результат окрашивания в ядре.

Отрицательный тканевый контроль

Так как белки MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6 экспрессируются во всех тканях, для данных биомаркеров не существует нормального отрицательного тканевого контроля. Однако ткань KPP, в которой белок MLH1 имеет клинический статус «потерянная», после предварительной обработки антителом VENTANA anti-MLH1 (M1), может использоваться в качестве отрицательного тканевого контроля. Отрицательный тканевый контроль следует использовать только для проверки точности характеристик обработанных тканей, исследуемых реагентов и аппаратов, но не для формулировки конкретного диагноза на основании образцов пациента.

Верификация анализа

Перед начальным использованием антитела или системы окрашивания в диагностической процедуре следует верифицировать специфичность антитела. Для этого выполняется тестирование антитела на серии тканей с известными характеристиками эффективности ИHC, представляющими клинический статус MLH1 как в неизменной ткани. (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 анатомии³³ или CLSI Approved Guideline.³¹)

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОКРАШИВАНИЯ/ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Схема клеточного окрашивания для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) имеет ядерный характер в активно пролиферирующих клетках. Квалифицированный патоморфолог присваивает клинический статус образцам KPP, окрашенным с помощью антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), на основании собственной оценки наличия или отсутствия специфичного ядерного окрашивания в опухолевой ткани. Клинический статус «Неизменная» присваивается образцам с однозначным ядерным окрашиванием в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии приемлемых внутренних положительных контролей (ядерное окрашивание в лимфоцитах, фибробластах или здоровом эпителии вблизи опухоли). Клинический статус «Потерянная» присваивается образцам с однозначной потерей ядерного окрашивания или с фокальным слабым неоднозначным ядерным окрашиванием в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии внутренних положительных контролей, как показано в таблице 2.

Если во внутренних положительных контролях однозначное ядерное окрашивание отсутствует и (или) фоновое окрашивание мешает интерпретации, анализ следует считать неприемлемым. При этом необходимо провести анализ повторно. Точечное ядерное окрашивание опухолевых клеток следует считать отрицательным

(потерянная экспрессия). В случае с фокальным окрашиванием опухолевых клеток интенсивность ядерного окрашивания по меньшей мере должна быть аналогична интенсивности окрашивания внутренних положительных контролей наряду со сливающимся/непрерывным характером окрашивания ядер в нескольких эпителиальных железах или эпителиальных жемчужинах, чтобы образцу был присвоен клинический статус «Неизменная». При отсутствии указанных условий образцу присваивается клинический статус «Потерянная».

Табл. 2. Интерпретация окрашивания для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1)

Клинический статус	Описание
Неизменная экспрессия MLH1	Однозначное ядерное окрашивание в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии внутренних положительных контролей (ядерное окрашивание в лимфоцитах, фибробластах или здоровом эпителии толстой кишки вблизи опухоли).
Потерянная экспрессия MLH1	Однозначная потеря ядерного окрашивания или фокальное слабое неоднозначное ядерное окрашивание в клетках жизнеспособных опухолей в присутствии внутренних положительных контролей.

Образцы, окрашенные антителом VENTANA anti-MLH1 (M1), классифицируются как «Неизменная» или «Потерянная» в зависимости от наличия или отсутствия специфического окрашивания в опухолевой ткани.

ОСОБЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

Антитела и реагенты компании Ventana Medical Systems, Inc. имеют оптимальную концентрацию для применения в соответствии с прилагающейся инструкцией. Отклонение от рекомендуемых условий для демаскировки антигена, представленных в указанном протоколе, может сделать ожидаемые результаты недействительными. Следует использовать и документировать надлежащие контроли. Пользователи, которые отклоняются от указанного протокола, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

При использовании панели VENTANA MMR IHC Panel рекомендуется, чтобы образцы ткани были зафиксированы в 10 % нейтральном забуференном формалине на 6–24 часа в течение 6 часов после иссечения. Приемлемое окрашивание наблюдается после фиксации цинк-формалином и фиксатором Z-5 в течение 6–24 часов. Не рекомендуется фиксировать ткани в 95 % спирте, спиртовом растворе формалина с уксусной кислотой (AFA) или фиксаторах PREFER.

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

- Неспецифическое фоновое окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать неспецифическое фоновое окрашивание по недостаточным причинам. По этой причине оценка предметного стекла с антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) должна включать в себя сравнение предметного стекла с срезом ткани, окрашенным реагентом для отрицательного контроля для определения уровня неспецифического фоновое окрашивания. Цитоплазматическое окрашивание (при наличии) должно игнорироваться при ИHC интерпретации результатов окрашивания антителом VENTANA anti-MLH1 (M1).
- Фокальное окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать фокальное окрашивание в опухолевых клетках; интенсивность окрашивания может варьировать от слабой до сильной. На основании ИHC алгоритма оценивания антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), фокальное слабое неоднозначное ядерное окрашивание в жизнеспособных опухолевых клетках в присутствии внутренних положительных контролей должно квалифицироваться как «потерянная». Окрашивание может варьироваться в зависимости от уровня интенсивности, которая, в свою очередь, может варьироваться в зависимости от опухоли; однако интенсивность не влияет на клинический статус MLH1.
- Точечное окрашивание. Некоторые образцы могут демонстрировать дискретное точечное окрашивание в нескольких ядрах опухоли; интенсивность окрашивания может варьировать от слабой до сильной. Такой характер окрашивания следует игнорировать, и если образец имеет только этот тип

характера окрашивания, ему следует присвоить клинический статус «Потерянная».

- Тканевые артефакты или артефакты, вызванные окрашиванием. Гистологические артефакты, возникающие в ходе обработки образцов и микротомии, также могут осложнить определение ИHC клинического статуса антитела VENTANA anti-MLH1 (M1). К таким артефактам относятся, кроме прочего, градиенты фиксации и краевые эффекты, захват DAB, образование пузырьков в ядре, недостаточное окрашивание на некоторых участках ткани, разрыв или складки ткани и потеря среза ткани. В некоторых случаях может потребоваться повторное окрашивание новых срезов или получение нового образца.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИТЕЛА VENTANA anti-MLH1 (M1)

Аналитическая чувствительность/специфичность

Аналитическая чувствительность и специфичность были определены посредством окрашивания множественных образцов нормальных и опухолевых тканей человека антителом VENTANA anti-MLH1 (M1). Результаты приведены в Таблице 3 и Таблице 4. Положительное окрашивание является ядерным, если не указано иное. В результате окрашивания нормальных и опухолевых тканей антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) непредвиденных результатов получено не было. Как и ожидалось, поскольку репарация неспаренных оснований присутствует во всех активно пролиферирующих клетках, все здоровые и опухолевые ткани продемонстрировали положительное окрашивание.

Табл. 3. Аналитическая чувствительность/специфичность окрашивания FFPE нормальных тканей антителом VENTANA anti-MLH1 (M1)

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

Примечание. Белки репарации неспаренных оснований, такие как MLH1, присутствуют во всех клетках с активной пролиферацией. Для всех тканей

положительное/отрицательное окрашивание определялось для тканеспецифических элементов при наличии положительного окрашивания в здоровых контрольных клетках (лимфоцитах, фибробластах и эпителиальных клетках).

Табл. 4. Аналитическая чувствительность/специфичность окрашивания различных FFPE опухолевых тканей антителом VENTANA anti-MLH1 (M1)

Патология	Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев
Глиобластома (головной мозг)	1/1
Менингиома (головной мозг)	1/1
Эпендимома (головной мозг)	1/1
Олигодендроглиома (головной мозг)	1/1
Серозная аденокарцинома (яичник)	1/1
Аденокарцинома (яичник)	1/1
Панкреато-нейроэндокринное новообразование (поджелудочная железа)	1/1
Семинома (яичко)	1/1
Медуллярная карцинома (щитовидная железа)	1/1
Папиллярная карцинома (щитовидная железа)	1/1
Протоковая карцинома in situ (молочная железа)	1/1
Микроинвазивная протоковая карцинома (молочная железа)	1/1
Инвазивная протоковая карцинома (молочная железа)	1/1
Мелкоклеточная карцинома (легкое)	1/1
Плоскоклеточная карцинома (легкое)	1/1
Нейроэндокринная карцинома (пищевод)	1/1
Аденокарцинома (пищевод)	1/1
Перстневидноклеточная карцинома (желудок)	1/1
Аденокарцинома (тонкая кишка)	1/1
Стромальная саркома (тонкая кишка)	1/1
Гастроинтестинальная стромальная опухоль (GIST) (тонкая кишка)	1/1
Аденокарцинома (толстая кишка)	1/1
Аденокарцинома (прямая кишка)	1/1
Гастроинтестинальная стромальная опухоль (GIST) (прямая кишка)	1/1
Гепатобластома (печень)	1/1
Светлоклеточная карцинома (почка)	1/1
Аденокарцинома (предстательная железа)	2/2
Лейомиома (матка)	1/1
Аденокарцинома (матка)	1/1
Плоскоклеточная карцинома (шейка матки)	2/2

Патология	Кол-во положительных случаев/общее кол-во случаев
Эмбриональная рабдомиосаркома (поперечно-полосатая мускулатура)	1/1
Плоскоклеточная карцинома (кожа)	1/1
Нейрофиброма (поясница)	1/1
Нейробластома (забрюшинное пространство)	1/1
Мезотелиома (брюшина)	1/1
В-клеточная лимфома, неутонченная (лимфатический узел)	3/3
Лимфома Ходжкина (Hodgkin) (лимфатический узел)	1/1
Лейомиосаркома (мочевой пузырь)	1/1
Остеосаркома	1/1
Веретеноклеточная рабдомиосаркома (брюшина)	1/1
Лейомиосаркома (гладкая мускулатура)	1/1

Примечание. Белки репарации неспаренных оснований, такие как MLH1, присутствуют во всех клетках с активной пролиферацией. Для всех тканей положительное/отрицательное окрашивание определялось для опухолевых клеток при наличии положительного окрашивания в здоровых контрольных клетках (лимфоцитах, фибробластах и эпителиальных клетках).

Внутриутробная повторяемость и межсуточная прецизионность

Повторяемость и прецизионность окрашивания антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) оценивались на аппарате BenchMark ULTRA в сочетании с OptiView DAB IHC Detection Kit.

Внутриутробная повторяемость оценивалась с использованием 10 образцов KPP (5 с неизменной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией MLH1). Пять реплицированных предметных стекол каждого из образцов KPP окрашивались антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) на одном аппарате BenchMark ULTRA в один день. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все предметные стекла были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им статус «Неизменная» или «Потерянная».

Межсуточная прецизионность также оценивалась с использованием 10 образцов KPP (5 с неизменной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией MLH1). Реплицированные предметные стекла каждого из образцов KPP окрашивались антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) на аппарате BenchMark ULTRA в каждый из 5 непоследовательных дней. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все предметные стекла были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им статус «Неизменная» или «Потерянная».

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 межсуточной прецизионности продемонстрировали 100%-е совпадение положительных результатов (PPA), 100%-е совпадение отрицательных результатов (NPA) и общее 100%-е совпадение результатов (OPA). Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 5.

Табл. 5. Внутриутробная повторяемость и межсуточная прецизионность окрашивания антителом VENTANA anti-MLH1 (M1), согласно выявленному клиническому статусу (неизменная или потерянная)

Повторяемость/прецизионность	Клинический статус	Совпадение			
		Тип	n/N	%	95% CI
Внутриутробная повторяемость	Неизменная	PPA	25/25	100,0	(86,7; 100,0)
	Потерянная	NPA	25/25	100,0	(86,7; 100,0)
	Всего	OPA	50/50	100,0	(92,9; 100,0)
Межсуточная прецизионность	Неизменная	PPA	50/50	100,0	(92,9; 100,0)
	Потерянная	NPA	50/50	100,0	(92,9; 100,0)
	Всего	OPA	100/100	100,0	(96,3; 100,0)

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

Прецизионность между разными аппаратами BenchMark

Прецизионность между разными аппаратами BenchMark ULTRA для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) определялась методом окрашивания реплицированных предметных стекол с 10 образцами KPP (5 с неизменной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией MLH1) на 3 аппаратах BenchMark ULTRA с применением антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) и использованием OptiView DAB IHC Detection kit. Реплицированные предметные стекла каждого из образцов KPP окрашивались антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) на 3 аппаратах BenchMark ULTRA.

Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Все предметные стекла были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов, провел их оценку и присвоил им клинический статус «Неизменная» или «Потерянная». 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 6.

Табл. 6. Прецизионность между разными аппаратами BenchMark ULTRA для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), согласно выявленному клиническому статусу (неизменная или потерянная)

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

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

Кроме того, прецизионность между разными аппаратами для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) определялась методом окрашивания реплицированных предметных стекол с 6 образцами KPP (4 с неизменной экспрессией и 2 с потерянной экспрессией MLH1) на 3 аппаратах BenchMark XT и 3 аппаратах BenchMark GX с применением антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) и использованием OptiView DAB IHC Detection Kit.

было проведено 15 наблюдений на каждый образец при объединении 3 аппаратов; медиана для каждого образца определялась по этим 15 наблюдениям. Индивидуальные наблюдения одного и того же образца считались согласующимися с медианной интенсивностью сигнала образца, если их интенсивность находилась в пределах 0,5. При определении прецизионности между аппаратами BenchMark XT и BenchMark GX для каждого образца был выполнен сравнительный анализ пар по уровню интенсивности окрашивания опухолевой ткани. Результаты были следующими: 100 % OPA между 3 аппаратами BenchMark XT и 100 % OPA между 3 аппаратами BenchMark GX. Для всех предметных стекол уровень фонового окрашивания был приемлемым ($\leq 0,5$) как на аппаратах BenchMark XT, так и на аппаратах GX.

Конкордантность платформы BenchMark

Конкордантность между аппаратами BenchMark ULTRA, XT и GX для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) была определена методом окрашивания образцов KPP антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit. Клинический статус всех предметных стекол (неизменная/потерянная) оценивался одним и тем же патоморфологом.

Между платформами было проведено парное сравнение клинических статусов образцов KPP, в том числе сравнение GX с ULTRA (128 образцов с неизменной экспрессией и 23 с потерянной экспрессией); сравнение GX с XT (128 образцов с неизменной экспрессией и 22 с потерянной экспрессией); и сравнение ULTRA с XT (140 образцов с неизменной экспрессией и 23 с потерянной экспрессией). Все парные сравнения, выполненные между платформами, продемонстрировали 100%-е среднее совпадение положительных результатов (APA), среднее совпадение отрицательных результатов (ANA) и OPA.

Исследования прецизионности оценок эксперта

Прецизионность по каждому эксперту и между экспертами оценивалась по 20 образцам KPP (11 с неизменной экспрессией и 9 с потерянной экспрессией), окрашенным антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) и OptiView DAB IHC Detection Kit. Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца.

Все предметные стекла были рандомизированы и оценивались 3 патоморфологами на предмет клинического статуса MLH1 «неизменная» или «потерянная». Патоморфологам был неизвестен диагноз образцов. После четырехнедельного отмычного периода окрашенные антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) предметные стекла были повторно рандомизированы для проведения второй оценки клинического статуса MLH1 каждым из 3 патоморфологов. Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило $\leq 0,5$.

Для определения прецизионности по каждому эксперту сравнивали исходную и итоговую оценки слайда, полученные от одного и того же патоморфолога. Всего было выполнено сравнение 20 предметных стекол с срезом KPP на каждого патоморфолога. Сравнения 3 патоморфологов были объединены и продемонстрировали 98,5% APA, 98,1% ANA и 98,3% OPA для прецизионности по каждому эксперту. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 7.

Для определения прецизионности между экспертами сравнивали все оценки предметных стекол (20 KPP x 2 оценки/образец x 3 патоморфолога = 120 оценок предметных стекол) со статусом модального образца для каждого образца KPP. Результаты демонстрируют 100 % PPA, 98,1 % NPA и 99,2 % OPA для прецизионности между экспертами. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 7.

Табл. 7. Прецизионность по каждому эксперту и между экспертами оценивалась антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) для образцов KPP, согласно выявленному клиническому статусу MLH1 (неизменная/потеря)

Точность	Клинический статус	Совпадение			
		Тип	n/N	%	95% CI
По каждому эксперту	Неизменная	APA	66/67	98,5	(88,0; 100,0)

Точность	Клинический статус	Совпадение			
		Тип	n/N	%	95% CI
Между экспертами	Неизменная	PPA	66/66	100,0	(94,5; 100,0)
	Потерянная	NPA	53/54	98,1	(90,2; 99,7)
	Всего	OPA	119/120	99,2	(95,4; 99,9)

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

Прецизионность между партиями

Прецизионность между партиями антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) была определена методом анализа 3 производственных партий антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), каждая с использованием строчных предметных стекол из 10 образцов KPP (5 с неизменной экспрессией и 5 с потерянной экспрессией MLH1) на аппарате BenchMark ULTRA с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit.

Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) предметное стекло объединялось с окрашенным реагентом для отрицательного контроля предметным стеклом в рамках одного образца. Наборы предметных стекол были рандомизированы, а затем их оценку провел один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен диагноз образцов и номер партии антитела VENTANA anti-MLH1 (M1). Ни одно из окрашенных предметных стекол с реагентом для отрицательного контроля не продемонстрировало специфического окрашивания, а фоновое окрашивание составило $\leq 0,5$.

При определении прецизионности между партиями антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) все оценки предметных стекол сравнивались со статусом модального образца для каждого образца KPP. Показатель OPA между партиями антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) составил 100 %, продемонстрировав, что окрашивание антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) является воспроизводимым между партиями антитела.

Сводные данные полученных результатов для анализа прецизионности между партиями антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) приведены в таблице 8.

Табл. 8. Прецизионность между партиями антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), согласно выявленному клиническому статусу (неизменная или потерянная)

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

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

Исследование воспроизводимости результата между лабораториями

Исследование воспроизводимости результата между лабораториями для панели VENTANA MMR IHC Panel было проведено для демонстрации воспроизводимости каждого анализа панели VENTANA MMR IHC Panel для определения клинического статуса. В исследование было включено 6 образцов ткани KPP (3 с 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. Образцы были рандомизированы и оценены в общей сложности 6 экспертами (по 2 в каждом исследовательском центре), которые не знали заранее, каков клинический статус MMR в образцах набора исследования. Для каждого из 40 образцов в исследовании было проведено 30 наблюдений по всем дням, исследовательским центрам и экспертам. Эталонный статус модального образца был получен для каждого образца на основании наиболее часто наблюдаемого статуса в 30 наблюдениях. Всего в исследовании было проведено 1200 наблюдений для всех пяти белков. Для всех оцениваемых образцов уровень приемлемости в отношении морфологических структур и фона в данном исследовании составил 100 %. Сводные данные по объединенным (для всех пяти белков) статистическим показателям совпадений между эталонным статусом модального образца и индивидуальными наблюдениями приведены в таблице 9.

Табл. 9. Совпадения между панелью VENTANA MMR IHC Panel и эталонным статусом модального образца

Межлабораторная повторяемость	Клинический статус	Совпадение			
		Тип	n/N	%	95% CI
Все белки	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 или «положительный» или «отрицательный» для белка BRAF V600E. Значения 95% доверительного интервала были рассчитаны с использованием подхода на основе обобщенной оценочной модели со смешанными эффектами (GLMM).

Кроме того, для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) были проведены парные сравнения между исследовательскими центрами, межсуточными показателями и показателями между экспертами. Для MLH1 этот набор исследований включал в общем 180 наблюдений. Сводные данные полученных результатов приведены в таблице 10. Данные обозначают повторяемость анализа по 5 дням, 3 исследовательским центрам и 6 экспертам.

Табл. 10. Показатели парных совпадений межлабораторной воспроизводимости для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1), согласно выявленному клиническому статусу (неизменная или потерянная)

Межлабораторная повторяемость		Совпадение			
		Тип	n/N	%	95% CI
Между исследовательскими центрами (3 исследовательских центра)		APA	360/360	100,0	(98,9; 100,0)
		ANA	360/360	100,0	(98,9; 100,0)
		OPA	360/360	100,0	(98,9; 100,0)
Межсуточная (5 непоследовательных дней)	Лаборатория А	APA	120/120	100,0	(96,9; 100,0)
		ANA	120/120	100,0	(96,9; 100,0)
		OPA	120/120	100,0	(96,9; 100,0)
	Лаборатория В	APA	120/120	100,0	(96,9; 100,0)
		ANA	120/120	100,0	(96,9; 100,0)
		OPA	120/120	100,0	(96,9; 100,0)
		APA	120/120	100,0	(96,9; 100,0)

Межлабораторная повторяемость		Совпадение			
		Тип	n/N	%	95% CI
Лаборатория С		ANA	120/120	100,0	(96,9; 100,0)
		OPA	120/120	100,0	(96,9; 100,0)
		OPA	120/120	100,0	(96,9; 100,0)
Между экспертами (2 патоморфолога на исследовательский центр)		APA	90/90	100,0	(95,9; 100,0)
		ANA	90/90	100,0	(95,9; 100,0)
		OPA	90/90	100,0	(95,9; 100,0)

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

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

Исследование было проведено для сравнения эффективности использования панели VENTANA MMR IHC Panel и молекулярного тестирования, в том числе комплексной панели образцов тканей толстой кишки для секвенирования ДНК с целью идентификации 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» при исследовании методом ИHC, чтобы гарантировать, что потеря экспрессии каждого маркера будет отражена в исследовании. Тканевые срезы всех образцов исследования были окрашены методом ИHC с использованием панели VENTANA MMR IHC Panel и соответствующих реагентов для отрицательного контроля. Дополнительные тканевые срезы были обработаны с помощью панели образцов ткани толстой кишки для секвенирования ДНК. Гиперметилирование промотора MLH1 — один из механизмов, который может привести к потере экспрессии белка MLH1, и его связывают со спорадическим KPP, а не с потенциальным синдромом Линча. Поэтому все образцы с потерей экспрессии MLH1, идентифицированные методом ИHC 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 ИHC. 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, положительный в отношении гиперметилирования промотора MLH1 и (или) положительный в отношении мутации BRAF V600E). В этом исследовании патогенная мутация в опухоли определяется как герминативная или соматическая мутация, которая, согласно прогнозу, приводит к потере экспрессии белка MMR. Показатели точечной оценки составили 99,4 % PPA, 93,5 % NPA и 98,8 % OPA, как показано в таблице 11.

Также был проведен сводный анализ для сравнения четырех ИHC маркеров MMR (без антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) с результатами молекулярного

тестирования. Показатели точечной оценки составили 99,3 % PPA, 89,7 % NPA и 98,5 % OPA, как показано в таблице 12.

В рамках дополнительного анализа сравнили результаты исследования методом ИХС для четырех маркеров MMR с результатами молекулярного тестирования генов MMR на уровне одного образца, чтобы включить в исследование статус всех маркеров и получить результат dMMR/pMMR при использовании двух методов. Результаты данного анализа представлены в таблице 13, OPA при применении двух методов составляет 97,4 %.

В рамках исследования было выполнено сравнение статуса MMR при исследовании методом ИХС 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-MSH4 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody.

Клинический статус BRAF V600E в образцах KPP, полученных методом ИХС 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 ИХС тестирования с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и применением метода секвенирования ДНК в качестве эталона составили 100 % (таблица 14). Было проведено дополнительное тестирование для подтверждения способности антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) к четкому определению образцов KPP, демонстрирующих потерю экспрессии белка MLH1. Из 23 образцов, положительных в отношении BRAF V600E, в 20 методом ИХС 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 KPP. Результаты подтвердили, что антитело VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) правильно идентифицирует образцы KPP, имеющие мутацию BRAF V600E. Также данные подтвердили возможность использования антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) для дифференциации спорадического KPP и вероятного синдрома Линча при отсутствии экспрессии белка MLH1.

Табл. 11. Совокупный анализ для совпадений панели VENTANA MMR IHC Panel между ИХС и молекулярным тестированием

Статус* (Молекулярное тестирование/ИХС)	Совпадение			
	Тип	n/N	%	95% CI
Нормальный/неизменная	PPA	523/526	99,4	(98,7; 100,0)
Аномальный/потерянная	NPA	58/62	93,5	(87,1; 98,6)
Всего	OPA	581/588	98,8	(98,0; 99,7)

* При использовании метода ИХС 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. 12. Совокупный анализ совпадений четырех ИХС маркеров MMR (без антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1)) между ИХС и молекулярным тестированием

Статус* (Молекулярное тестирование/ИХС)	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 ИХС 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. 13. Совпадения четырех маркеров MMR при исследовании методом ИХС 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 ИХС 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. 14. Совпадения между методом ИХС с использованием антитела VENTANA anti-BRAF V600E (VE1) и молекулярным тестированием

BRAF V600E Статус (Молекулярное тестирование/ИХС)	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 ИХС 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.

1. Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(10):1269-1277.
2. Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(11):1393-1406.
3. Tiwari AK, Roy HK, Lynch HT. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. *QJM.* 2016;109(3):151-158.
4. Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016;16(5):591-604.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(10):919-932.
9. Peltomäki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21(6):1174-1179.
10. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer.* 1996;78(6):1149-1167.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Connell LC, Mota JM, Braghieri 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting DNA mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. *Semin Diagn Pathol.* 2015;32(5):352-361.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Carson FL, Hladik C, Cappellano CH, Pathology ASFC. *Histotechnology: A Self-Instructional Text: American Society for Clinical Pathology;* 2015.
30. CCLI. *Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition.* CCLI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CCLI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
31. Roche PC, Hsi ED, Firfer BL. *Immunohistochemistry: Principles and Advances. Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology,* 7th Edition: American Society of Microbiology; 2006.
32. Rabinovitch A. *The College of American Pathologists laboratory accreditation program. Accreditation and Quality Assurance.* 2002;7(11):473-476.

ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

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

Все остальные товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

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

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

www.ventana.com

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 белка MLH1 иммуногистохимическим методом в диагностике *in vitro* к иммуноштейнерам автоматическим серии BenchMark (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody)

(далее по тексту может использоваться антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody, VENTANA anti-MLH1 (M1) Primary Antibody, антитело VENTANA anti-MLH1 (M1), реагент, антитело)

Назначение для обращения на территории Российской Федерации

Первичное мышиное моноклональное антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody предназначено для качественного обнаружения белка MLH1 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-MLH1 (M1) 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).

Состав (дополнение)

Первичное мышиное моноклональное антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody содержит следующие материалы животного происхождения:

1Название материала - Козий глобулин (10043)

Характер - Потенциальный возбудитель инфекции*

Тип - Белок

Источник - Животное (коза)

2Название материала - Казеин (10105)

Характер - Потенциальный возбудитель инфекции*

Тип - Белок из коровьего молока

Источник - Животное (корова)

3Название 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 метода определения

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) представляет собой мышиное моноклональное антитело, вырабатываемое против полноцепочечного рекомбинантного белка MLH1 с маркером GST. Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) связывается с белком MLH1 в фиксированных формалином

и залитых в парафин срезах ткани. Антитело может быть обнаружено посредством гаптенированного вторичного антитела с последующей обработкой мультимерным конъюгатом HRP (пероксидазы хрена) с антителом к гаптену (OptiView DAB IHC Detection Kit. После этого специфический комплекс антитела и фермента визуализируется путем осаждения продукта ферментативной реакции. Каждый этап процедуры включает инкубацию в течение строго определенного промежутка времени при заданной температуре. В конце каждой инкубации аппарат VENTANA BenchMark ULTRA, VENTANA BenchMark XT или VENTANA BenchMark GX промывает срезы, чтобы остановить реакцию и удалить не связанные 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), который позволяет свести к минимуму испарение водных реагентов с поверхности предметного стекла, содержащего образец.

Помимо окраски антителом VENTANA anti-MLH1 (M1), второе предметное стекло следует окрасить 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. Несоответствие 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. Несоответствие 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 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 КРР 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

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

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 ИГХ 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 точно оценить мутационный статус генеративной линии микроорганизмов. Потеря PMS2 на фоне экспрессии MLH1 или потеря экспрессии MSH2 или MSH6 свидетельствует, что в опухоли потеря 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-MLH1 (M1) Primary Antibody стабильно максимально 24 месяца с даты производства (дату производства см. на упаковке).

VENTANA anti-MLH1 (M1) 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 30°C.

Меры предосторожности и предупреждения (дополнение)

-Только для *in vitro* диагностики (IVD).

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

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-MLH1 (M1) 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-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody предназначено для качественного обнаружения белка MLH1 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-MLH1 (M1) 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.

Интерпретация окрашивания / ожидаемые результаты (дополнение)

Ткань пациента

Квалифицированный специалист классифицирует ткани по общей интенсивности специфического окрашивания по шкале 0 – 4+ только в справочных целях. Шаг по шкале оценки составляет 0,5 балла для отражения слабых изменений в интенсивности окрашивания.

Ткань пациента должна оцениваться в соответствии с критериями оценки интенсивности окрашивания, приведенными в Таблице 1.

Клинический статус ткани, окрашенной антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) присваивается в соответствии с критериями, приведенными в Таблице 2 (основная часть инструкции).

В образцах ткани KPP должна наблюдаться интенсивность специфического окрашивания 3,0 балла или выше в ядрах жизнеспособных опухолевых клеток и внутренних клетках положительного контроля (лимфоциты, фибропласты или здоровый эпителий вблизи опухоли).

Таблица 1. Критерии оценки интенсивности окрашивания антителом VENTANA anti-MLH1 (M1)

Оценка	Наблюдение под микроскопом
0	Признаков окрашивания не обнаружено
0,5	Слабое
1	Присутствие некоторых видимых пятен, часто слабого окрашивания
1,5	Низкая интенсивность и низкая степень окрашивание соответствующих элементов ткани
2,0	Слабая интенсивность, отсутствие окрашивания многих элементов соответствующей ткани
2,5	Интенсивность меньше средней, наиболее подходящие элементы ткани окрашиваются надлежащим образом

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

3,0	Средняя интенсивность, соответствующие элементы ткани окрашиваются надлежащим образом в зависимости от обилия антигена
3,5	Более высокая интенсивность окрашивания, все соответствующие элементы ткани окрашены надлежащим образом
4,0	Сильная интенсивность окрашивания, все соответствующие элементы ткани окрашены надлежащим образом

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-MLH1 (M1), должна сохраняться как минимум у 90% окрашенных образцов.

Неспецифическое фоновое окрашивание антителом VENTANA anti-MLH1 (M1)

Неспецифическое фоновое окрашивание представляет собой непредвиденное окрашивание, отличающееся от типичной картины окрашивания. Неспецифическое фоновое окрашивание антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) оценивается в соответствии с критериями, приведенными в Таблице 3.

Таблица 3. Критерии неспецифического фонового окрашивания антителом VENTANA anti-MLH1 (M1)

Классификация	Оценка	Наблюдение под микроскопом
Приемлемо	0	Отсутствие фонового окрашивания
	0,5	Некоторое четко выраженное неспецифическое окрашивание, не препятствующее интерпретации окрашивания
Не приемлемо	1	Имеется неспецифическое окрашивание/мешает интерпретации специфического сигнала
	1,5	Неспецифическое окрашивание в значительной степени препятствует интерпретации специфического окрашивания
	2	Неспецифическое окрашивание в значительной степени препятствует интерпретации, половина интенсивности специфического окрашивания
	2,5	Неспецифическое окрашивание чрезвычайно препятствует интерпретации специфического сигнала
	3	Неспецифическое окрашивание невозможно отличить от специфического окрашивания
	3,5	Неспецифическое окрашивание почти такое же интенсивное, как и специфическое окрашивание
	4	Неспецифическое окрашивание, не имеющее четкого отличия от специфического окрашивания

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.

Ткань КРР с белком MLH1, имеющим клинический статус «Неизменная», или нормальной тканью толстой кишки после предварительной обработки антителом VENTANA anti-MLH1 (M1), может использоваться в качестве положительного тканевого контроля. Нормальная ткань толстой кишки будет иметь результат окрашивания белка MLH1 с использованием антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) «Неизменная». Положительный тканевый контроль должен демонстрировать однозначное ядерное окрашивание в жизнеспособной опухоли и (или) элементах здоровой ткани толстой кишки. Внутренние клетки положительных контролей (например, лимфоциты, фибробласты или здоровый эпителий вблизи опухоли) для всех тканей должны иметь положительный результат окрашивания в ядре и проявлять интенсивность специфического окрашивания 3,0 балла или выше.

Также в качестве положительного контроля может использоваться ткань миндалин.

Ткань миндалин (ткань положительного контроля) должна оцениваться на приемлемость в соответствии с критериями, описанными в Таблице 4.

Таблица 4. Критерии приемлемости ткани миндалин (ткань положительного контроля)

Приемлемо	Неприемлемо
Ядра в герминальном центре должны иметь четкую сильную интенсивность окрашивания (в 3 балла и выше), в то время как межфолликулярная область в основном должна иметь интенсивность окрашивания от средней до слабой (от 3 до 2 баллов) ПРИ отсутствии неспецифического фонового окрашивания, мешающего интерпретации.	Отсутствие четкого окрашивания ядер в клетках герминального центра и мантийной зоны ИЛИ Неспецифическое окрашивание фона, мешающее интерпретации.

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

Результаты считаются неприемлемыми, если окрашенные образцы контрольной ткани не проявляют приемлемую интенсивность окрашивания.

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

Отрицательный тканевый контроль

Так как белки MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6 экспрессируются во всех тканях, для данных биомаркеров не существует нормального отрицательного тканевого контроля. Однако ткань KPP, в которой белок MLH1 имеет клинический статус «потерянная», после предварительной обработки антителом VENTANA anti-MLH1 (M1), может использоваться в качестве отрицательного тканевого контроля.

Отрицательный тканевый контроль следует использовать только для проверки точности характеристик обработанных тканей, исследуемых реагентов и аппаратов, но не для формулировки конкретного диагноза на основании образцов пациента.

Реагент для отрицательного контроля

Отрицательный контроль Mouse IG (Negative Control Mouse IG) используется для оценки фоновой окраски, не связанного с антителом VENTANA anti-MLH1 (M1).

Интенсивность фоновой окраски, 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 3 и 4 (основная часть инструкции) приводятся результаты проведенных исследований с применением антитела VENTANA anti-MLH1 (M1).

Оценка иммунореактивности антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) проводилась на множественных образцах нормальных и опухолевых тканей человека, а также на образцах тканей нормального мочевого пузыря, паращитовидной железы, яичника, надпочечников, яичка, тимуса, костного мозга, легких, сердца, пищевода, желудка, печени, языка/слиюнной железы, простаты, эндометрия, скелетных мышц, и тканевые блоки, содержащие ткань периферического нерва и мезотелия. В качестве положительного контроля в данном исследовании использовали один образец ткани миндалин.

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

Оценка интенсивности окрашивания проводилась по шкале 0-4+ в соответствии с критериями, перечисленными в Таблице 1, оценка приемлемости фоновой окраски 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.

Срезам ткани, окрашенным антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) должен быть присвоен клинический статус «Неизменная» или «Потерянная» в соответствии с критериями, представленными в Таблице 2 (основная часть инструкции).

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) показало положительное ядерное окрашивание на 100% (103/103) множественных образцах нормальных тканей человека.

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) показало положительное ядерное окрашивание на 100% (46/46) множественных образцах опухолевых тканей человека.

У 100% (149/149) оцениваемых образцов нормальных тканей имели приемлемую ($\leq 0,5$ балла) интенсивность фоновой окраски. Морфология тканей была приемлемой у 100% (149/149) оцениваемых образцов.

Критерий приемлемости: Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) должно демонстрировать фоновую/перекрестную иммунореактивность интенсивностью не более, чем 0,5 балла по шкале 0-4+ как минимум у 90% окрашенных образцов.

Повторяемость и Прецизионность (дополнение)

Внутриислужная повторяемость и межислужная прецизионность

В качестве положительного контроля в данном исследовании использовали один образец ткани миндалин.

Оценка интенсивности окрашивания проводилась по шкале 0-4+ в соответствии с критериями, перечисленными в Таблице 1, оценка приемлемости фоновой окраски 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.

Критерии приемлемости:

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) должно продемонстрировать одинаковый клинический статус как минимум для 90% образцов, испытываемых в пределах одного дня.

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) 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 миндалин.

Оценка интенсивности окрашивания проводилась по шкале 0-4+ в соответствии с критериями, перечисленными в Таблице 1, оценка приемлемости фоновой окраски 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.

Кроме того, прецизионность между разными аппаратами для антитела VENTANA anti-MLH1 (M1) определялась методом окрашивания реплицированных предметных стекол с 6 образцами KPP (4 с неизменной экспрессией и 2 с потерянной экспрессией MLH1) на 3 аппаратах VENTANA BenchMark XT и 3 аппаратах VENTANA BenchMark GX с применением антитела VENTANA anti-MLH1 (M1).

Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) предметное стекло объединялось с окрашенным отрицательным контролем Mouse IG (Negative Control Mouse IG) предметным стеклом в рамках одного образца. В качестве положительного контроля в данном исследовании использовали один образец ткани миндалин.

Все пары предметных стекол были рандомизированы, а затем один и тот же патоморфолог, которому был неизвестен клинический статус образцов, провел их оценку и присвоил им статус «Неизменная» или «Потерянная» в соответствии с критериями, приведенными в Таблице 2 (основная часть инструкции).

Оценка интенсивности окрашивания проводилась по шкале 0-4+ в соответствии с критериями, перечисленными в Таблице 1, оценка приемлемости фоновой окраски 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.

Критерии приемлемости:

Интенсивность окрашивания не должна отличаться более, чем на 0,5 балла, от средней оценки по одному и тому же образцу ткани как минимум у 90% испытываемых образцов между тремя приборами одной и той же платформы на приборе VENTANA BenchMark ULTRA. Антитело должно продемонстрировать одинаковый клинический статус как минимум для 90% испытываемых образцов между тремя приборами одной и той же платформы на приборе VENTANA BenchMark ULTRA.

Интенсивность окрашивания не должна отличаться более, чем на 0,5 балла, от средней оценки по одному и тому же образцу ткани как минимум у 90% испытываемых образцов между тремя приборами одной и той же платформы на приборе VENTANA BenchMark XT. Антитело должно продемонстрировать одинаковый клинический статус как

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

минимум для 90% испытуемых образцов между тремя приборами одной и той же платформы на приборе VENTANA BenchMark XT.

Интенсивность окрашивания не должна отличаться более, чем на 0,5 балла, от средней оценки по одному и тому же образцу ткани как минимум у 90% испытуемых образцов между тремя приборами одной и той же платформы на приборе VENTANA BenchMark GX. Антитело должно продемонстрировать одинаковый клинический статус как минимум для 90% испытуемых образцов между тремя приборами одной и той же платформы на приборе VENTANA BenchMark GX.

Конкордантность платформы BenchMark (межплатформенная воспроизводимость)

Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) предметное стекло объединялось с окрашенным отрицательным контролем Mouse IG (Negative Control Mouse IG) предметным стеклом в рамках одного образца. В качестве положительного контроля в данном исследовании использовали один образец ткани миндалины.

Оценка интенсивности окрашивания проводилась по шкале 0-4+ в соответствии с критериями, перечисленными в Таблице 1, оценка приемлемости фоновое 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.

Критерии приемлемости:

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) должно продемонстрировать одинаковый клинический статус как минимум для 90% испытуемых образцов в трех приборах на одной платформе.

Исследования прецизионности оценок эксперта

В качестве положительного контроля в данном исследовании использовали один образец ткани миндалины.

Оценка интенсивности окрашивания проводилась по шкале 0-4+ в соответствии с критериями, перечисленными в Таблице 1, оценка приемлемости фоновое 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.

Критерии приемлемости:

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) должно продемонстрировать одинаковый клинический статус как минимум для 90% испытуемых образцов по каждому эксперту.

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) 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 миндалины.

Оценка интенсивности окрашивания проводилась по шкале 0-4+ в соответствии с критериями, перечисленными в Таблице 1, оценка приемлемости фоновое 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.

Критерии приемлемости:

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) должно продемонстрировать одинаковый клинический статус как минимум для 90% испытуемых образцов для различных партий

Исследование воспроизводимости результата между лабораториями

Каждое окрашенное антителом VENTANA anti-MLH1 (M1) предметное стекло объединялось с окрашенным отрицательным контролем Mouse IG (Negative Control Mouse IG) предметным стеклом в рамках одного

образца. В качестве положительного контроля в данном исследовании использовали один образец ткани миндалины.

Оценка интенсивности окрашивания проводилась по шкале 0-4+ в соответствии с критериями, перечисленными в Таблице 1, оценка приемлемости фоновое 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.

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.

Упаковка

Антитело VENTANA anti-MLH1 (M1) 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 иммунофлуоресценции 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 (± 2 мм)

Длина: 62,7 мм (± 1 мм)

Ширина: 37,9 мм (± 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:

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

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

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
CE-маркировка
QR-код
Предупреждение для диагностики in vitro
Знак «Смотрите инструкцию по применению»
Название и адрес производителя

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
Температурные ограничения
Предупреждение для диагностики in vitro
CE-маркировка
Штрих-код
QR-код
Производственный код
Глобальный номер предмета торговли
Полное название, адрес, телефон производителя
Ссылка на электронную инструкцию на русском языке
Страна происхождения
Обозначение, что пригодно для вторичной переработки

Маркировка на русском языке

Первичное мышиное моноклональное антитело для качественного обнаружения белка MLH1 иммуногистохимическим методом в диагностике in vitro к иммуногистохимическим автоматическим серии BenchMark (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody)

Срок годности см. на упаковке.
Дату 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 08033668001 (760-5091)

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 белка MLH1 иммуногистохимическим методом в диагностике in vitro к иммуногистохимическим автоматическим серии BenchMark (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-MLH1 (M1) 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.

Регистрационное удостоверение № _____ от _____

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

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 белка MLH1 иммуногистохимическим методом в диагностике *in vitro* к иммуноштейнерам автоматическим серии BenchMark (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-MLH1 (M1) 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 антител VENTANA anti-MLH1 (M1) 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 антител VENTANA anti-MLH1 (M1) 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 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-MLH1 (M1) 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 (Иммуногистостейнер автоматический Ventana BenchMark XT с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05251от 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 Диагностикс ГмбХ»]

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

[Логотип компании «Рош»]

Вер. 1.0

[Заголовок документа «Инструкция по применению на медицинское изделие „Первичное мышинное моноклональное антитело для качественного обнаружения белка MLH1 иммуногистохимическим методом в диагностике *in vitro* к иммуностейнерам автоматическим серии BenchMark (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody)“ производства компании „Рош Диагностикс 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 Диагностикс ГмбХ»

(Roche Diagnostics GmbH)

Дата: 17 августа 2020 г.

/подпись/

Андреа Вебер (Andrea Weber)

Руководитель проекта по международно-правовому регулированию

Штамп:

[Штамп:

«Рош Диагностикс ГмбХ»

(Roche Diagnostics GmbH)

Сандхофер Штрассе 116

68305 Маннхайм

(Sandhofer Straße 116

68305 Mannheim)]

2020 г.

«Рош Диагностикс 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 белка MLH1 иммуногистохимическим методом в диагностике *in vitro* к иммуностейнерам автоматическим серии BenchMark (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-MLH1 (M1) 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 (Tiwarī 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 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. Д. А. Лоус, Т. Пирсон, С. СENGУПТА, 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, Boulous 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. Шиа, 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. 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).
16. 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).
17. 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).
18. Ф. М. Джардьерло, 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).
19. 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).
 20. 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).
 21. 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).
 22. 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).
 23. 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).
 24. А. Умар, К. Р. Боланд, Дж. П. Тердиман, С. Сингал, А. де ла Чепель 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).
 25. 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).
 26. Дж. Шиа. 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).

27. А. Тиль, М. Хейнонен, Дж. Кантонен, А. Джиллинг, Л. Латинен и соавт. Мутации BRAF при спорадическом 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).
28. 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).
29. К. Койнума, К. Шито, И. Миякура, Т. Фурукава, И. Ямасита и соавт. Мутации BRAF связаны с обширным метилированием промотора hMLH1 при спорадических 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).
30. 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).
31. 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).
32. 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).
33. 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).

© «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)

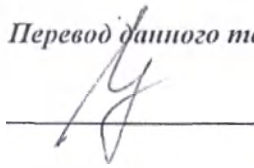
[Далее следует текст документа «Приложение 1 к инструкции по применению на медицинское изделие „Первичное мышечное моноклональное антитело для качественного обнаружения белка MLH1 иммуногистохимическим методом в диагностике *in vitro* к иммуноштейнерам автоматическим серии BenchMark (VENTANA MMR IHC Panel: VENTANA anti-MLH1 (M1) 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.


Город Москва

Российская Федерация

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.

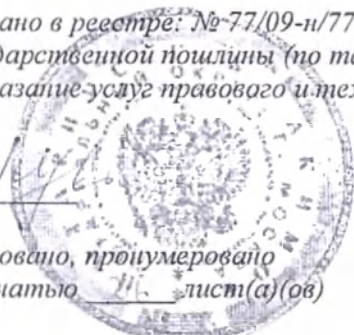
Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 77/09-н/77-2020- *95-5540*

Взыскано государственной пошлины (по тарифу): 100 руб.

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


Всего прошитуровано, пронумеровано
и скреплено печатью 11 лист(а)(ов)

ВРИО нотариуса


Н.А. Мартынова


Российская Федерация
Город Москва

Семнадцатого сентября две тысячи двадцатого года

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

Зарегистрировано в реестре № 21/86-н/77-2020.

Взыскано государственной пошлины (по тарифу):

Уплачено за оказания услуг правового и технического характера:

28-3263

280

1400р
Л.В. Дейнеко



Всего прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 24 лист(а-ов)