



КОПИЯ



V1.0

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

(INSTRUCTION FOR USE)

НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

Набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit для определения DIG-меченых целевых участков нуклеиновых кислот при помощи красного хромогена методом гибридизации in situ (ISH) для диагностики in vitro на иммуноштейнерах автоматических серии BenchMark

производитель

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

АДРЕС МЕСТА ПРОИЗВОДСТВА МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

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

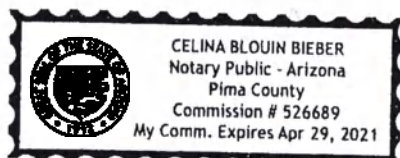
State of Arizona, County of PIMA
this 13th day of January, 2021, before me
personally appeared Kathy Kim
whose identity was proved to me on the basis of satisfactory
evidence to be the person whose name is subscribed to this
document, and who acknowledged that he/she signed the
same/attached document.
Celina B. Bieber
Notary Public

Approved by Ventana Medical Systems, Inc.

[Signature]
Kathy Kim
Regulatory Affairs Specialist

13 Jan 2021
Date

Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E Innovation Park Dr
Tucson, AZ 85755
(520)887-2155



2021

VENTANA Red ISH DIG Detection Kit

REF 760-512

08318832001

IVD Σ 60

НАЗНАЧЕНИЕ

VENTANA Red ISH DIG Detection Kit представляет собой систему непрямого обнаружения DIG-меченых целевых участков. Набор предназначен для определения целевых участков нуклеиновых кислот при помощи красного хромогена методом гибридизации *in situ* (ISH) в срезах зафиксированных формалином и залитых парафином тканей, окрашиваемых на приборах BenchMark IHC/ISH. Результаты должны интерпретироваться квалифицированным специалистом с учетом данных гистологического исследования, соответствующих клинических данных и сравнения с контрольными образцами.

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

В методике гибридизации *in situ* (ISH) для обнаружения целевых участков ДНК или РНК в зафиксированных срезах тканей используются меченые зонды. Целевые последовательности выделяются нагреванием образца ткани и раствора с зондом с целью денатурации нуклеиновых кислот. Затем результат реакции охлаждают, что дает возможность меченому нуклеиновой кислотой зонду вступить в реакцию гибридизации с комплементарной последовательностью нуклеиновых кислот в ткани.

Гибридизация зонда с последовательностью нуклеиновых кислот визуализируется методом непрямого обнаружения. Большинство обычных техник непрямого обнаружения основано на использовании вторичного антитела, направленного против гаптена первичного антитела, а также связанного фермента в сочетании с соответствующей системой хромогена-субстрата. В результате обработки препарата такой комбинацией реагентов в месте специфического связывания зонда образуется цветной осадок. В наборе VENTANA Red ISH DIG Detection Kit для визуализации комплементарных последовательностей нуклеиновых кислот используется не прямой метод, основанный на осаждении окрашенного в красный цвет осадка.

ПРИНЦИП ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

VENTANA Red ISH DIG Detection Kit обнаруживает DIG-меченые зонды (дигоксингенин), связанные с определенной последовательностью в залитых в парафин срезах тканей. В набор для обнаружения входят следующие дозаторы: anti-DIG первичное мышиное антитело, меченое нитропиразолом (NP), anti-NP вторичное мышиное антитело, конъюгированное с щелочной фосфатазой (AP), pH Enhancer, Naphthol и Fast Red. После обнаружения сигнала SISH предметное стекло инкубируется с NP-меченым anti-DIG первичным мышиным антителом, которые связываются с гаптенем DIG на зонде. Первичное антитело против гаптена обнаруживается с помощью anti-NP вторичного меченого мышиного антитела, конъюгированного щелочной фосфатазой AP. Предметное стекло инкубируется с раствором pH Enhancer, который обеспечивает необходимый состав и концентрацию солей, а также буферный pH для оптимальной активности фермента AP. Затем добавляют нафтол-фосфат, который служит в качестве субстрата для фермента AP (AP обеспечивает дефосфорилирование нафтола). Fast Red, который вносят следующим на предметное стекло, соединяется с дефосфорилированным нафтолом и образует красный осадок, который легко визуализируется с помощью световой микроскопии. Схема протекания реакции DIG Red ISH показана на рисунке 1. Затем образец окрашивается контрастным красителем Hematoxylin II и исследуется под световым микроскопом.

Специфичный зонд определяется гаптен-специфичным антителом, а затем фермент-меченым вторичным антителом. Комплекс затем визуализируют с использованием нафтол субстрата и хромогена Fast Red, образующими красный осадок, который легко обнаружить при помощи световой микроскопии.

Протокол окрашивания состоит из нескольких этапов, на которых реагенты инкубируются в течение предварительно установленного времени и при предварительно заданной температуре. После завершения каждого этапа инкубации приборов BenchMark IHC/ISH промывают срезы, чтобы удалить несвязанный

материал, и наносит жидкое покрывное стекло, минимизирующее испарение со стекла водных реагентов. Результаты интерпретируются при помощи световой микроскопии и используются для дифференциальной диагностики патофизиологических процессов, связанных или не связанных с положительным окрашиванием зонда.

Более подробную информацию о работе прибора для окрашивания препаратов см. в руководстве пользователя. На рис. 1 поясняется метод непрямого обнаружения.

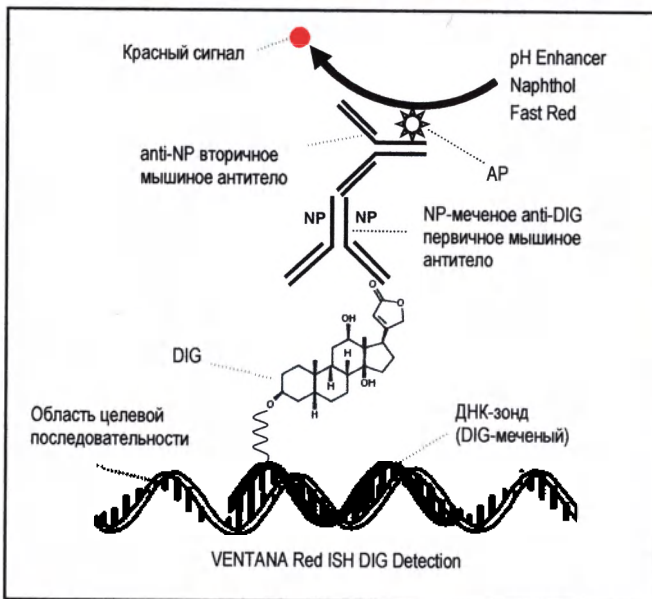


Рис. 1. VENTANA Red ISH DIG Reaction.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Реагенты, входящие в комплект поставки

VENTANA Red ISH DIG Detection Kit содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 60 тестов.

Один дозатор 6 мл	Реагент VENTANA Red ISH DIG NP содержит меченое гаптенем anti-DIG антитело (~7,5 мкг/мл) в протеин-фосфатном буфере с добавлением ProClin в качестве консерванта.
Один дозатор 6 мл	Реагент VENTANA Red ISH DIG NP AP содержит anti-NP антитело, конъюгированное с щелочной фосфатазой (AP) (~10 мкг/мл) в протеин-фосфатном буфере с добавлением ProClin в качестве консерванта.
Один дозатор 12 мл	Реагент VENTANA Red ISH DIG pH Enhancer содержит < 3 % MgCl ₂ в трис-буфере.
Один дозатор 6 мл	Реагент VENTANA Red ISH DIG Naphthol содержит < 8 г/л нафтола в трис-буфере.
Один дозатор 12 мл	Реагент VENTANA Red ISH DIG Fast Red Chromogen содержит < 3 г/л соли Fast Red KL в буферном растворе ацетата.

Восстановление, смешивание, разбавление и титрование

Набор для обнаружения оптимизирован для использования с приборами BenchMark IHC/ISH. Восстановление, смешивание, разбавление и титрование входящих в набор реагентов не требуется.

Дальнейшее разведение может привести к потере окрашивания. Пользователь должен провести валидацию любых таких изменений.

Необходимые, но не входящие в комплект материалы и реагенты

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

Для окрашивания могут потребоваться следующие реагенты и материалы, не поставляемые с данным набором для обнаружения.

1. Зонд ISH
2. ISH Protease 3 (№ по каталогу 780-4149 / 05273331001).
3. Hematoxylin II (№ по каталогу 790-2208 / 05277965001).
4. Bluing Reagent (№ по каталогу 760-2037 / 05266769001).
5. Reaction Buffer Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-300 / 05353955001).
6. SSC (10X) (№ по каталогу 950-110 / 05353947001).
7. EZ Prep Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-102 / 05279771001).
8. ultraView Silver Wash II (Pre-dilute) (№ по каталогу 780-003 / 05446724001).
9. Основные реагенты для приборов BenchMark GX и XT:
 - Cell Conditioning Solution 1 (CC1) (Pre-dilute) (№ по каталогу 950-124 / 05279801001).
 - Cell Conditioning Solution 2 (CC2) (Pre-dilute) (№ по каталогу 950-123 / 05279798001).
 - Liquid Coverslip (LCS) (Pre-dilute) (№ по каталогу 650-010 / 05264839001).
10. Основные реагенты для прибора BenchMark ULTRA:
 - ULTRA CC1 (Pre-dilute) (№ по каталогу 950-224 / 05424569001).
 - ULTRA CC2 (Pre-dilute) (№ по каталогу 950-223 / 05424542001).
 - ULTRA LCS (Pre-dilute) (№ по каталогу 650-210 / 05424534001).
11. Приборы BenchMark IHC/ISH
12. Этикетки со штрихкодами
13. Предметные стекла для микроскопа Superfrost Plus (с положительным зарядом).
14. Ксилол (гистологической степени очистки).
15. Деионизированная или дистиллированная вода
16. Постоянная заливочная среда
17. Покровное стекло для помещения образцов ткани под стекло
18. Автоматическое приспособление для накрывания предметных стекол покровным стеклом (например, Tissue-Tek SCA automated coverslipper)
19. Емкости или ванночки для окрашивания
20. Сушильный шкаф, способный поддерживать температуру 60 °C
21. Таймер
22. Световой микроскоп с объективами 20×, 40× и/или 60×
23. Мягкое моющее средство

Хранение и использование

После получения препарата и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживать. Данный набор для обнаружения может использоваться сразу после извлечения из холодильника.

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

На каждом наборе для обнаружения указана дата окончания срока годности. При условии надлежащего хранения реагенты сохраняют свои свойства до даты, указанной на упаковке. Не используйте продукт после даты истечения срока годности. Не имеется определенных критериев, свидетельствующих о нестабильности данного продукта. Таким образом, одновременно с исследованием неизвестного образца следует провести определение на положительном и отрицательном контролях. Случаи неожиданных результатов следует немедленно доводить до сведения регионального представителя службы поддержки.

Отбор образцов и подготовка к анализу

Фиксированные формалином и залитые в парафин ткани можно применять с VENTANA Red ISH DIG Detection Kit и приборами BenchMark IHC/ISH (см. раздел Необходимые, но не входящие в комплект материалы и реагенты). В качестве фиксатора ткани рекомендуется использовать 10%-й раствор нейтрального забуференного формалина¹ в течение от 6 до 72 часов. Различия в результатах

могут обуславливаться различиями в толщине срезов, типах фиксации, недостаточной или чрезмерной фиксацией или некоторыми процессами, например декальцификацией препаратов костного мозга. Различия в обработке тканей и в преаналитических условиях, а также в лабораторных процедурах могут приводить к статистически значимым различиям результатов и требуют регулярного использования контролей. Для получения дополнительной информации о контролях см. раздел Процедуры контроля качества.

Каждый срез должен иметь приемлемую для зондирования толщину (4 мкм) и должен быть помещен на положительно заряженное предметное стекло. Чтобы удалить избыток воды между стеклом и тканью, предметные стекла должны быть высушены.

Для срезов, толщина которых превышает 4 мкм, может потребоваться обработка протеазой интенсивнее рекомендованной. Ввиду избытка парафина в ткани может отмечаться большее количество пузырьков в ядрах, чем в более тонких срезах. Пузырьки в ядрах могут иметь большие и малые размеры. Также возможно наличие вакуолей. Как правило, этот артефакт подсчету сигналов не препятствует. Однако в сложных случаях пузырьки могут деформировать ядра или искажать сигналы Red ISH, делая подсчет невозможным. До выполнения повторного окрашивания на приборе может потребоваться депарафинизировать такие образцы в спиртовых и ксилоловых ванночках (см. раздел «Поиск и устранение неисправностей»). Ядерные пузыри могут проявляться вследствие недостаточной фиксации (1–3 часа в формалине): ядра при этом обычно выглядят менее дискретными. Для тканей, проходивших фиксацию в течение 3 часов, проблему можно решить изменением кондиционирования клеток или обработкой протеазой, в то время как для тканей, проходивших фиксацию в течение 1 часа, решения, по всей видимости, не существует.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики *in vitro* (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. **ВНИМАНИЕ!** Федеральное законодательство США разрешает продажу этой продукции только медицинским работникам или по их заказу. (Rx Only)
4. В данном продукте в качестве консерванта используется раствор ProClin 300. Он относится к раздражающим средствам и при контакте с кожей может стать причиной раздражения. При работе с реагентом соблюдайте меры предосторожности. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. Используйте защитную одежду и перчатки.
5. Материалы животного или человеческого происхождения должны рассматриваться как потенциально биологически опасные и утилизироваться с соблюдением надлежащих мер предосторожности.
6. Соблюдайте разумные меры предосторожности при обращении с реагентами. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. При обращении с предполагаемыми канцерогенами или токсичными материалами используйте одноразовые перчатки и защитную одежду.
7. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды. Избегайте вдыхания реагентов.
8. Перед началом сеанса убедитесь, что контейнер для отходов пуст. В противном случае контейнер для отходов может переполниться, что приведет к риску для пользователя поскользнуться и упасть.
9. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, т.к. это может стать причиной неверных результатов.
10. Относительно рекомендованного способа утилизации проконсультируйтесь с местными или государственными органами власти.
11. Маркировка безопасности продукции в первую очередь соответствует директивам ЕС по СГС. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте www.ventana.com.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

VENTANA Red ISH DIG Detection Kit предназначен для использования с приборами BenchMark IHC/ISH в сочетании с дополнительными реагентами VENTANA. Протокол окрашивания можно выводить на дисплей, распечатывать и редактировать в соответствии с процедурой, приведенной в руководстве пользователя прибором. Другие рабочие параметры прибора установлены на заводе-изготовителе.

Процедуры окрашивания при помощи приборов BenchMark IHC/ISH приведены ниже. Подробные инструкции и дополнительные опции протокола см. в листке-

вкладыше, прилагаемое к соответствующему зонду, или в руководстве пользователя вашим прибором.

Приборы BenchMark IHC/ISH

1. Нанесите на предметное стекло этикетку со штрих-кодом в соответствии с выполняемым протоколом.
2. Загрузите дозаторы зонда, соответствующие флаконы-дозаторы набора для обнаружения и необходимые дозаторы вспомогательных реагентов в лоток для реагентов и поместите лоток в прибор.
3. Проверьте заполненность канистр с жидкостями и пустого контейнера для отходов.
4. Канистры с раствором реакционного буфера должны быть заполнены.
5. Контейнер для отходов должен быть пустым до начала работы.
6. Поместите стекла в прибор.
7. Начните цикл окрашивания.
8. По завершении процесса извлеките предметные стекла из прибора. На окрашенных предметных стеклах будут наблюдаться остатки буфера и раствора жидкого покровного стекла. Выполните промывку и сушки (см. ниже).

Рекомендуемые процедуры после обработки

Примечание. Хромоген Fast Red растворим в этиловом спирте и ацетоне. Если окрашенные срезы подвергаются воздействию спирта или ацетона, это может привести к исчезновению специфического сигнала.

1. Для удаления раствора жидкого покровного стекла промойте микропрепараты в 2 последовательных растворах мягкого моющего средства (не используйте средства, предназначенные для автоматических моек).
2. Хорошо ополосните стекла дистиллированной водой примерно в течение 1 минуты. Стряхните излишки воды.
3. Поместите микропрепараты в сушилку (45–60 °C) или высушите их на воздухе при комнатной температуре. Сушка в печи может занять от 10 минут до одного часа (сушка окрашенных предметных стекол в течение более длительного периода времени не влияет на результаты окрашивания). Перед нанесением покровных стекол необходимо убедиться, что предметные стекла совершенно сухие, так как остатки воды на предметных стеклах могут помешать процессу нанесения покровных стекол и привести к образованию пузырьков.
4. Приблизительно на 30 секунд поместите их в ванночку с ксилолом.
5. Поместите заливочную среду на предметное стекло.
6. Поместите покровное стекло на предметное стекло.

Процедуры контроля качества

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. Компоненты положительного окрашивания тканей используются для подтверждения того, что реагенты были 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. Внутренние тканевые контроли используются по усмотрению эксперта. В качестве контрольных следует использовать препараты, полученные в ходе вскрытия, биопсии или хирургических операций. Образцы тканей должны быть подготовлены или зафиксированы в соответствии с той же процедурой, что и предназначенные для исследования срезы. Использование срезов тканей, обработанных по процедуре, отличной от примененной для исследуемого образца, позволяет осуществлять сравнительный контроль для всех реагентов и этапов метода, связанных с фиксацией или обработкой 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 тестового образца следует считать недействительными.

Рекомендации по выбору тканей для положительного контроля вы найдете в листке-вкладыше.

Отрицательный тканевый контроль

Рекомендации приведены в листке-вкладыше.

Реагент положительного контроля

Рекомендации приведены в листке-вкладыше.

Необъяснимые расхождения

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

Верификация анализа

Перед первым использованием зонда или системы для окрашивания в диагностической процедуре, специфичность зонда должна быть верифицирована испытанием на серии образцов с установленными характеристиками эффективности ISH (см. прилагаемый к зонду вкладыш и рекомендации по контролю качества College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist² или CLSI Approved Guideline³, или оба документа). Процедуры контроля качества следует повторять для каждой новой серии реагента и при каждом изменении параметров исследования.

Интерпретация результатов

Применение VENTANA Red ISH DIG Detection Kit приводит к получению красного продукта реакции, который осаждается на последовательности нуклеиновой кислоты, гибридизированной зондом. Перед интерпретацией результатов контроля и качество окрашенного продукта должны оцениваться экспертом, имеющим опыт процедур ISH. В первую очередь следует оценить окрашивание отрицательных контролей. Полученные результаты должны быть сопоставлены с характеристиками окрашенного материала чтобы убедиться в том, что полученный сигнал не является результатом неспецифических взаимодействий. См. раздел «Интерпретация результатов» в листке-вкладыше, прилагаемом к соответствующему зонду.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Общие ограничения

1. Гибридизация in situ (ISH) — это многоступенчатый процесс, который требует профессиональных знаний по выбору необходимых реагентов, подготовке препарата, его обработке, подготовке предметного стекла и интерпретации результатов.
2. На результаты окрашивания ткани влияет обращение с тканью и подготовка ее к окрашиванию. Ненадлежащее выполнение фиксации, замораживания, оттаивания, сушки, нагрева или микротомирования, а также загрязнение образца другими тканями и жидкостями могут привести к появлению артефактов, накоплению реагентов или получению ложноотрицательных результатов. Несогласующиеся результаты могут быть получены вследствие несоблюдения режимов процессов фиксации и заливки или присущей исследуемой ткани неоднородности.
3. Избыточное или неполное контрастное окрашивание может негативно повлиять на правильность интерпретации результатов.
4. Для предотвращения сигнала Red ISH от распада окрашенные препараты не должны погружаться в ванночки со спиртом или ацетоном для сушки. Рекомендуется сушка на воздухе или сушка в печи. Прежде чем наносить покровное стекло, убедитесь, что окрашенные предметные стекла полностью высушены.
5. Клиническая интерпретация любого положительного окрашивания, либо его отсутствия, должна проводиться с учетом истории болезни, морфологических данных и других гистопатологических критериев. Такая интерпретация должна проводиться квалифицированным специалистом-патологоанатомом, который обязан быть знаком с характеристиками используемого красителя и методикой, использованной для приготовления данного окрашенного среза. Окрашивание должно проводиться в сертифицированной и лицензированной лаборатории под наблюдением квалифицированного патоморфолога, который несет ответственность за просмотр окрашенных препаратов и обеспечение достоверности контролей.

6. Компания Ventana Medical Systems, Inc. ("Ventana") предоставляет реагенты в оптимальном разведении для проведения анализа при соблюдении инструкций. Дальнейшее разведение реагентов может привести к ненадлежащему качеству окрашивания. Пользователь должен самостоятельно провести валидацию подобных действий с реагентом. Любое отклонение от рекомендованных процедур проведения теста может привести к тому, что ожидаемые результаты будут недостоверны. Необходимо использовать надлежащие контрольные образцы и документировать их использование. Пользователи, которые отклоняются от рекомендованных процедур проведения теста, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.
7. При использовании реагентов с тканями, которые ранее не тестировались, могут возникать неожиданные реакции. В связи с биологической вариабельностью тканей, полностью исключить возможность непредусмотренной реактивности нельзя даже для тех тканей, на которых данные реагенты уже тестировались. Документированные случаи неожиданных реакций следует доводить до сведения регионального представителя службы поддержки.

Специфические ограничения

1. Компания рекомендует готовить тканевый срез толщиной ~4 мкм. На участках толщиной более 4 мкм могут наблюдаться потери тканей.
2. Подробные сведения касательно оптимизированной процедуры окрашивания см. в соответствующем листке-вкладыше для зонда.
3. Как и в любом тесте, отрицательный результат означает, что специфичная целевая последовательность не обнаружена. Это не равнозначно отсутствию специфичной целевой последовательности в анализируемых клетках или ткани.
4. Этот набор для обнаружения был оптимизирован для использования с реагентами VENTANA на приборах BenchMark IHC/ISH. Пользователи, допускающие отклонения от рекомендуемых методик проведения исследования, несут ответственность за интерпретацию результатов, полученных на образцах ткани пациента.
5. Наборы для обнаружения могут регистрироваться не на каждом приборе. Для получения дополнительной информации обратитесь к местному представителю компании Roche.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Подробную информацию о рабочих характеристиках см. в соответствующем листке-вкладыше в упаковке зонда.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

1. См. раздел "Поиск и устранение неисправностей" в листке-вкладыше, прилагаемом к соответствующему зонду.
2. Если парафин будет удален не полностью, это может привести к появлению артефактов при окрашивании или к отсутствию окрашивания.
3. Если срезы ткани смываются с предметного стекла, необходимо убедиться, что стекла положительно заряжены. См. раздел Отбор образцов и подготовка к анализу.
4. При потере специфичного сигнала проверьте, не подвергалось ли предметное стекло воздействию спирта и (или) ацетона. Хромоген Fast Red растворим в этиловом спирте и ацетоне.
5. Способы устранения проблем см. в разделе Инструкция по применению руководства пользователя прибора. Соответствующую информацию также можно получить у представителя службы поддержки в вашем регионе.
6. Если из дозатора реагента жидкость не поступает в нужном количестве, проверьте заливочную камеру и лунку на наличие частиц, например волокон или осадка. Если подача жидкости дозатором не осуществляется, не используйте дозатор и обратитесь к региональному представителю службы поддержки. Также можно повторно заправить дозатор. Его следует направить в контейнер для отходов, снять колпачок наконечника и нажать на верхнюю часть дозатора. Подробные сведения см. в листке-вкладыше, прилагаемом к соответствующему дозатору (17377).

ССЫЛКИ

1. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. 2nd Edition. St. Louis, MO: The C.V. Mosby Company; 1980.

2. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2007.
3. CLSI (formerly NCCLS). Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunocytochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.

ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

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

© 2019 Ventana Medical Systems, Inc.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ



Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755
USA

+1 520 887 2155
+1 800 227 2155 (USA)

www.ventana.com



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany

Полное наименование изделия на русском языке

Набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit для определения DIG-меченых целевых участков нуклеиновых кислот при помощи красного хромогена методом гибридизации in situ (ISH) для диагностики in vitro на иммуноштейнерах автоматических серии BenchMark (далее по тексту может использоваться набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit, VENTANA Red ISH DIG Detection Kit, набор для обнаружения, реагент, набор реагентов, набор)

Назначение для обращения на территории Российской Федерации

VENTANA Red ISH DIG Detection Kit представляет собой систему непрямого обнаружения DIG-меченых целевых участков. Набор предназначен для определения целевых участков нуклеиновых кислот при помощи красного хромогена методом гибридизации in situ (ISH) в срезах зафиксированных формалином и залитых парафином тканей, окрашиваемых на иммуноштейнерах автоматических серии BenchMark IHC/ISH.

VENTANA Red ISH DIG Detection Kit предназначен для совместного применения с коктейлем зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail для обнаружения зонда HER2 и хромосомы 17 после окрашивания на аппаратах серии BenchMark IHC/ISH с помощью двухцветной хромогенной in situ-гибридизации в фиксированных в формалине и залитых в парафин гистологических образцах рака молочной железы и желудка, включая гастрозофагеальный переход.

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

Этот продукт предназначен для диагностики in vitro (IVD).

Область применения

Для профессионального использования медицинским персоналом клинко-диагностических лабораторий. в качестве вспомогательного средства для диагностики in vitro (IVD).

Состав (дополнение)

VENTANA Red ISH DIG Detection Kit содержит следующие материалы животного происхождения:

1Название материала - Козий глобулин для мультимера

Характер - Потенциальный возбудитель инфекции*

Тип - Сыворотка

Источник - Козел

2Название материала - Казеин

Характер - Потенциальный возбудитель инфекции*

Тип - Очищенный порошок

Источник - Коровье молоко

3Название материала - Бычий сывороточный альбумин, фракция V

Характер - Потенциальный возбудитель инфекции*

Тип - Сыворотка

Источник - Бык

4Название материала - Нормальная козья сыворотка

Характер - Потенциальный возбудитель инфекции*

Тип - Сыворотка

Источник - Козел

5Название материала - Конъюгат антител мыши anti-NP с щелочной фосфатазой

Характер - Потенциальный возбудитель инфекции*

Тип - Антитело

Источник - Мышь

6Название материала - Конъюгат DIG с нитропиразолом для окрашивания RISH

Характер - Потенциальный возбудитель инфекции*

Тип - Антитело

Источник - Мышь

* 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. Материалы рекомбинантного происхождения получены из генетически модифицированных организмов. Риск передачи патогенных возбудителей этих материалов считается незначительным

Принцип метода определения (дополнение)

*ICH/ISH - метод иммуногистохимического (ИГХ) анализа или метод гибридизации in situ

Срок годности

VENTANA Red ISH DIG Detection Kit стабилен максимально 18 месяцев с даты производства. Дату производства см. на упаковке.

VENTANA Red ISH DIG Detection Kit следует хранить при 2-8°C. Не замораживать! Данный набор для обнаружения может использоваться сразу после извлечения из холодильника.

При вскрытых упаковках флакон-дозаторы с реагентами необходимо хранить в холодильнике в вертикальном положении до истечения срока годности, указанного на этикетке.

На каждом флаконе-дозаторе с реагентом указан срок годности. Не использовать набор для обнаружения после истечения срока годности.

Стабильность

До вскрытия упаковки дозаторы с реагентами набора для обнаружения можно хранить – максимально 18 месяцев с даты производства (дату производства см. на упаковке).

После вскрытия дозаторы с реагентами можно хранить при 2-8°C – максимально 18 месяцев с даты производства (дату производства см. на упаковке).

Стабильность установленных на прибор реагентов 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.

Предупреждения:



H317 Может вызывать аллергическую кожную реакцию

H316 При попадании на кожу вызывает слабое раздражение.

H319 При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение

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

P264 После работы тщательно вымыть кожу.

P280 Использовать средства защиты глаз/лица.

P305 + P351 + P338 ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА:

Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз.

P332 + P313 При возникновении раздражения кожи: обратиться за медицинской помощью.

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

P337+P313 Если раздражение глаз продолжается: обратиться к врачу.

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

P501 Удалить содержимое/контейнер в ...

Отбор образцов и подготовка к анализу (дополнение)

Процедура получения тканевых срезов идентична для разных видов ткани.

*ICH/ISH - метод иммуногистохимического (ИГХ) анализа или метод гибридизации in situ.

*Примечание – Под «препаратами» и «микропрепаратами» следует понимать «образец ткани».

Комплект поставки

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

V1.0

VENTANA Red ISH DIG Detection Kit поставляется в коробке из мелованной бумаги, в каждой коробке находится 5 пластиковых дозаторов с реагентами. Один набор рассчитан на проведение 60 анализов.

В комплект поставки входит:

Набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit для определения DIG-меченых целевых участков нуклеиновых кислот при помощи красного хромогена методом гибридизации in situ (ISH) для диагностики in vitro на иммуноштейнерах автоматических серии BenchMark.

Состав:

1. Реагент VENTANA Red ISH DIG NP в дозаторе, объем 6 мл, 1 шт.;
2. Реагент VENTANA Red ISH DIG NP AP в дозаторе, объем 6 мл, 1 шт.;
3. Реагент VENTANA Red ISH DIG pH ENHANCER в дозаторе, объем 12 мл, 1 шт.;
4. Реагент Нафтол (VENTANA RED ISH DIG NAPHTHOL) в дозаторе, объем 6 мл, 1 шт.;
5. Реагент Хромоген (VENTANA RED ISH DIG FAST RED CHROMOGEN) в дозаторе, объем 12 мл, 1 шт.

Показания к применению

VENTANA Red ISH DIG Detection Kit представляет собой систему непрямого обнаружения DIG-меченых целевых участков. Набор предназначен для определения целевых участков нуклеиновых кислот при помощи красного хромогена методом гибридизации in situ (ISH) в срезах зафиксированных формалином и залитых парафином тканей, окрашиваемых на иммуноштейнерах автоматических серии BenchMark IHC/ISH.

VENTANA Red ISH DIG Detection Kit предназначен для совместного применения с коктейлем зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail для обнаружения зонда HER2 и хромосомы 17 после окрашивания на аппаратах серии BenchMark IHC/ISH с помощью двухцветной хромогенной in situ-гибридизации в фиксированных в формалине и залитых в парафин гистологических образцах рака молочной железы и желудка, включая гастрорезофагеальный переход.

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

Этот продукт предназначен для 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.

Контроль качества (дополнение)

Положительный тканевый контроль

Рекомендации по выбору тканей для положительного контроля вы найдете в инструкции по применению соответствующего набора для определения (зонда).

Отрицательный тканевый контроль

Рекомендации по выбору тканей для отрицательного контроля вы найдете в инструкции по применению соответствующего набора для определения (зонда) - Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail.

Реагент положительного контроля

Рекомендации по выбору тканей для положительного контроля вы найдете в инструкции по применению соответствующего набора для определения (зонда) - Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail.

Верификация анализа

Перед первым использованием зонда или системы для окрашивания в диагностической процедуре специфичность зонда должна быть верифицирована испытанием на серии образцов с установленными характеристиками эффективности гибридизации in situ (см. прилагаемый к зонду листок-вкладыш и рекомендации по контролю качества College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, или CLSI Approved Guideline, или оба документа). Процедуры контроля качества следует повторять для каждой новой серии реагента и при каждом изменении параметров исследования. Рекомендации по контролю качества вы найдете в инструкции по применению соответствующего набора для определения (зонда).

Интерпретация окрашивания (дополнение)

Применение VENTANA Red ISH DIG Detection Kit приводит к получению красного продукта реакции, который осаждается на последовательности нуклеиновых кислот, гибридизированной зондом. Перед интерпретацией результатов контроля и качество окрашенного продукта должны оцениваться квалифицированным специалистом, имеющим опыт процедур ISH. В первую очередь следует оценить окрашивание отрицательных контролей. Полученные результаты должны быть сопоставлены с характеристиками окрашенного материала чтобы убедиться в том, что полученный сигнал не является результатом неспецифических взаимодействий. См. раздел «Интерпретация результатов» в инструкции по применению, прилагаемой к соответствующему зонду.

Набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit предназначен для использования совместно с Коктейлем зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и набором для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit на аппаратах серии BenchMark IHC/ISH.

Более подробно информацию по интерпретации окрашивания смотрите в инструкции по применению для коктейля зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail.

Фоновое окрашивание

Любое окрашивание фона, полученное с помощью системы детекции (набора для обнаружения) VENTANA Red ISH DIG Detection Kit (далее Red ISH), необходимо оценивать, чтобы определить, не мешает ли оно подсчету специфических сигналов Red ISH. Красное окрашивание может выглядеть как красная дымка или редко встречающиеся неспецифические сигналы, которые выглядят слабее, чем специфические сигналы.

Фоновое окрашивание является приемлемым, если оно не оказывает влияния на клиническую интерпретацию образца.

Для неспецифического фонового окрашивания — не менее чем у 90% окрашенных проб должны обнаруживаться приемлемые уровни неспецифического фонового окрашивания.

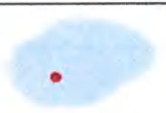
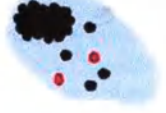
Рабочие области для подсчета сигналов. Приемлемая рабочая область в пределах инвазивной карциномы служит полем зрения для подсчета сигналов SISH и Red ISH. Подсчет сигналов не следует проводить в тех областях, где сигнал SISH или Red ISH ослаблен, ядра сплюснуты или растянуты или наблюдается некроз. Если одна рабочая область представляется непригодной для подсчета, часто на том же срезе можно найти другие рабочие области, вполне пригодные для этой цели. Об этом можно судить по присутствию здоровых клеток, демонстрирующих удовлетворительное окрашивание SISH и Red ISH в пределах или поблизости от рабочей области.

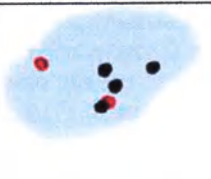
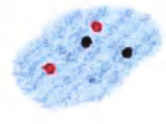
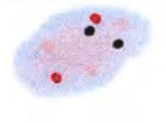
Визуализация сигнала:

Сигналы SISH и Red ISH визуализируются как:

1. Единичная копия. Дискретная черная точка (SISH) считается одной копией HER2. Дискретные единичные точки, которые проявляются в ядрах при внутреннем контроле (неопуховом), дают представление о размере отдельной копии гена в клетках инвазивных форм рака для SISH (черного) сигнала. Для сигналов Red ISH каждый дискретный сигнал считается как одна копия. Следует отметить, что красный ISH-сигнал от Chr17 может оказаться большего размера, чем сигналы SISH, а иногда быть удлинённым по форме. Может наблюдаться розовая размытость, которую не следует принимать за сигнал. Красные сигналы, очень светлые по цвету по сравнению с сигналом в ядрах внутреннего положительного контроля и в ядрах всей картины окрашивания, не должны подсчитываться, поскольку они могут быть неспецифическими. Специфические красные сигналы имеют прерывистые края, как показано в Таблице ниже.
2. Совокупности копий. Дискретные единичные SISH-сигналы, которые визуализируются в ядрах внутреннего положительного контроля, дают представление о размере единичной копии гена HER2 в клетках инвазивной карциномы. Размеры единичных сигналов SISH служат меркой для определения относительного числа амплифицированных копий в ядрах раковой клетки. Для сигналов Red ISH каждый дискретный сигнал считается как одна копия.
3. Кластеры. Наличие в ядрах совокупности перекрывающихся сигналов, подсчитать которые невозможно. Кластер определяется как многочисленные перекрывающиеся SISH-сигналы в ядрах, которые невозможно различить по отдельности. Кластеры HER2 могут быть оценены только специалистом. Например, крупный кластер нескольких SISH-сигналов может быть оценен как 12 копий, в то время как мелкие кластеры могут быть оценены как 6 копий. Расчет выполняется с помощью единичных SISH-копий, присутствующих во внутреннем положительном контроле клеток в качестве образца. Наличие HER2-кластеров указано в оценочном листе.
4. Перекрывающиеся ядра и ядра, в которых присутствует только один цвет, а также образцы с неспецифическим окрашиванием, не должны подсчитываться. Визуализация всех ядер с наложенными сигналами Red ISH и SISH, которые не являются различимыми, должна производиться при большем увеличении, чтобы различить два сигнала, либо их не следует учитывать вовсе. Ядра, которые кажутся пузырьками, не должны учитываться.

Визуализация сигнала при совместном применении с Коктейлем зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и набором для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit на аппаратах серии BenchMark IHC/ISH.

	Не считать, если наблюдается наложение ядер.
	Не считать, если сигнал отсутствует.
	Не считать, если присутствуют сигналы только одного цвета.
	Не считать, если сигналы расположены вне ядер.
	Считать как 1 черный (HER2) и 1 красный (Chr17) сигнал.
	Считать как 2 черных (HER2) и 2 красных (Chr17) сигнала.
	Считать как 1 черный (HER2) и 2 красных (Chr17) сигнала. Черный сигнал является «удвоенным». Считать два близко расположенных сигнала одного и того же цвета, только если расстояние между ними равно или больше диаметра единичного сигнала.
	Небольшие кластеры SISH могут быть оценены только с использованием в качестве эталона размера одиночного сигнала. Используйте стромальные клетки для оценки размера сигнала (меньшая клетка). Например, этот кластер может быть оценен как 6 сигналов SISH. Добавив 2 оставшихся единичных сигнала, получаем в сумме 8. Считать как 2 красных сигнала. Отметьте на оценочном листе, что присутствуют кластеры для HER2.
	Проведите оценку крупного кластера. В данном случае кластер может быть оценен как 12 черных сигналов. Добавляя 4 единичных сигнала, получаем в сумме 16. Считать красные сигналы как 2 копии хромосомы 17. Отметьте на оценочном листе, что присутствуют кластеры для HER2.

	Красный сигнал, расположенный близко к черному сигналу, должен быть учтен как один красный сигнал и один черный сигнал. Чтобы различить эти сигналы, может потребоваться подсчет с использованием объектива с увеличением в 60 раз. Поэтому произведите подсчет таким образом: 4 черных (HER2) и 2 красных (Chr17) сигнала. Если наложенные сигналы нельзя различить, не учитывайте эти ядра
	Кластер черных точек затемняет красный (-е) сигнал (-ы). Большее увеличение (x60) может использоваться при попытке подтвердить наличие или отсутствие красного сигнала (-ов); в противном случае не учитывайте эти сигналы: всегда учитывайте ядра с только четкими красными сигналами. Отметьте наличие SISH-кластеров в оценочном листе. В ядрах с SISH-кластерами должны засчитываться ядра с видимыми и более многочисленными красными сигналами.
	Если в ядрах возникает фоновая «пыль» SISH, учитывайте ее, только если специфические SISH-сигналы четко отличны от фона.
	Может наблюдаться розовая размытость, которая не должна быть по ошибке принята за сигнал. Могут быть видны небольшие, слабые Red ISH сигналы, которые могут представлять неспецифическое связывание зонда Chr17 с другими хромосомами. На изображении показаны 2 дискретных красных (Chr17) сигнала и 2 черных (HER2) сигнала.

Ограничения (дополнение)

Общие ограничения

1. Гибридизация in situ (ISH) — это многоступенчатая методика, которая требует профессиональных знаний по выбору необходимых реагентов, подготовке препарата, его обработке, подготовке предметного стекла и интерпретации результатов.
2. На результаты окрашивания ткани влияет обращение с тканью и подготовка ее к окрашиванию. Неправильное проведение процесса фиксации, замораживания, оттаивания, промывки, сушки, нагрева, микротомирования или загрязнение другими тканями или жидкостями могут привести к появлению артефактов, накоплению реагентов, или получению ложноотрицательных результатов. Несогласующиеся результаты могут быть получены вследствие несоблюдения режимов процессов фиксации и заливки или присущей исследуемой ткани неоднородности.
3. Избыточное или неполное контрастное окрашивание может негативно повлиять на правильность интерпретации результатов.
4. Для предотвращения сигнала Red ISH от распада окрашенные препараты не должны погружаться в ванночки со спиртом или ацетоном для сушки. Рекомендуется сушка на воздухе или сушка в печи. Прежде чем наносить покровное стекло, убедитесь, что окрашенные предметные стекла полностью высохнут.
5. Клиническая интерпретация любого положительного окрашивания, либо его отсутствия, должна проводиться с учетом истории болезни, морфологических данных и других гистопатологических критериев. Такая интерпретация должна проводиться квалифицированным специалистом, который обязан быть знаком с характеристиками используемого красителя и методикой, использованной для приготовления данного окрашенного среза. Окрашивание должно проводиться в сертифицированной и лицензированной лаборатории под наблюдением квалифицированного специалиста, который несет ответственность за просмотр окрашенных препаратов и обеспечение достоверности контролей.
6. Компания Ventana Medical Systems, Inc. ("Ventana") поставляет реагенты в оптимальном разведении для проведения анализа при соблюдении инструкций. Дальнейшее разведение реагентов может привести к ненадлежащему качеству окрашивания. Пользователь должен самостоятельно провести валидацию подобных действий с реагентом. Любое отклонение от рекомендованных процедур проведения теста может привести к тому, что ожидаемые результаты будут недостоверны. Необходимо использовать надлежащие контрольные образцы и документировать их использование. Пользователи, которые отклоняются от рекомендованных процедур проведения теста, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

7. При использовании реагентов с тканями, которые ранее не тестировались, могут возникать неожиданные реакции. В связи с биологической вариабельностью тканей, полностью исключить возможность непредусмотренной реактивности нельзя даже для тех тканей, на которых данные реагенты уже тестировались. Документированные случаи неожиданных реакций следует доводить до сведения регионального представителя службы поддержки.

Упаковка

Набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit поставляется в коробке из мелованной бумаги, в каждой коробке находится 5 пластиковых дозаторов с реагентами. Один набор рассчитан на проведение 60 анализов.

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

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

Первичная упаковка - дозатор.

Реагент VENTANA Red ISH DIG NP – упакован в пластиковый дозатор коричневого цвета, объем реагента в дозаторе 6 мл.

Реагент VENTANA Red ISH DIG NP AP – упакован в пластиковый дозатор коричневого цвета, объем реагента в дозаторе 6 мл.

Реагент VENTANA Red ISH DIG pH ENHANCER – упакован в пластиковый дозатор белого цвета, объем реагента в дозаторе 12 мл.

Реагент Нафтол (VENTANA RED ISH DIG NAPHTHOL) – упакован в пластиковый дозатор коричневого цвета, объем реагента в дозаторе 6 мл.

Реагент Хромоген (VENTANA RED ISH DIG FAST RED CHROMOGEN) – упакован в пластиковый дозатор коричневого цвета, объем реагента в дозаторе 12 мл.

Размеры всех дозаторов идентичные и составляют:

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 (260 x 67 x 145) мм, магнитная «кнопка памяти» (диаметр не более 17 мм).

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

Маркировка

Производитель использует следующие символы и знаки:

Символ	Определение	Символ	Определение
	Смотрите инструкцию по применению		Для диагностики in vitro
	Каталожный номер		Код партии
	Производитель		Использовать до (срок годности)
	СЕ-маркировка		Опасность для здоровья
	Содержит достаточно для п-анализов		Пригоден для вторичной переработки
	Температурные ограничения		Не использовать повторно
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе		QR-код
	Предупреждения		Глобальный номер предмета торговли
	Дата изготовления		

Маркировка дозатора Реагент VENTANA Red ISH DIG NP

Логотип производителя
 Наименование изделия
 Объем реагента в дозаторе (концентрация специфических антител)
 Каталожный номер
 Код партии
 Срок годности (использовать до)
 Знак «Не использовать повторно»
 Температурные ограничения
 Штрих-код
 СЕ-маркировка
 Предупреждение для диагностики in vitro
 Знак «Опасность для здоровья»
 Смотрите инструкцию по применению
 Название и адрес производителя

Маркировка дозатора Реагент VENTANA Red ISH DIG NP AP

Логотип производителя
 Наименование изделия
 Объем реагента в дозаторе (концентрация специфических антител)
 Каталожный номер
 Код партии
 Срок годности (использовать до)
 Знак «Не использовать повторно»
 Температурные ограничения
 Штрих-код
 СЕ-маркировка
 Предупреждение для диагностики in vitro
 Знак «Опасность для здоровья»
 Смотрите инструкцию по применению
 Название и адрес производителя

Маркировка дозатора Реагент VENTANA Red ISH DIG pH ENHANCER

Логотип производителя
Наименование изделия
Объем реагента в дозаторе (концентрация специфических антител)
Каталожный номер
Код партии
Срок годности (использовать до)
Знак «Не использовать повторно»
Температурные ограничения
Штрих-код
СЕ-маркировка
Предупреждение для диагностики in vitro
Знак «Опасность для здоровья»
Смотрите инструкцию по применению
Название и адрес производителя

Маркировка дозатора Реагент Нафтол (VENTANA RED ISH DIG NAPHTHOL)

Логотип производителя
Наименование изделия
Объем реагента в дозаторе (концентрация специфических антител)
Каталожный номер
Код партии
Срок годности (использовать до)
Знак «Не использовать повторно»
Температурные ограничения
Штрих-код
СЕ-маркировка
Предупреждение для диагностики in vitro
Знак «Опасность для здоровья»
Смотрите инструкцию по применению
Название и адрес производителя

Маркировка дозатора Реагент Хромоген (VENTANA RED ISH DIG FAST RED CHROMOGEN)

Логотип производителя
Наименование изделия
Объем реагента в дозаторе (концентрация специфических антител)
Каталожный номер
Код партии
Срок годности (использовать до)
Знак «Не использовать повторно»
Температурные ограничения
Штрих-код
СЕ-маркировка
Предупреждение для диагностики in vitro
Знак «Опасность для здоровья»
Смотрите инструкцию по применению
Название и адрес производителя

Маркировка картонной упаковки

Логотип производителя
Наименование изделия

VENTANA Red ISH DIG Detection Kit

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

V1.0

Содержимое набора
Каталожный номер по реестру компании «Ventana Medical Systems Inc.»
Код партии
Дата производства
Срок годности
Количество тестов, которые можно сделать
Температура хранения
Предупреждение для диагностики in vitro
СЕ-маркировка
Штрих-код
Производственный код
Каталожный номер по реестру компании «Roche Diagnostics GmbH»
Глобальный номер предмета торговли
Предупреждение - не использовать повторно
Полное название, адрес, телефон производителя
Ссылка на электронную инструкцию на русском языке
Название и адрес Уполномоченного представителя в Европейском сообществе
Страна происхождения
Обозначение, что пригодно для вторичной переработки
Знак «Предостережение, обращайтесь к инструкции по применению»
Знак «Предупреждения»
Знак «Опасность для здоровья»

Предупреждения:



H317 Может вызывать аллергическую кожную реакцию
H319 При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение
P261 Избегать вдыхания пыли/дыма/газа/ тумана/паров/распылителей жидкости.
P280 Надевайте защитные перчатки.
P333+P313 При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.
P337+P313 Если раздражение глаз продолжается: обратиться к врачу.
P362+P364 Снять загрязненную одежду и промыть ее перед повторным использованием.
P501 Удалить содержимое/контейнер в ...

Маркировка на русском языке

Набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit для определения DIG-меченых целевых участков нуклеиновых кислот при помощи красного хромогена методом гибридизации in situ (ISH) для диагностики in vitro на иммуноштейнерах автоматических серии BenchMark

Состав:

1. Реагент VENTANA Red ISH DIG NP в дозаторе, объем 6 мл, 1 шт.;
2. Реагент VENTANA Red ISH DIG NP AP в дозаторе, объем 6 мл, 1 шт.;
3. Реагент VENTANA Red ISH DIG pH ENHANCER в дозаторе, объем 12 мл, 1 шт.;
4. Реагент Нафтол (VENTANA RED ISH DIG NAPHTHOL) в дозаторе, объем 6 мл, 1 шт.;
5. Реагент Хромоген (VENTANA RED ISH DIG FAST RED CHROMOGEN) в дозаторе, объем 12 мл, 1 шт.

Регистрационное удостоверение № _____ от _____

Срок годности см. на упаковке. Дату производства см. на упаковке.

Температура хранения см. на упаковке. Номер лота см. на упаковке

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

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 08318832001 (760-512)

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 «Ventana Medical Systems, Inc.» 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 Набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit для определения DIG-меченых целевых участков нуклеиновых кислот при помощи красного хромогена методом гибридизации in situ (ISH) для диагностики in vitro на иммуноштейнерах автоматических серии BenchMark 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 «Ventana Medical Systems, Inc.» разработана с целью сведения к минимуму загрязнения окружающей среды при сохранении целостности продукта во время транспортировки и хранения. Упаковочные отходы должны утилизироваться в местных пунктах сбора упаковки, в специализированные контейнеры, расположенные в муниципалитетах.

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

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

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

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

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

Не утилизировать совместно с бытовыми отходами

Гарантийные обязательства

Производитель (компания «Ventana Medical Systems, Inc.») гарантирует, что Набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit для определения DIG-меченых целевых участков нуклеиновых кислот при помощи красного хромогена методом гибридизации in situ (ISH) для диагностики in vitro на иммуноштейнерах автоматических серии BenchMark соответствуют

VENTANA Red ISH DIG Detection Kit

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

V1.0

спецификациям, заявленным на этикетке. Производитель несет ответственность за работу изделий только в случае их правильного использования в соответствии с инструкцией, а также соблюдения правил хранения и транспортировки.

Производитель гарантирует стабильность VENTANA Red ISH DIG Detection Kit до окончания срока годности при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, указанных в инструкции.

Производитель гарантирует безопасность медицинского изделия, отсутствие недопустимого риска причинения вреда жизни, здоровью человека и окружающей среде при использовании VENTANA Red ISH DIG Detection Kit 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 Ventana Medical Systems, Inc. («Вентана Медикал Системс, Инк.») 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 приема 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:

VENTANA Red ISH DIG Detection Kit предназначен для использования со следующими иммуноштейнерами автоматическими серии VENTANA BenchMark:

- BenchMark GX (Иммуноштейнер автоматический BenchMark GX с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011-06976 от 27.01.2017 г.))

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

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

1) Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail - Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail для определения статуса гена HER2 методом гибридизации in situ (ISH) для диагностики in vitro на иммуноштейнерах автоматических серии BenchMark

2) Набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit - Набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit для определения DNP-меченых целевых участков ДНК методом серебряной гибридизации in situ (ISH) для диагностики in vitro на иммуноштейнерах автоматических серии BenchMark.

3) ISH Protease 3 (Фермент протеаза 3 для гибридизации in situ (ионц. ~0.02 CU/ml) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.))

4) Hematoxylin II (Гистологический краситель Гематоксилин II ≤ 60%) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)

5) Bluing Reagent (Реагент для придания окраске синего цвета) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)

6) Reaction Buffer Concentrate (10X) (Реакционный буфер (концентрат – 10X)) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)

7) SSC Concentrate (10X) (Промывочный цитратный буфер, концентрированный) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)

- 8) EZ Prep Concentrate (10X) (Раствор для проведения депарафинизации, концентрированный) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)
- 9) ultraVIEW Silver Wash II (Pre-dilute) (Промывочный буфер для гибридизации in situ, разведенный) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)
- 10) CC1 (Pre-dilute) (TRIS/Борат/ЭДТА буфер (CC1) для демаскировки антигена, разведенный) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)
- 11) CC2 Pre-dilute (Цитратный буфер для демаскировки антигена, разведенный) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)
- 12) LCS (Pre-dilute) (Жидкое покрывное стекло высокотемпературное, разведенное) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)
- 13) ULTRA CC1 (TRIS/Борат/ЭДТА буфер (CC1) для демаскировки антигена, разведенный) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)
- 14) ULTRA CC2 (Цитратный буфер (CC2) для демаскировки антигена, разведенный) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)
- 15) ULTRA LCS (Жидкое покрывное стекло высокотемпературное, разведенное) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)

[Перевод с английского языка на русский язык]

[Перевод надписей, штампов, нотариального заверения и ссылок на документе «Инструкция по применению на медицинское изделие „Набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit для определения DIG- меченых целевых участков нуклеиновых кислот при помощи красного хромогена методом гибридизации in situ (ISH) для диагностики in vitro на иммуностейнерах автоматических серии BenchMark“, представленном на русском и английском языках.]

[Логотип компании «Вентана»]

[Логотип компании «Рош»]

Вер. 1.0

производитель

«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).

АДРЕС МЕСТА ПРОИЗВОДСТВА МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

«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).

Одобрено компанией «Вентана Медикал Системс, Инк.» (Ventana Medical Systems, Inc.)

/подпись/

Кэти Ким (Kathy Kim)

Специалист отдела нормативно-правового регулирования

13 января 2021 г.

Дата

[Штамп:

«Вентана Медикал Системс, Инк.»
(Ventana Medical Systems, Inc)
1910 Е Инновейшн Парк Др
Тусон, Аризона 85755
(1910 E Innovation Park Dr
Tucson, AZ 85755)
(520) 887-2155]

[Штамп:

Штат Аризона, Округ Пима

Сегодня, 13 января 2021 г., ко мне лично явилась Кэти Ким (Kathy Kim) и на основании убедительных доказательств подтвердила, что является лицом, чье имя указано в качестве подписавшего лица в документе, а также подтвердила, что она подписала вышеприведенный/прилагаемый документ.

/подпись/

Нотариус]

[Штамп:

Селина Блуин Бибер (Celina Blouin Bieber)

Нотариус — штат Аризона

Округ Пима

Лицензия № 526689

Моя лицензия действительна до 29 апреля 2021 г.]

2021 г.

ССЫЛКИ

1. Шихан Д.К., Храпчак Б.Б. Теория и практика гистотехнологий, 2-е издание. Сент-Луис, Миссури: издательство «Зе СиВи Мосби Компани»; 1980 г. (Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology, 2nd Edition. St. Louis, MO: The C.V. Mosby Company; 1980).
2. Программа лабораторной аккредитации Американского колледжа патологов. Перечень анатомических патологий, 2007 г. (College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2007).
3. Институт клинических и лабораторных стандартов (CLSI) (ранее именовался NCCLS). 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), 950 Вест Вэли Роуд, оф. 2500, Уэйн, Пенсильвания 19087-1898 США, 2011 г. (CLSI (formerly NCCLS). Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunocytochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011).

Переведена Громова Александра Дмитриевна

Российская Федерация

Город Москва

Одиннадцатого февраля две тысячи двадцать первого года

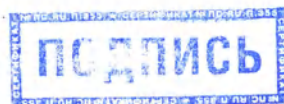
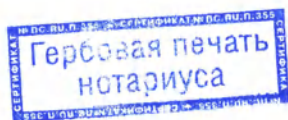
Я, Степанова Мария Михайловна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Король Викторией Алексеевной, свидетельствую подлинность подписи переводчика Громовой Александры Дмитриевны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: №08/82-н/77-2021- 8 - 978

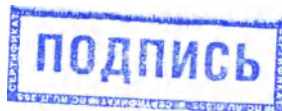
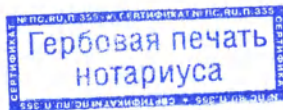
Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.



М.М. Степанова

Прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью 20 лист(-а.-ов)

М.М. Степанова



Российская Федерация
Город Москва

Одиннадцатого февраля две тысячи двадцать первого года

Я, Степанова Мария Михайловна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Король Витории Алексеевны, свидетельствую верность копии с представленного мне документа.

Зарегистрировано в реестре: N 38/82-Н/77- 2021-

Уплачено за совершение нотариального действия: 1260 руб.

М.М. Степанова



Всего прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 2 лист(=а,-ов)

РУКОВОДСТВО ПО ИНТЕРПРЕТАЦИИ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И КАРЦИНОМЫ ЖЕЛУДКА

(INTERPRETATION GUIDE)

НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

Набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit для определения DIG-меченых целевых участков нуклеиновых кислот при помощи красного хромогена методом гибридизации in situ (ISH) для диагностики in vitro на иммуноштейнерах автоматических серии BenchMark, производства «Ventana Medical Systems, Inc.», 1910 East Innovation Park Drive, Tucson, AZ 85755 USA (при применении совместно с VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, производства «Roche Diagnostics GmbH», Germany)

АДРЕС МЕСТА ПРОИЗВОДСТВА МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

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

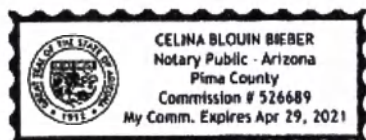
State of Arizona, County of PIMA
On this 13th day of January, 2021, before me
personally appeared Kathy Kim,
whose identity was proved to me on the basis of satisfactory
evidence to be the person whose name is subscribed to this
document, and who acknowledged that he/she signed the
above/attached document.
Celina B. Butler
Notary Public

Approved by Ventana Medical Systems, Inc.

Kathy Kim
Regulatory Affairs Specialist

13 Jan 2021
Date

Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Dr
Tucson, AZ 85755
(520)887-2155

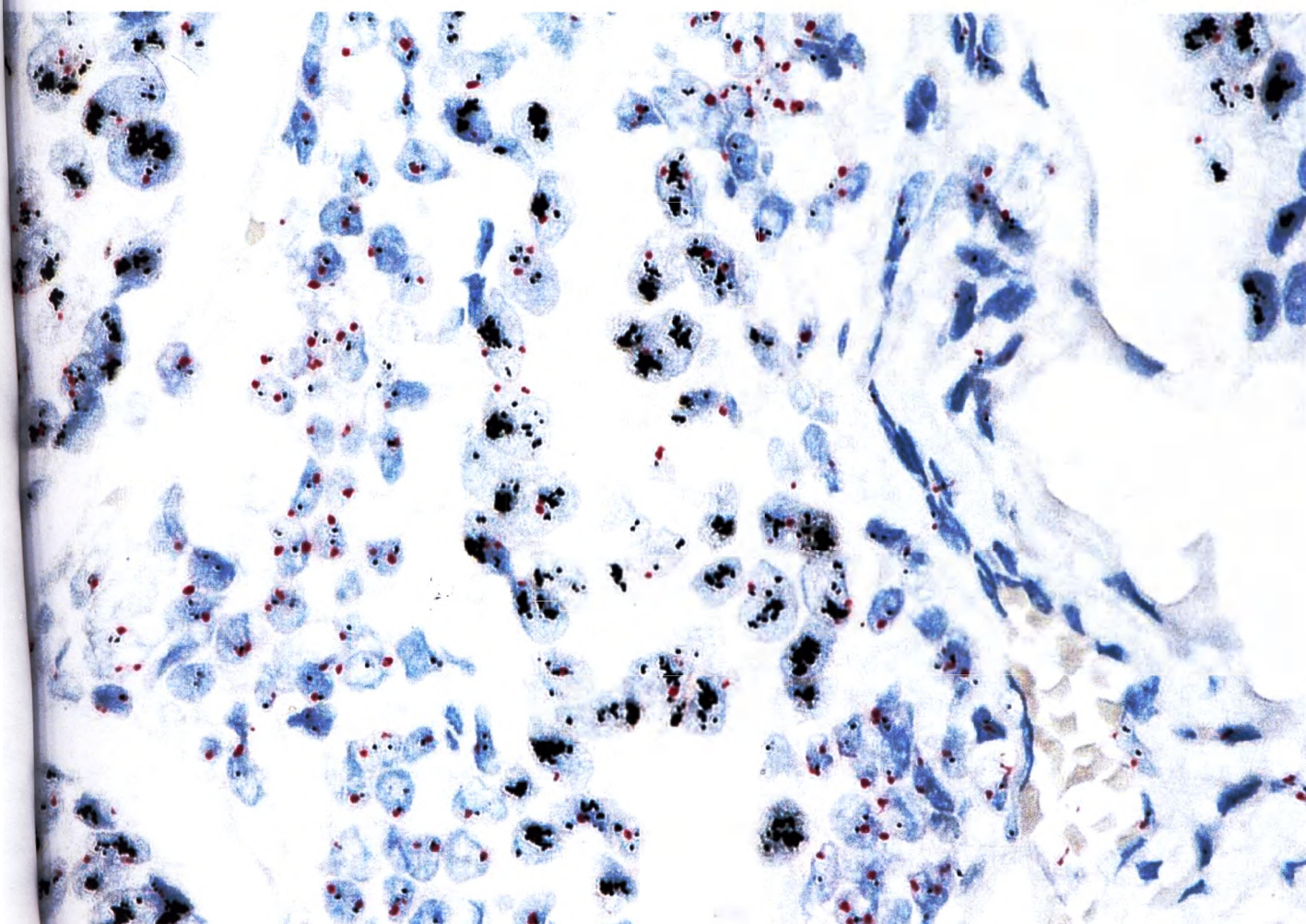


2021



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

*Руководство по интерпретации карциномы
молочной железы и карциномы желудка*



Изображения передней и задней обложки:
Кластеры *HER2* и хромосома 17, с амплификацией

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail для карциномы молочной железы и карциномы желудка

Содержание

Введение	1
Общее описание VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	1
Цель руководства по интерпретации	2
Назначение	2
Что вы можете ожидать от использования VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail в вашей лаборатории?	3
Идентификация соответствующей картины окрашивания	4
Статус гена HER2	4
Адекватность микропрепаратов	9
Визуализация сигналов и подсчет	12
Оценка микропрепаратов	15
Примеры картин окрашивания HER2 и хромосомы 17 в клинических случаях	17
Часто встречающиеся картины окрашивания	17
Дополнительные наблюдения	18
Аневзолия хромосомы 17	20
Амплификация перицентромерной области хромосомы 17	21
Контроль качества окрашивания при гибридизации in situ (ISH)	22
В каждом препарате присутствуют ядра клеток положительного контроля	22
Микропрепараты ксенотрансплантата HER2 Dual ISH 3-в-1	22
Преаналитические аспекты	24
Фиксация	24
Толщина образца	25
Другие факторы	26
Устранение неисправностей	27
Ссылки	34

IV

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail для карциномы молочной железы и карциномы желудка

Введение

Общее описание VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail предназначен для количественного определения статуса гена HER2 путем подсчета соотношения гена HER2 к хромосоме 17 с помощью световой микроскопии для диагностики *in vitro* на иммуноштейнерах автоматических серии BenchMark.

Зонды HER2 и хромосомы 17 обнаруживаются после окрашивания на аппаратах серии BenchMark IHC/ISH с помощью двухцветной хромогенной *in situ*-гибридизации в фиксированных в формалине и залитых в парафин гистологических образцах рака молочной железы и желудка, включая гастроззофагеальный переход.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail используется как вспомогательное средство при оценке целесообразности назначения препарата Herceptin (трастузумаб). Результаты должны интерпретироваться квалифицированным специалистом* с учетом данных гистологического исследования, соответствующих клинических данных и сравнения с контрольными образцами.

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

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определяет статус гена HER2 путем обнаружения: (1) копий HER2 посредством *in situ*-гибридизации (SISH) и (2) копий хромосомы 17 (Chr17) методом *in situ*-гибридизации с использованием красного хромогена (Red ISH) на одном предметном стекле. Перед интерпретацией результатов исследования должна быть проведена оценка окрашивания внутреннего положительного контроля ядер квалифицированным специалистом, знакомым с микроскопическим исследованием гистологических препаратов карциномы молочной железы и карциномы желудка, методикой *in situ*-гибридизации и распознаванием единичных и множественных копий гена HER2 (которые можно определить при микроскопическом исследовании с использованием объективов с увеличением от x40 до x60).

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail представляет собой смесь олиго-зондов, которые специфично нацелены на ген HER2 (также известный как ERBB2 и NEU), расположенный на хромосоме 17 человека (17q12), и центромерный участок Chr17, который служит для определения случаев анеуплоидии. Продукт представляет собой зонды, предназначенные для использования на приборах серии BenchMark IHC/ISH с набором для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit, набором для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit и алгоритмом подсчета.

Внимание!

По тексту руководства по интерпретации информацию об использовании образцов ксенотрансплантантов и о предметных стеклах HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides просим читать только в справочных целях.

Цель руководства по интерпретации

Это руководство предназначено для того, чтобы предоставить специалистам инструмент для облегчения определения статуса гена HER2 путем интерпретации окрашивания HER2 и хромосомы 17 с использованием VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Представленные случаи иллюстрируют разнообразие возможных картин окрашивания, которые могут наблюдаться при исследовании образцов тканей карциномы молочной железы и карциномы желудка после их окрашивания с использованием VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (рисунки 2-23).

Изображения позволяют новому пользователю ознакомиться со спектром картин окрашивания. К ним относятся примеры окрашивания единичной копии гена HER2 и хромосомы 17, множественных копий и кластеров окрашивания, полисомии хромосомы 17, а также артефактов окрашивания, которые могут встречаться. Кроме того, изображения помогают определить адекватность микропрепаратов, определить количество копий с использованием алгоритма подсчета и устранении неисправностей при проведении анализа.

Любое окрашивание, выполненное в лаборатории конечного пользователя, должно интерпретироваться в контексте внутреннего положительного контроля ядер, которые присутствуют в каждом клиническом случае. Для получения дополнительной информации см. онлайн инструкцию к применению зондов, раздел «Контроль качества» и раздел «Адекватность микропрепаратов» данного руководства.

Изображения, содержащиеся в этом руководстве по интерпретации, были получены с помощью препаратов, окрашенных с использованием VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, разработанного и валидированного на аппаратах BenchMark IHC/ISH.

Назначение

Для получения подробной информации о назначении данного продукта см. соответствующую информацию в инструкции по применению VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail.

Что вы можете ожидать от использования VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail в вашей лаборатории?

Рекомендуются гистологические срезы толщиной приблизительно 4 мкм, приготовленные из тканей, фиксированных в течение 6-72 часов в 10% нейтральном буферном формалине и залитых в парафин.¹⁻² С учетом этих условий фиксации были оптимизированы протоколы окрашивания, специфичные для тканей карциномы молочной железы или карциномы желудка (см. Инструкцию по применению зонда для параметров протокола). Результаты исследования показывают, что большинство неубедительных результатов исследования гена HER2 связано с преаналитическими факторами, включая «недостаточную» или «избыточную» фиксацию³, а также значительное время, прошедшее от момента забора ткани до фиксации.⁴ Несмотря на то, что строгое соблюдение условий фиксации является вполне реализуемым³, референсным лабораториям, получающим материал из нескольких учреждений, трудно точно контролировать время фиксации ткани. С целью компенсации изменений ткани, таких как изменяемые преаналитические факторы, был разработан данный тест вместе с некоторыми выбираемыми этапами протоколов для предварительной обработки. Учет этих параметров может позволить дальнейшую оптимизацию анализа, если это будет необходимо для исследования специфических образцов ткани.

Идентификация соответствующей картины окрашивания

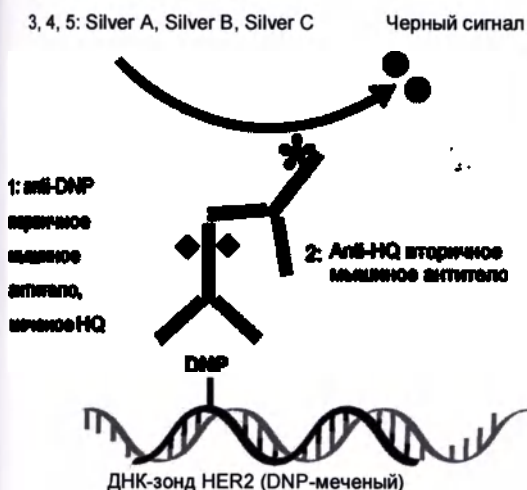
Статус гена HER2

У человека ген *HER2*, расположенный на хромосоме 17, кодирует белок HER2. Амплификация гена *HER2* наблюдается примерно в 15-25% случаев карциномы молочной железы и связана с изменением опухоли в сторону быстрого роста.⁵⁻⁹ В ходе многих клинических исследований было показано, что амплификация и/или избыточная экспрессия *HER2* связаны с неблагоприятным клиническим исходом у женщин с инвазивной карциномой молочной железы и коррелирует с несколькими отрицательными прогностическими переменными, включая отрицательный статус рецептора эстрогена (ER), высокую фракцию клеток в S-фазе, вовлечение лимфатических узлов, мутацию p53 и высокую степень ядерного полиморфизма.¹⁰⁻¹¹ Кроме того, исследования показали, что избыточная экспрессия *HER2* отмечается в 24% случаев карциномы желудка.¹² В этом руководстве по интерпретации приведены примеры окрашивания VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail в случае карциномы молочной железы и карциномы желудка (рисунки 2 и 3). Все инструкции, касающиеся преаналитического аспекта, подсчета и исправления неисправностей анализа, рассматриваемых в данном Руководстве, приводятся для образцов ткани карциномы как молочной железы, так и желудка.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail был разработан с учётом необходимости одновременной гибридизации гена *HER2* и центromеры хромосомы 17 для возможности визуализации результата с помощью светового микроскопа на одном микропрепарате. Ген *HER2* определяют зондом, меченым динитрофенолом (DNP), а последующую визуализацию обеспечивают использованием набора для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit (рисунок 1A). Центromеру хромосомы 17 детектируют с помощью меченного

Рисунок 1. VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и наборы для обнаружения

A. ДНК-зонд *HER2* (DNP-меченый) и набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit



диоксигенином (DIG) зонда и визуализируют с использованием набора для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit (рисунок 1B). Для получения дополнительной информации см. инструкцию по применению наборов для обнаружения. Окрашенные VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail микропрепараты визуализируют с помощью световой микроскопии, при которой *HER2* проявляется в виде дискретных черных сигналов (SISH), а хромосома 17 — в виде красных сигналов (Red ISH) в ядрах нормальных клеток (служащих в качестве внутренних положительных контролей для определения адекватности окрашивания), а также в ядрах клеток карциномы. Это позволяет определять статус гена *HER2* в контексте его хромосомного статуса, используя стандартную световую микроскопию с объективами с увеличением 20x, 40x и/или 60x.

Компания разработала алгоритм количественной оценки для определения статуса гена *HER2* после окрашивания с помощью VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Этот алгоритм подробно описан в разделе «Оценка микропрепаратов» (рисунок 7). Статус гена *HER2* определяется отношением среднего числа копий гена *HER2* к среднему числу копий хромосомы 17 в клетках инвазивной карциномы молочной железы или карциномы желудка. Статус гена *HER2* классифицируется как «без амплификации» (соотношение $HER2/Chr17 < 2,0$; рисунок 2, случай 1) или «с амплификацией» (соотношение $HER2/Chr17 \geq 2,0$; рисунок 2, случай 3). Следует быть внимательными в тех случаях, когда отношение попадает в диапазон 1,8 – 2,2.¹ Случаи, представляющие диапазон статуса *HER2*, показаны на рисунках 2, 3 и 6.

B. ДНК-зонд 17-й хромосомы (DIG-меченый) и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit

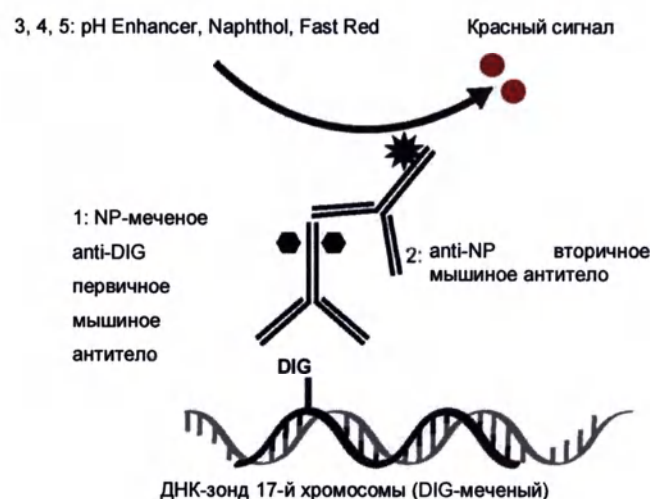
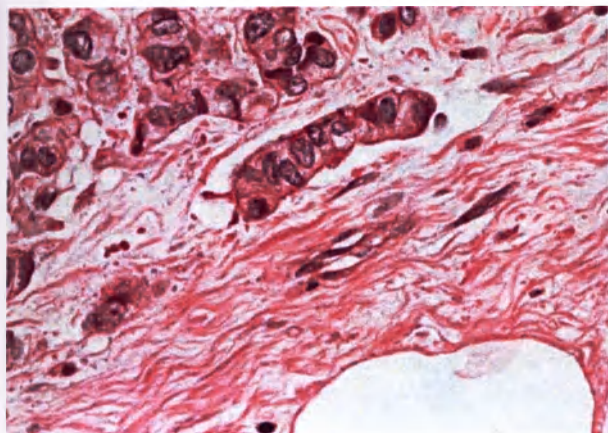
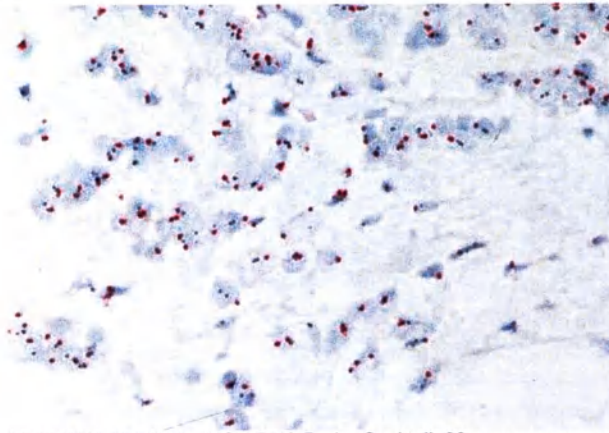


Рисунок 2. Статус гена HER2: типичные случаи карциномы молочной железы и карциномы желудка

Случай 1. Карцинома молочной железы: без амплификации HER2

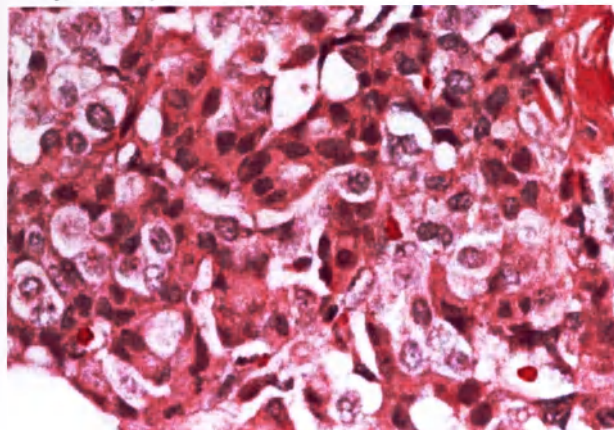


H&E 60x

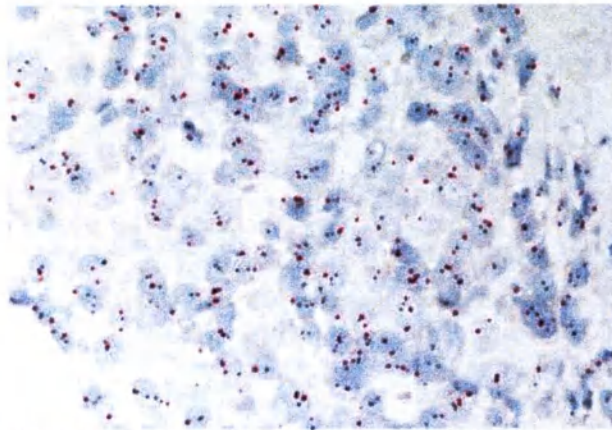


VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; видны отчетливые сигналы SISH и Red ISH видны как 1-2 копии в каждой опухолевой клетке

Случай 2. Карцинома молочной железы: без амплификации, со множественными копиями HER2 и хромосомы 17



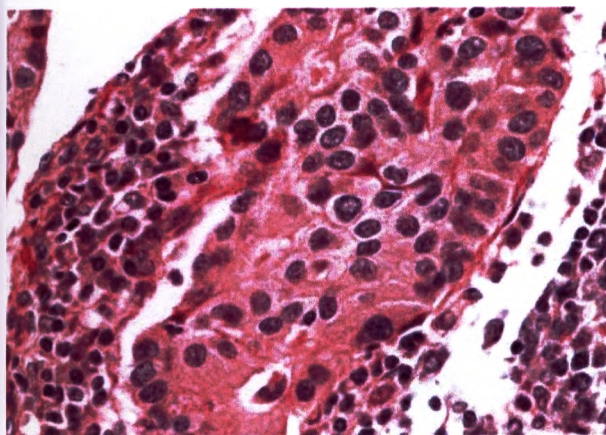
H&E 60x



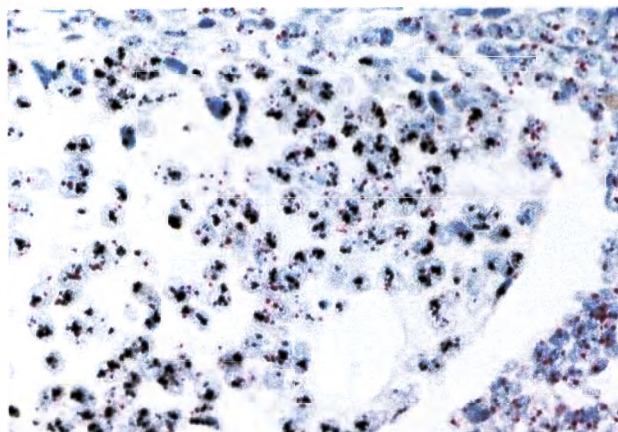
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; в некоторых опухолевых клетках присутствует более 2 сигналов SISH и Red ISH

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail для карциномы молочной железы и карциномы желудка

Случай 3. Карцинома молочной железы: с амплификацией, с кластерами SISH (HER2)

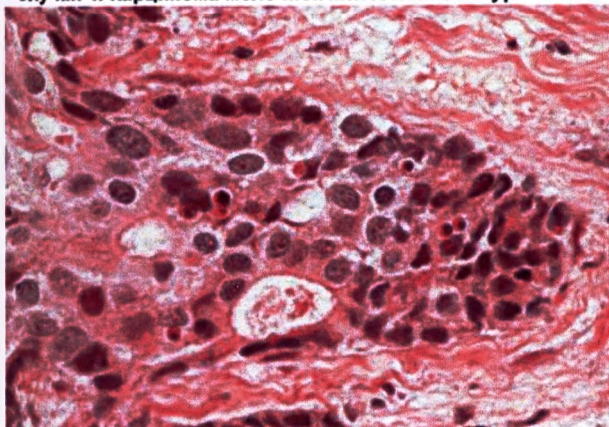


H&E 60x

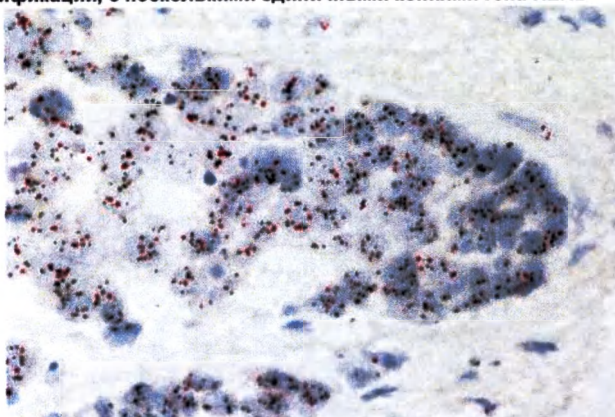


VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; присутствуют и оцениваются специалистом кластеры *HER2* SISH. Присутствуют 1-2 копии сигнала Red ISH хромосомы 17.

Случай 4. Карцинома молочной железы: низкий уровень амплификации, с несколькими единичными копиями гена *HER2*



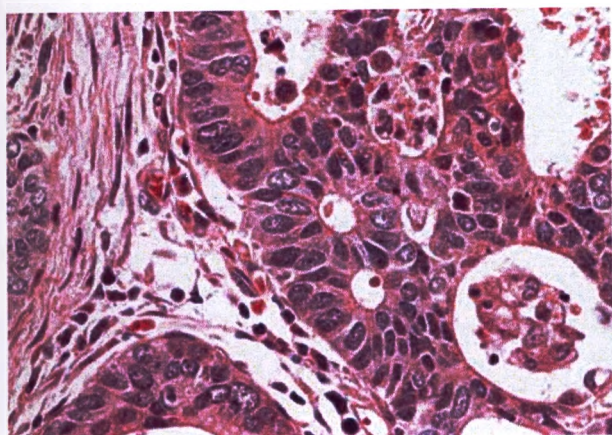
H&E 60x



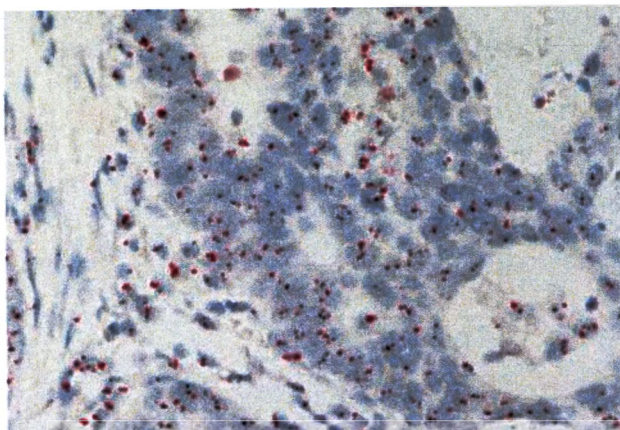
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; имеется более 6 копий *HER2*, но в среднем всего 1-2 копии хромосомы 17. Этот случай с низким уровнем амплификации.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail для карциномы молочной железы и карциномы желудка

Случай 5. Карцинома желудка: без амплификации

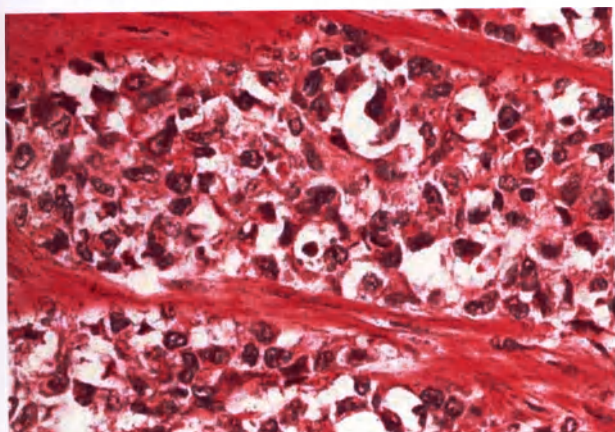


H&E 60x

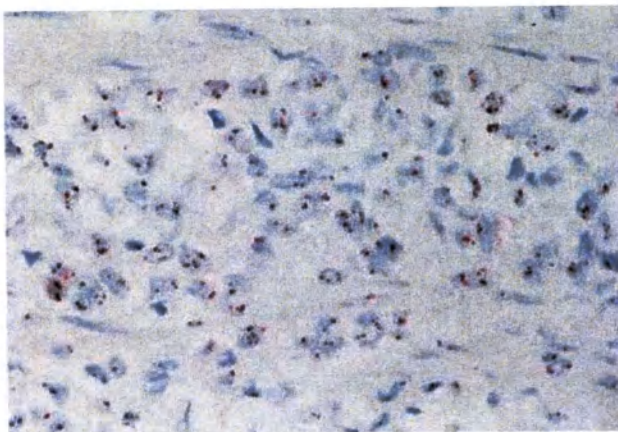


VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; видны отчетливые SISH и Red ISH сигналы видны в качестве 1-2 копий в каждой опухолевой клетке.

Случай 6. Карцинома желудка: без амплификации, со множественными копиями HER2 и хромосомы 17

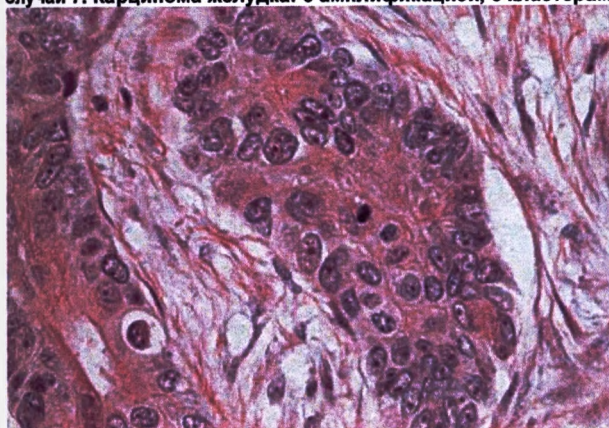


H&E 60x

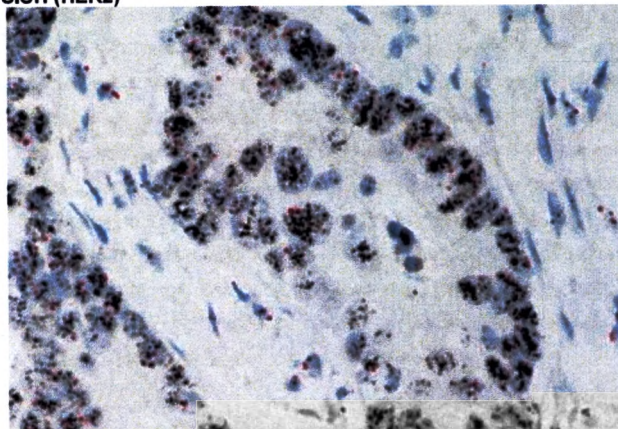


VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; в некоторых клетках присутствует более 2 копий HER2 и хромосомы 17.

Случай 7. Карцинома желудка: с амплификацией, с кластерами SISH (HER2)



H&E 60x



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x;
присутствуют и оцениваются специалистом кластеры HER2 SISH
Присутствуют 1-2 копии сигнала Red ISH хромосомы 17.

Адекватность микропрепаратов

Перед тем, как приступить к подсчёту количества сигналов от HER2 и хромосомы 17, необходимых для определения статуса гена HER2, важно определить адекватность окрашивания инвазивного целевого участка (пораженная ткань) и степень его удовлетворения критериям, описанным ниже. Если исследуемый материал является неадекватным для подсчёта сигналов, исследователю следует обратиться к разделу «Устранение неисправностей» и оценить соответствующие условия, которые необходимо соблюдать при повторном окрашивании тканей пациента.

Критерий 1. Должно присутствовать окрашивание внутреннего положительного контроля Сигналы HER2 и хромосомы 17 в ядрах, не являющихся неопластическими (от одной до двух копий на клетку, которые видны в виде окрашивания отдельных «единичных копий») действуют как внутренний, физиологический положительный контроль и положительный контроль «того же микропрепарата» и должны быть видны с помощью объективов с увеличением 20х, 40х, или 60х. Использование объектива с увеличением 100х не рекомендуется. Это четкое окрашивание ядер должно быть расположено в нормальных клетках в и/или вокруг целевого участка, включая стромальные фибробласты, эндотелиальные клетки, лимфоциты и неопухолевые эпителиальные клетки (см. рисунок 3). В связи с артефактами, вызываемыми рассечениями клеток в плоскости среза, как правило, невозможно визуализировать отдельные сигналы HER2 или хромосомы 17 ни у всех клеток в микропрепарате, ни на всех участках ткани. Тем не менее, проведение точного подсчета требует, чтобы сигналы единичной копии были видны в нормальных клетках внутри и/или рядом с целевым участком. Не менее 50% ядер нормальных клеток должны отображать как минимум один сигнал SISH, и не менее 50% должны отображать как минимум один сигнал Red ISH (сигналы SISH и Red ISH не обязательно должны присутствовать в одних и тех же клетках), чтобы целевой участок считался пригодным. Если определенный целевой участок считается слишком слабоокрашенным для подсчета, то на том же микропрепарате часто можно использовать для подсчета другой целевой участок. Если все большие участки имеют недостаточное окрашивание, то микропрепарат считается неадекватным и не может быть использован для подсчета.

Критерий 2. Окрашивание в клетках инвазивной карциномы молочной железы или карциномы желудка в целевом участке должно позволять провести подсчет С помощью объектива с

увеличением 20х, 40х и/или 60х образцы ткани инвазивной карциномы молочной железы или карциномы желудка в целевом участке должны демонстрировать исчисляемое поле сигналов HER2 (SISH) и хромосомы 17 (Red ISH). Вероятно, что в связи с биологической неоднородностью и вследствие среза тканей не каждое ядро карциномы будет содержать сигналы. Тем не менее, важно, чтобы целевой участок включал допустимую зону, в которой возможно провести подсчет. Если окрашивание на определенном целевом участке считается непригодным для подсчета, то на том же микропрепарате часто можно использовать для подсчета другой целевой участок. Если все большие участки имеют недостаточное окрашивание, то микропрепарат считается неадекватным и не может быть использован для подсчета.

Критерий 3. Окрашивание фона не должно мешать подсчету

Наконец, необходимо будет провести оценку любого фонового окрашивания, полученного с помощью систем детекции SISH или Red ISH, чтобы определить, не мешает ли оно подсчету специфических сигналов SISH или Red ISH. Фоновое окрашивание SISH обычно по внешнему виду напоминает «пыль» SISH, которая отличима от специфического сигнала (рисунок 18). Красное окрашивание может выглядеть как красная дымка или редко встречающиеся неспецифические сигналы, которые выглядят слабее, чем специфические сигналы. (рисунки 19 и 20).

На рисунке 3 приведены примеры случаев с адекватным окрашиванием внутреннего положительного контроля, которое будет считаться подходящим для подсчета.

На рисунке 4 показаны примеры случаев, которые неадекватны в связи с отсутствием окрашивания SISH или Red ISH как в ядрах клеток положительного контроля, так и в ядрах клеток опухоли. Такие случаи должны быть повторно исследованы до проведения подсчета.

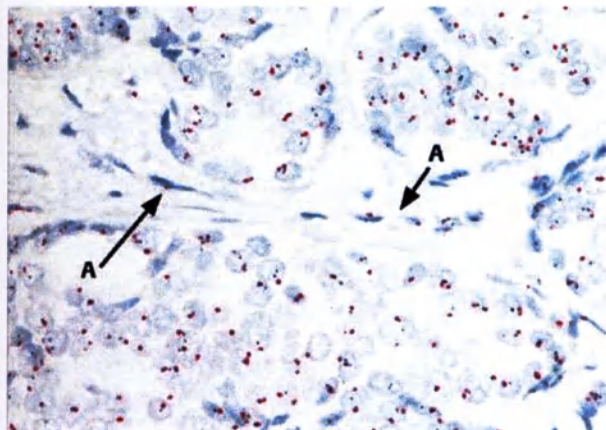
На рисунке 5 показан случай, который является неадекватным в связи с отсутствием окрашивания в ядрах клеток положительного контроля. Следовательно, для этого случая невозможно проведение подсчета, и он должен быть повторно исследован.

См. раздел «Устранение неисправностей» для повторного окрашивания образцов, не подходящих для подсчета.

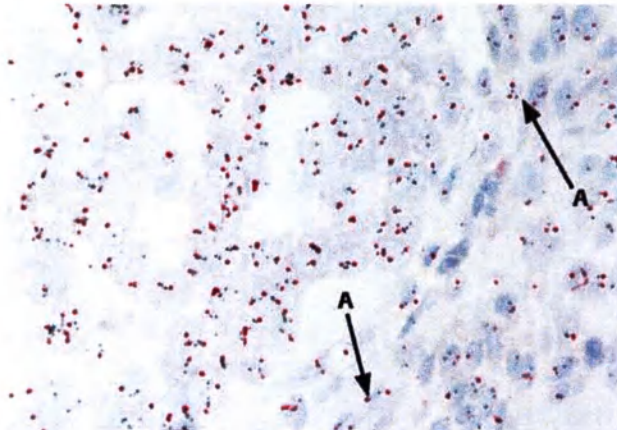
Рисунок 3. Адекватное окрашивание ядер клеток внутреннего положительного контроля.

Случай 8. Карцинома молочной железы: без амплификации

Случай 9. Карцинома молочной железы: множественные копии HER2

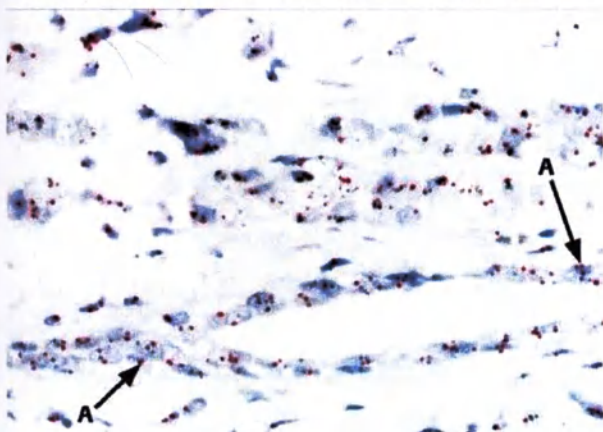


VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; без амплификации HER2. А: ядра клеток внутреннего положительного контроля



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; множественные копии HER2. А: ядра клеток внутреннего положительного контроля

Случай 10. Карцинома молочной железы: с амплификацией



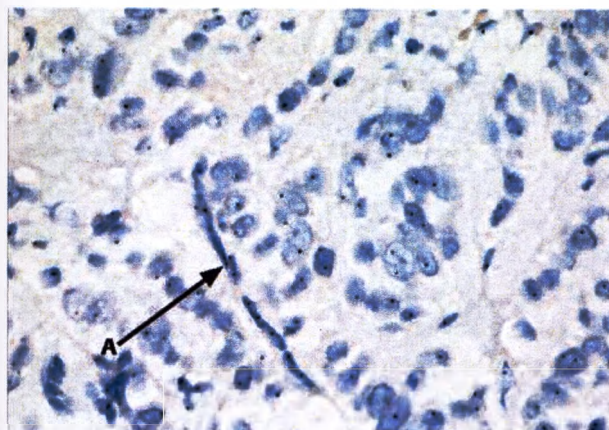
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; HER2 с амплификацией кластеров SISH.

А: ядра клеток внутреннего положительного контроля

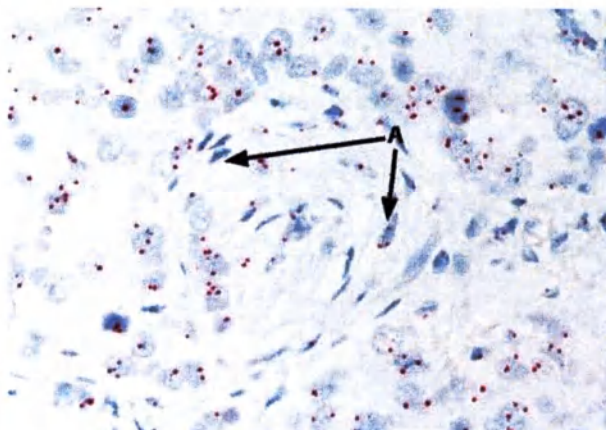
Рисунок 4. Неадекватные образцы в связи с отсутствием окрашивания SISH или Red ISH

Случай 11. Карцинома молочной железы: неадекватное окрашивание Red ISH

Случай 12. Карцинома молочной железы: неадекватное окрашивание SISH



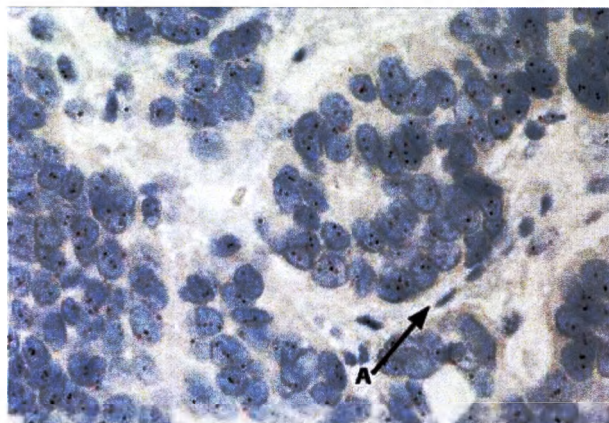
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; неадекватный в связи со слабым/отсутствующим окрашиванием Red ISH в ядрах клеток положительного контроля и ядрах клеток опухоли. А: ядра клеток внутреннего положительного контроля



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; неадекватный в связи с отсутствием окрашивания SISH в ядрах клеток положительного контроля и ядрах клеток опухоли. А: ядра клеток внутреннего положительного контроля

Рисунок 5. Неадекватные образцы в связи с отсутствием окрашивания в ядрах клеток положительного контроля

Случай 13. Карцинома молочной железы: неадекватное окрашивание SISH и Red ISH



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; неадекватен в связи отсутствием окрашивания как SISH, так и для Red ISH в ядрах клеток положительного контроля. А: Ядра клеток внутреннего положительного контроля показывают слабое/отсутствующее окрашивание как для SISH, так и для Red ISH несмотря на то, что опухолевые клетки окрашиваются обоими зондами. Этот случай не подходит для подсчета.

Визуализация сигналов и подсчет

Сигналы ISH визуализируются в виде отдельных копий, нескольких копий и кластеров (рисунок 6 и таблица 1). Одиночные копии в нормальных клетках используют в качестве эталона для подсчета сигналов в ядрах клеток карциномы. Сигналы должны быть визуализированы с использованием объективов с увеличением 20х, 40х или 60х. Использование объектива с увеличением 100х не рекомендуется.

Единичная копия

Дискретный сигнал считается единичной копией HER2 или хромосомы 17. Дискретные единичные сигналы, визуализируемые в ядрах внутреннего положительного контроля, представляют размер единственной копии в клетках карциномы (рисунки 2, 3 и 6). Ядра клеток внутреннего положительного контроля находятся среди нормальных соседних стромальных клеток (например, фибробластов/фиброцитов и эндотелиальных клеток), лейкоцитов (например, лимфоцитов и макрофагов) и нормального эпителия. Важно отметить, что дискретные сигналы, представляющие единичную копию HER2 или хромосомы 17, могут казаться меньшими или большими в некоторых образцах пациентов по сравнению с другими. Кроме того, сигналы SISH (черные) обычно меньше по размеру и более дискретны по внешнему виду, чем сигналы Red ISH (красные), в связи с различием в размерах целей и химических методах обнаружения. Поэтому важно использовать единичные сигналы, визуализируемые во внутренних ядрах клеток положительного контроля (физиологический контроль), прилегающих к целевому участку (патологическое повреждение), в качестве эталона относительного размера сигнала. Сигналы Red ISH могут казаться больше, чем сигналы SISH, иногда имеют удлиненную форму и могут различаться по размеру в пределах целевого участка и между образцами.

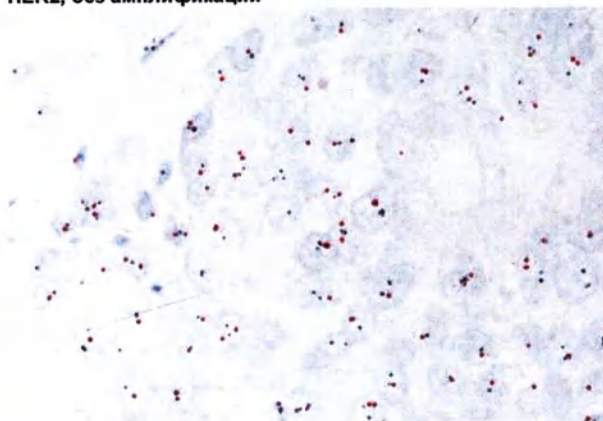
Множественные копии

Как описано выше, дискретные одиночные черные сигналы (SISH) и красные сигналы (Red ISH), визуализируемые в ядрах клеток внутреннего положительного контроля, определяют размер одной копии в клетках инвазивной карциномы. Случаи 2, 4, 6, 9,

15 и 18 на рисунках 2, 3, 6 и 8 показывают количество ядер, в которых видны несколько дискретных копий в ядрах клеток карциномы.

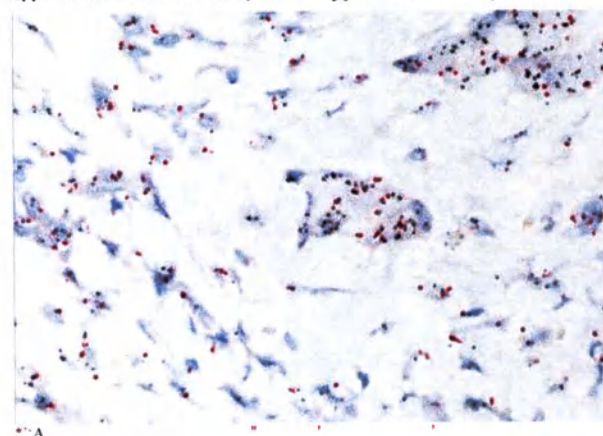
Рисунок 6. Визуализация сигналов

Случай 14. Карцинома молочной железы: единичные копии HER2, без амплификации



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60х; единичные копии HER2, без амплификации

Случай 15. Карцинома молочной железы: несколько единичных копий HER2, низкий уровень амплификации

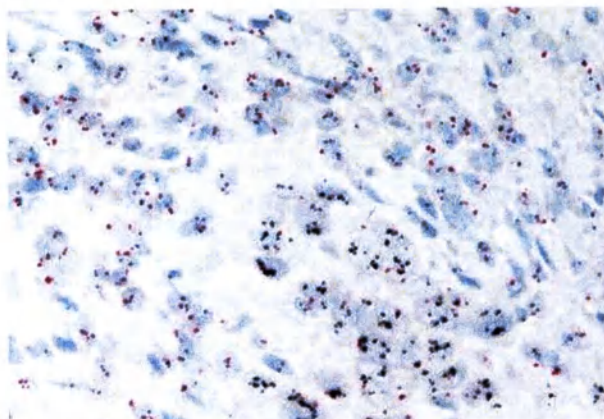


VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60х; множественные единичные копии HER2, низкий уровень амплификации

Кластеры

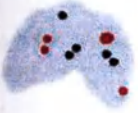
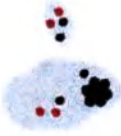
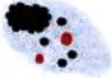
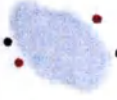
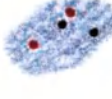
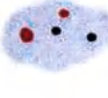
Кластер определяют, как многочисленные перекрывающиеся сигналы SISH в ядрах, которые нельзя различить по отдельности. Поскольку их трудно точно подсчитать, количество копий гена HER2 в кластере можно только оценить. Например, небольшой кластер может считаться как содержащий 6 сигналов, а более крупные кластеры — 12 или более сигналов. Одно ядро может иметь несколько небольших кластеров, несколько больших кластеров, комбинацию больших и малых кластеров и/или кластеров и единичных сигналов. Случаи 3, 7, 10, 16 и 19 на рисунках 2, 3, 6 и 8 иллюстрируют примеры ядер, в которых видны кластеры. Редко можно увидеть кластеры сигналов Red ISH, см. раздел «Амплификация перичентромерной области хромосомы 17».

Случай 16. Карцинома молочной железы: кластеры SISH, HER2 с амплификацией



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail 60x
Кластеры SISH, HER2 с амплификацией

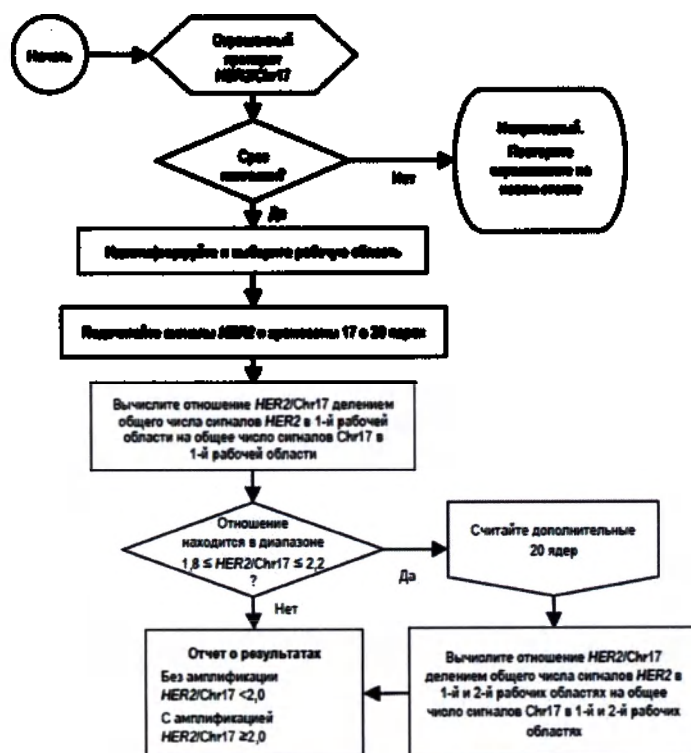
Таблица 1: Визуализация сигналов

 Не считать, если наблюдается наложение ядер.	 Небольшие кластеры SISH могут быть оценены только с использованием в качестве эталона размера одиночного сигнала. Используйте стромальные клетки для оценки размера сигнала (меньшая клетка). Например, этот кластер может быть оценен как 6 сигналов SISH. Добавив 2 оставшихся единичных сигнала, получаем в сумме 8. Считать как 2 красных сигнала. Отметьте на оценочном листе, что присутствуют кластеры для HER2.
 Не считать, если сигнал отсутствует.	 Проведите оценку крупного кластера. В данном случае кластер может быть оценен как 12 черных сигналов. Добавляя 4 единичных сигнала, получаем в сумме 16. Считать красные сигналы как 2 копии хромосомы 17. Отметьте на оценочном листе, что присутствуют кластеры для HER2.
 Не считать, если присутствуют сигналы только одного цвета.	 Красный сигнал, расположенный близко к черному сигналу, должен быть учтен как один красный сигнал и один черный сигнал. Чтобы различить эти сигналы, может потребоваться подсчет с использованием объектива с увеличением в 60 раз. Поэтому произведите подсчет таким образом: 4 черных (HER2) и 2 красных (Chr17) сигнала. Если наложенные сигналы нельзя различить, не учитывайте эти ядра.
 Не считать, если сигналы расположены вне ядер.	 Кластер черных точек затемняет красный (-е) сигнал (-ы). Большее увеличение (x60) может использоваться при попытке подтвердить наличие или отсутствие красного сигнала (-ов); в противном случае не учитывайте эти сигналы: всегда учитывайте ядра с только четкими красными сигналами. Отметьте наличие SISH-кластеров в оценочном листе. В ядрах с SISH-кластерами должны засчитываться ядра с видимыми и более многочисленными красными сигналами.
 Считать как 1 черный (HER2) и 1 красный (Chr17) сигнал	 Если в ядрах возникает фоновая «пыль» SISH, учитывайте ее, только если специфические SISH-сигналы четко отличны от фона.
 Считать как 2 черных (HER2) и 2 красных (Chr17) сигнала	 Может наблюдаться розовая размытость, которая не должна быть по ошибке принята за сигнал. Могут быть видны небольшие, слабые Red ISH сигналы, которые могут представлять неспецифическое связывание зонда Chr17 с другими хромосомами. На изображении показаны 2 дискретных красных (Chr17) сигнала и 2 черных (HER2) сигнала.
 Считать как 1 черный (HER2) и 2 красных (Chr17) сигнала. Черный сигнал является «удвоенным». Считать два близко расположенных сигнала одного и того же цвета, только если расстояние между ними равно или больше диаметра единичного сигнала	

Оценка микропрепаратов

Был разработан алгоритм количественной оценки, который (включительно), специалисту рекомендуется учесть дополнительные 20 ядер, а результирующее соотношение рассчитывают из общего числа 40 ядер. Статус гена HER2 определяют как «без амплификации» ($HER2/Chr17 < 2.0$) или «с амплификацией» ($HER2/Chr17 \geq 2.0$). Блок-схема алгоритма подсчета показана на рисунке 7.

Рисунок 7. Блок-схема алгоритма оценки



Резюме оценки

Как только целевой участок, который демонстрирует адекватное окрашивание, локализован, должны быть подсчитаны только репрезентативные клетки инвазивного рака, которые содержат сигналы как SISH (HER2), так и Red ISH (Chr17). Подсчет сигналов не следует проводить на участках, которые содержат: слабые или отсутствующие сигналы SISH или Red ISH, клетки внутреннего контроля с отсутствием окрашивания, сжатые или перекрывающиеся ядра, ядра с избыточным окрашиванием фона Red ISH или SISH или зоны некроза. Кроме того, подсчет сигналов не следует проводить в ядрах, не являющихся репрезентативными для общей популяции ядер клеток инвазивной карциномы в целевом участке. Например, не следует проводить подсчет в аномально больших ядрах (в 2 или более раз крупнее по сравнению с другими ядрами клеток карциномы, находящихся в поле зрения) и маленьких ядрах (приблизительно вдвое меньше других ядер клеток карциномы). Наконец, проводят подсчет только в ядрах, представляющих популяцию ядер клеток инвазивной карциномы с наибольшим средним числом сигналов (как SISH, так и Red ISH). Гетерогенность более подробно обсуждается в разделе Дополнительные наблюдения.

Чтобы оценить микропрепарат, окрашенный VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail:

1. Анализируют окрашенный H&E (гематоксилином и эозином) микропрепарат с целью нахождения участков, содержащих клетки инвазивной карциномы молочной железы или карциномы желудка.
2. Анализируют микропрепарат, окрашенный HER2 Dual ISH, соответствующий окраске H&E (гематоксилином и эозином), и определяют участок, содержащий клетки инвазивной карциномы молочной железы или карциномы желудка, где:
 - Большинство клеток на выбранном участке отображают сигналы гибридизации как для SISH, так и для Red ISH, которые не скрыты неспецифическим окрашиванием фона.
 - На каждом участке, прилежащем к области опухоли, имеются клетки внутреннего положительного контроля, подлежащие оценке (примечание: окрашивание клеток внутреннего положительного контроля не применимо для ксенотрансплантатов, поскольку ксенотрансплантаты состоят из линий опухолевых клеток человека, выращенных на мышах. Следовательно, неопухолевые клетки — это клетки мыши, содержащие последовательности мышинных

HER2 и Chr17, которые не будут обнаружены ни одним зондом).

- Зона считается пригодной для подсчета, если в различных нормальных клетках присутствует от одной до двух копий сигналов HER2 и Chr17, включая стромальные фибробласты, эндотелиальные клетки, лимфоциты и другие неопухолевые клетки
3. Проводят подсчет в 20 репрезентативных ядрах в инвазивной зоне на образец, отвечающий следующим требованиям:
 - Размер ядер незначительно больше или меньше, чем медианный диаметр ядер среднего размера в клетках опухоли.
 - Выбирают клетки, которые минимально перекрываются или не перекрываются другими клетками.
 - Если сигналы Red ISH и SISH оказываются перекрывающимися, то специалисту, чтобы различить их, может потребоваться изучить сигналы при 60-кратном увеличении.
 - Не учитывают ядра с чрезмерным расщеплением или «пузырчатые» ядра или находящиеся на участках микропрепарата с неспецифическим окрашиванием, что может помешать подсчету. См. раздел «Устранение неисправностей» для ознакомления с изображениями этих типов ядер. Также см. обсуждение преаналитических факторов.
 - Ядра, представляющие популяцию ядер клеток инвазивной карциномы с наибольшим средним числом сигналов (как SISH, так и Red ISH).
 - Обращают внимание на наличие кластеров HER2 и оценивают количество копий на основе размера одной копии. Обращают внимание, что следует учитывать большее количество сигналов Red ISH, видимых в ядрах с кластерами SISH.
 4. Определяют сумму количества копий HER2 и Chr17 и рассчитывают полученное соотношение. Если отношение попадает в диапазон 1,8-2,2 (включительно), необходимо провести подсчет дополнительно в 20 ядрах, а окончательное соотношение получают на общем количестве 40 ядер.

Примеры картин окрашивания HER2 и хромосомы 17 в клинических случаях

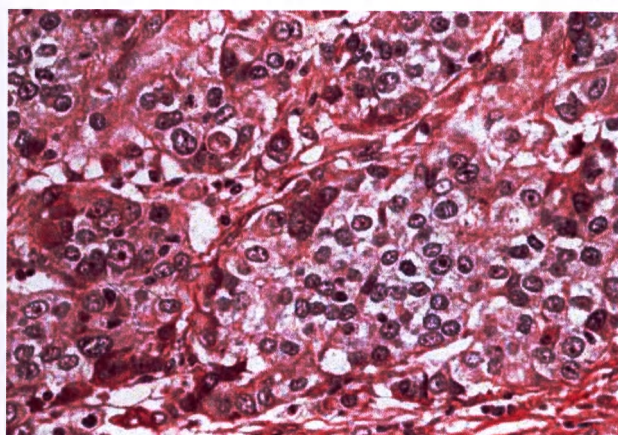
Следующие изображения (рисунки 8-11) представлены для иллюстрации разнообразных картин окрашивания, которые могут возникнуть в результате окрашивания препаратов карциномы молочной железы или карциномы желудка с помощью VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Назначение этих изображений

состоит в том, чтобы позволить начинающему исследователю, использующему этот анализ, ознакомиться со всем спектром картин окрашивания образцов. Любое окрашивание, выполненное в лаборатории конечного пользователя, должно интерпретироваться в контексте исследования ядер клеток внутреннего положительного контроля и контролей с клиническими случаями на момент оценки (см. раздел «Контроль качества»).

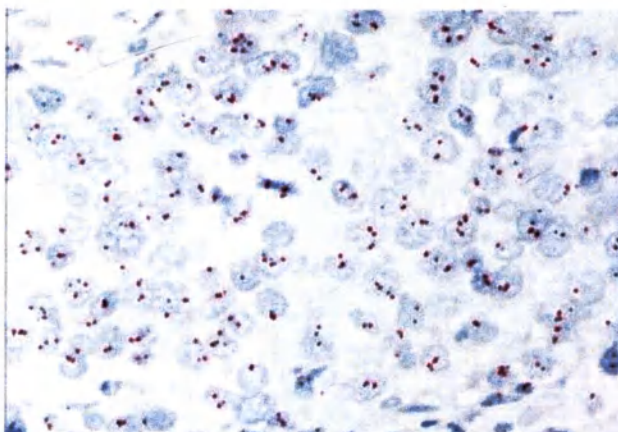
Часто встречающиеся картины окрашивания

Рисунок 8. Без амплификации, множественные копии и случаи с амплификацией

Случай 17. Карцинома молочной железы: без амплификации

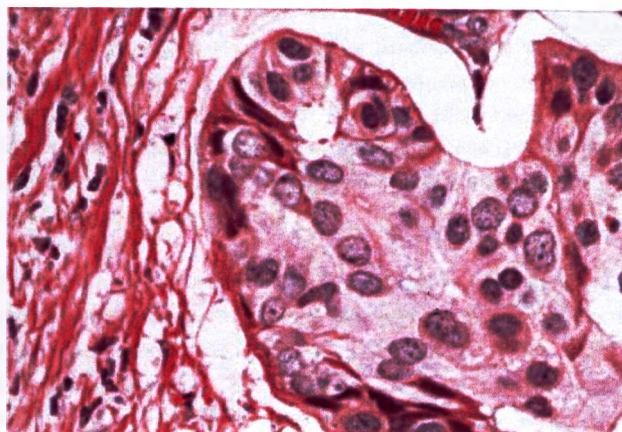


H&E 60x

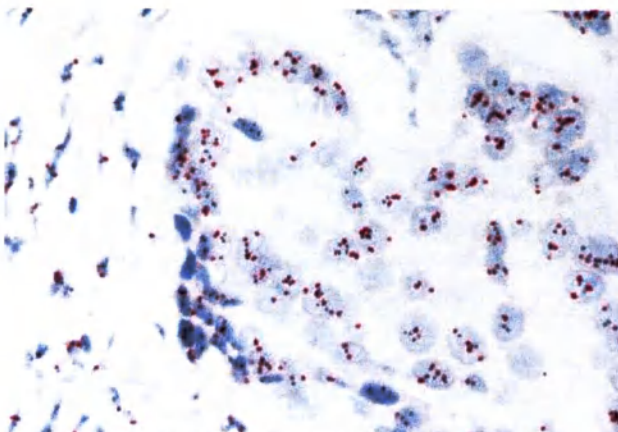


VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; единичные копии HER2, без амплификации

Случай 18. Карцинома молочной железы: множественные копии

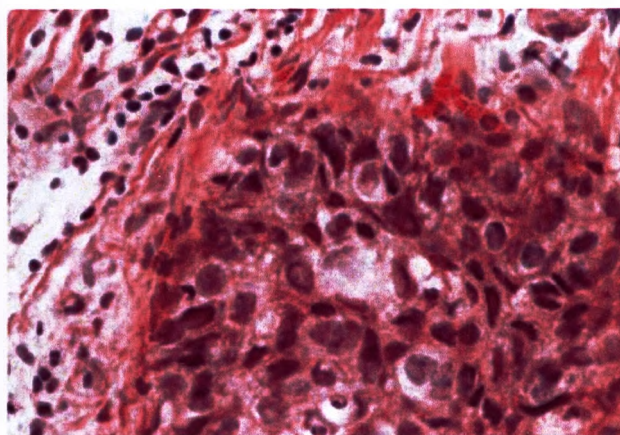


H&E 60x

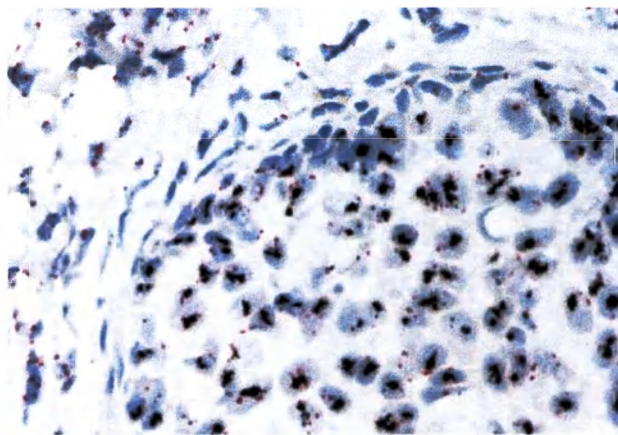


VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; несколько отдельных копий HER2, несколько отдельных копий HER2 и хромосомы 17, которые следует учитывать с осторожностью.

Случай 19. Карцинома молочной железы: с амплификацией



H&E 60x



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x;
кластеры HER2, с амплификацией

Дополнительные наблюдения

Результаты наблюдения, отличные от часто встречающихся картин окрашивания (рисунок 8) в отношении окрашивания HER2 или хромосомы 17, могут быть клинически значимыми и должны быть отмечены в виде комментариев в отчете патологоанатома.

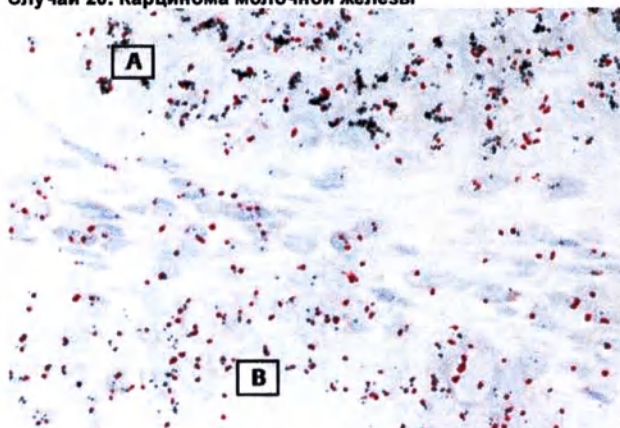
Гетерогенность

Образцы тканей могут содержать ядра клеток карциномы молочной железы или карциномы желудка, которые являются генетически гетерогенными для количества копий HER2. В этих случаях может иметь место смесь ядер с амплификацией для HER2 и без амплификации для HER2 (рисунок 9). Это может наблюдаться среди клеток карциномы в пределах одного целевого участка или между двумя различными целевыми участками в ткани. Для подсчета рекомендуется выбирать ядра с большим количеством копий HER2. Следует также обратить внимание на выбор клеток с репрезентативным количеством копий хромосомы 17. Гетерогенность относительного количества копий должна быть отмечена в заключении пациента.

Инвазивная карцинома молочной железы в сравнении с протоковой карциномой *in situ* В клинических условиях копии HER2 и хромосомы 17 следует подсчитывать только при инвазивной карциноме. Не следует проводить подсчет при окрашивании клеток протоковой карциномы *in situ* (DCIS) в образцах молочной железы. Специалисту рекомендуется обратиться к соответствующему микропрепарату H&E (окрашенному гематоксилином и эозином), чтобы определить подходящие целевые участки для подсчета в микропрепарате, окрашенном VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (рисунок 10).

Рисунок 9. Гетерогенность

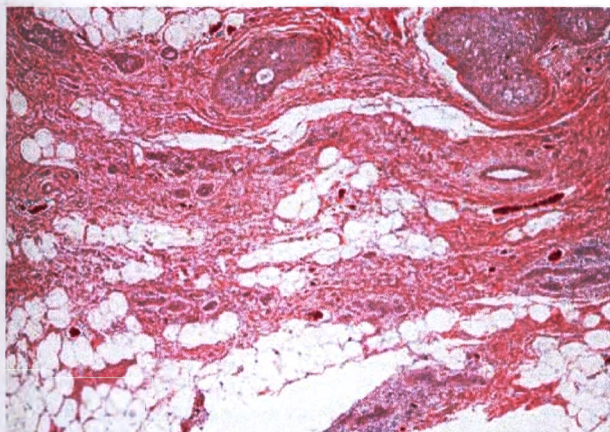
Случай 20. Карцинома молочной железы



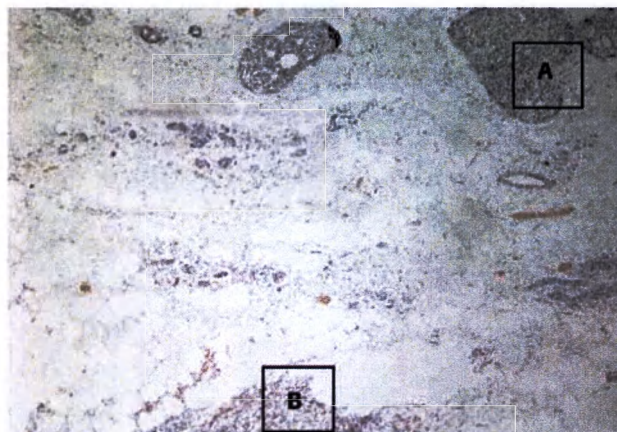
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; гетерогенный для количества копий HER2 в пределах одной целевой области. А: большое число копий для HER2 и явная полисомия для хромосомы 17. В: небольшое число копий для HER2

Рисунок 10. Инвазивная и протоковая карцинома in situ в образцах молочной железы

Случай 21. Карцинома молочной железы

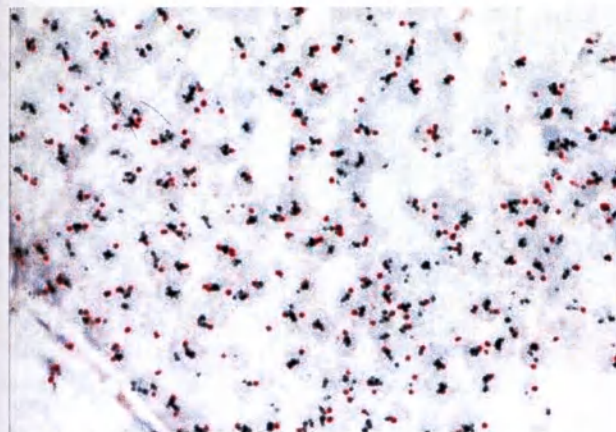


H&E, 4x; протоковая карцинома in situ и инвазивная карцинома



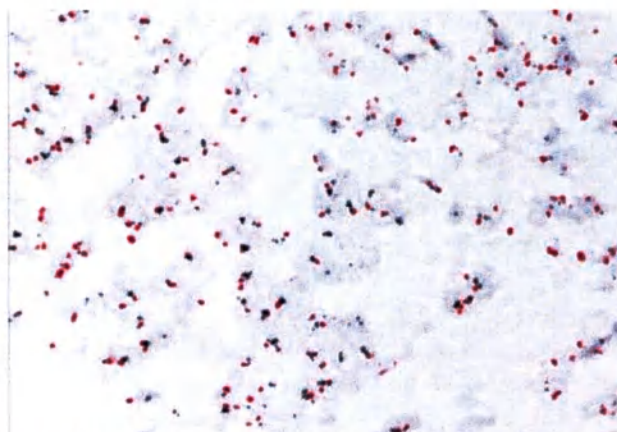
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 4x; протоковая карцинома in situ (A) и инвазивная карцинома (B)

(A) Протоковая карцинома in situ



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; с амплификацией HER2. Не следует проводить подсчет для протоковой карциномы in situ.

(B) Инвазивная карцинома



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; с амплификацией HER2. Подсчет проводится при инвазивной карциноме.

Аневзомия хромосомы 17

Моносомия

Моносомия — это состояние, при котором ядра карциномы содержат в среднем только одну копию хромосомы 17.

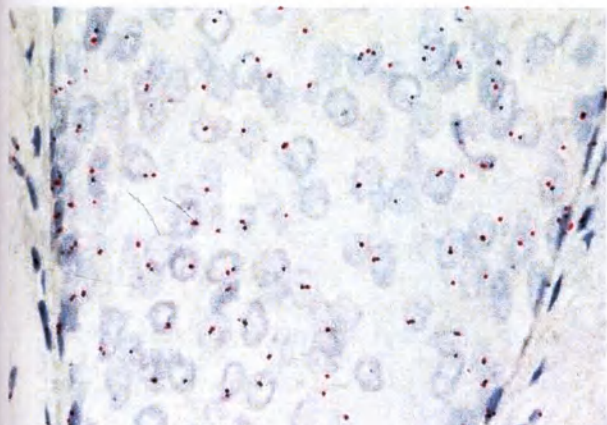
Число копий гена HER2 для случая 22 (рисунок 11) приблизительно равно единице, но обратите внимание, что хромосомы 17 также является моносомным. Таким образом, произошла генетическая потеря хромосомы. В отчете о случае 22 можно отметить моносомию 17.

Полисомия

Полисомия — это состояние, при котором в ядрах клеток карциномы содержится по крайней мере на одну копию хромосомы больше, чем в нормальных ядрах.¹³ В этих полисомных ядрах может быть три или более копий хромосомы 17 (рисунок 11, случай 23). Это не следует путать с диплоидными, делящимися ядрами, присутствующими в ткани и содержащими от трех до четырех копий хромосомы 17. В случае 23 содержится несколько копий HER2, но обратите внимание на случайную полисомию хромосомы 17.

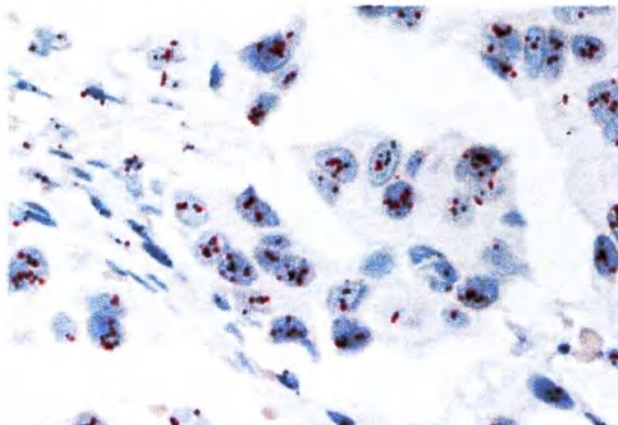
Рисунок 11. Аневзомия хромосомы 17

Случай 22. Карцинома молочной железы



HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; моносомия. Потеря одной копии хромосомы 17 и связанного с ней гена HER2.

Случай 23. Карцинома молочной железы



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; полисомия множественные копии HER2 и хромосомы 17. Случай должен быть тщательно исследован для определения статуса амплификации.

Амплификация перичентромерной области хромосомы 17

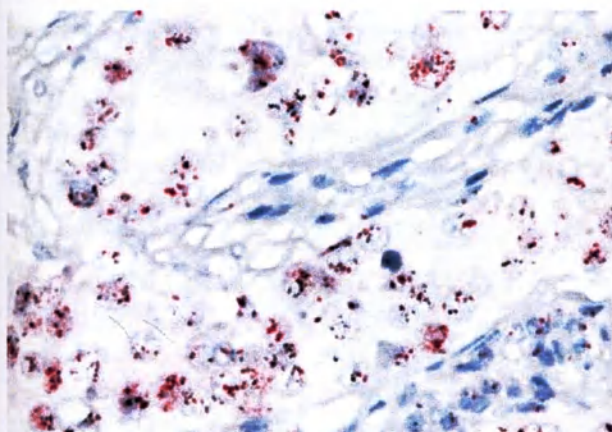
Существуют литературные данные о явной "амплификации", кластерах или полисомии хромосомы 17 (с явными кластерами HER2 или без них).¹³⁻¹⁴ В случае 24 HER2 явно амплифицируется, а для хромосомы 17 также наблюдается кластеризованная картина окрашивания Red ISH (рисунок 11). Даже при том, что HER2 и хромосомы 17 кластеризованы, необходимо не рассматривать это

как случай без амплификации HER2 с соотношением ~1,0.

В случаях явной амплификации хромосомы 17 специалист должен обратить внимание на оценку VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и картину окрашивания для обоих зондов, а также ознакомиться с результатами ИГХ исследований при выдаче заключения. Согласно нашему опыту, большинство из этих случаев с кластеризацией HER2 и хромосомы 17 имеют тенденцию к избыточной экспрессии белка (3+ методом ИГХ окрашивания), см. рисунок 11, случай 24b.

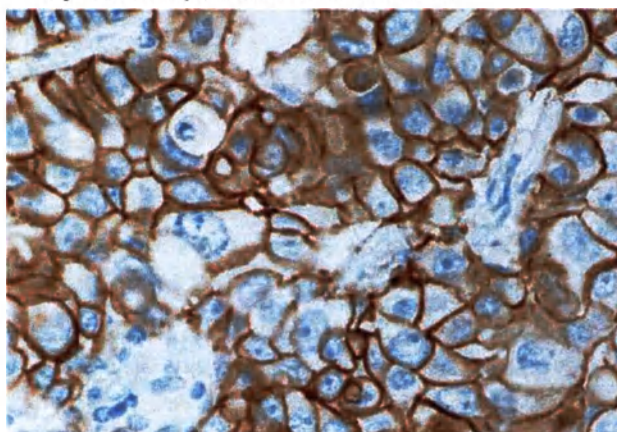
Рисунок 11. Аневзомия хромосомы 17 (продолжение)

Случай 24а. Карцинома молочной железы



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; амплифицированная HER2 с амплификацией перичентромерной области хромосомы 17

Случай 24b. Карцинома молочной железы



ИГХ 60x; окрашивание HER2/neu 4B5, 3+ с помощью ИГХ, сверхэкспрессия HER2

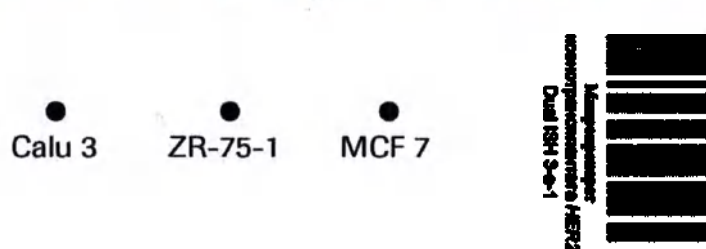
Контроль качества окрашивания при гибридизации in situ (ISH)

В каждом образце ткани присутствуют ядра клеток положительного контроля

Как обсуждалось в разделе «Адекватность микропрепаратов», нормальные сигналы HER2 SISH и Chr17 Red ISH (от одной до двух копий на клетку) действуют в качестве внутренних положительных контролей и контролей «того же микропрепарата» для каждого случая и должны быть видны в образце. Специфическое ядерное окрашивание HER2/Chr17 может локализоваться в различных клетках, включая стромальные фибробласты, эндотелиальные клетки, лимфоциты и неопухолевые эпителиальные клетки. При этом не во всех клетках будет наблюдаться единичная копия гена в связи с биологической гетерогенностью и плоскостью микротомирования. Поскольку ген HER2 и хромосомы 17 присутствуют в каждой клетке человека, настоящего внутреннего отрицательного контроля не существует.

По желанию пользователя положительный контроль может быть включен для каждого выполненного цикла окрашивания. Контроли используют для подтверждения правильности работы реагентов и прибора. Важно, чтобы оптимальные условия окрашивания были определены на контрольных образцах до начала анализа образцов пациентов. Положительный контроль может включать образцы, которые приготовлены способом, идентичным использованному для подлежащих исследованию образцов пациентов. Эти образцы могут быть полезны, поскольку они служат в качестве контроля качества на всех этапах процедуры, от преаналитической подготовки образца до процесса окрашивания. Использование образца, приготовленного иначе, чем исследуемые образцы, обеспечит контроль реагентов, прибора и методик, но не методов фиксации и обработки образцов. Такие контроли не должны заменять надлежащую оценку внутренних положительных контролей в каждом образце пациента.

Рисунок 12. Схема расположения микропрепарата ксенотрансплантата HER2 Dual ISH 3-в-1



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail для карциномы молочной железы и карциномы желудка

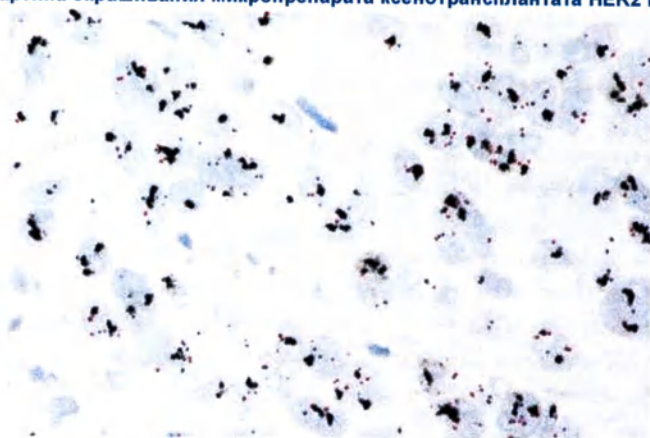
Микропрепараты ксенотрансплантата HER2 Dual ISH 3-в-1

Микропрепараты ксенотрансплантата HER2 Dual ISH 3-в-1 в сочетании с VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail предназначены для использования на приборах BenchMark IHC/ISH при начальной установке и/или поиске и устранении неисправностей.

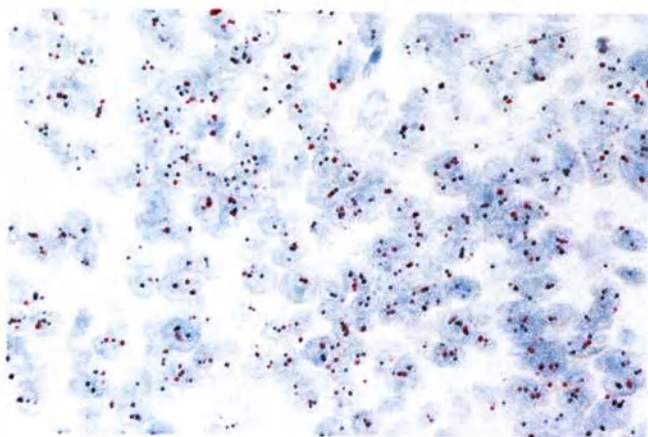
Микропрепараты с ксенотрансплантатами HER2 Dual ISH 3-в-1 содержат по три отдельных биоптата ксенотрансплантата, которые зафиксированы формалином и залиты в один парафиновый блок (рисунок 12). На основе их молекулярной характеристики числа копий гена HER2 и уровней белка были отобраны клеточные линии (Calu-3, ZR-75-1 и MCF-7) (согласно опубликованным литературным данным), и они отражают диапазон копий HER2, наблюдаемых в клинических образцах (рисунок 13). Следует обратить внимание, что ксенотрансплантаты содержат клетки мыши-хозяина с вкрапленными клетками карциномы человека. Эти клетки не будут специфически окрашиваться, так как HER2 и хромосома 17 человека не обнаруживаются в клетках мыши.

Микропрепараты с ксенотрансплантатом можно использовать для устранения неисправностей, если есть подозрения на проблемы с прибором или реагентом (для получения более подробной информации см. инструкцию по применению)

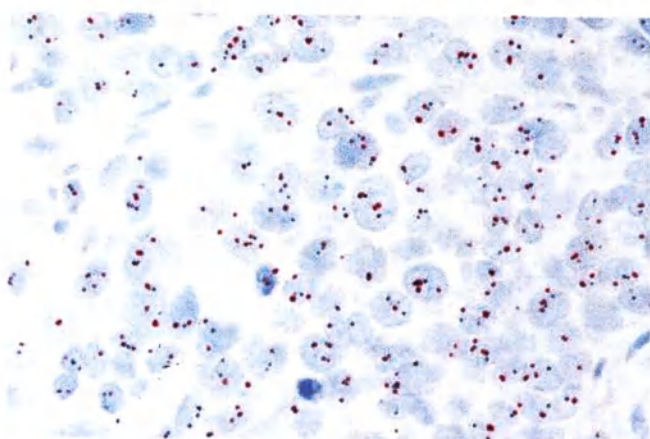
Рисунок 13. Характерная картина окрашивания микропрепарата ксенотрансплантата HER2 Dual ISH 3-в-1



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; Calu-3, с амплификацией HER2.



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; ZR-75-1, ~3 копии HER2.



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; MCF-7, ~2 копии HER2.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail для карциномы молочной железы и карциномы желудка

Преаналитические аспекты

Важным фактором является преаналитическая подготовка образцов прежде, чем использовать какой-либо анализ гибридизации *in situ*.¹⁻⁴

Для исследований с использованием VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail рекомендуется фиксация ткани в 10% нейтральном буферном формалине (NBF) в течение 6-72 часов с последующей заливкой в парафин и микротомированием на срезы толщиной приблизительно четыре микрона.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail был разработан с учетом дополнительных вариантов предварительной обработки, которые могут помочь в оптимизации анализа в различных лабораториях и для последующего устранения неисправностей в отдельных образцах тканей/ микропрепаратах с неоптимальным окрашиванием. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория проводила номинальные опыты с репрезентативными контрольными образцами, которые были подготовлены в тех же условиях, что и клинические образцы, подлежащие исследованию. Это поможет оптимизировать специфические условия окрашивания для отдельных лабораторий, в которых могут наблюдаться различия в проведении идентичных процедур подготовки образцов. Могут совсем не окрашиваться соответствующим образом в ходе анализа образцы, которые были преаналитически подготовлены с использованием не рекомендованных условий.

Исследования показали, что большая часть «неубедительных» результатов для гена HER2, полученных при флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), связана с преаналитическими факторами, включая «недостаточную» и «избыточную» фиксацию³ и позднюю фиксацию.⁴ Строгое выполнение процедур фиксации (например, выделенный процессор, обеспечивающий фиксацию минимум в течение 6 часов) привело к снижению количества «неубедительных» случаев на 64% с 10,8% ошибок до 3,4%.³

Фиксация

Для образцов биопсии, зафиксированных в 10% нейтральном буферном формалине, залитых в парафин и микротомированных на срезы толщиной приблизительно 4 мкм, рекомендуется использовать протеазу Ventana ISH Protease 3 в течение двадцати минут (то есть условие для номинальных циклов). Рекомендуется только фиксация в 10% нейтральном буферном формалине, так как некоторые фиксаторы вызывают неравномерное окрашивание с помощью анализов на основе ISH (включая раствор Боуэна и спирт-формалин-уксусную кислоту (AFA)).

Следует отметить, что биологическая гетерогенность и различия в подготовке образца также могут влиять на интенсивность сигнала (то есть на размер сигналов SISH и Red ISH). Таким образом, интенсивность сигнала может варьироваться от случая к случаю или для разных зондов в ряде случаев. Для каждого микропрепарата клетки внутреннего контроля, расположенные рядом и/или на целевом участке, служат в качестве эталона для размера сигнала, а наличие в них 1-2 копий окрашенных HER2 и хромосомы 17, следует использовать для определения адекватности микропрепарата.

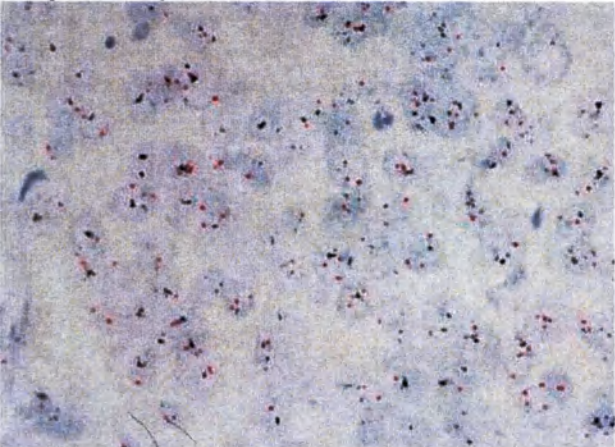
Для дополнительной общей информации о преаналитиках, см. рекомендации руководства ASCO/CAP для исследования HER2.¹⁻²

Толщина образца

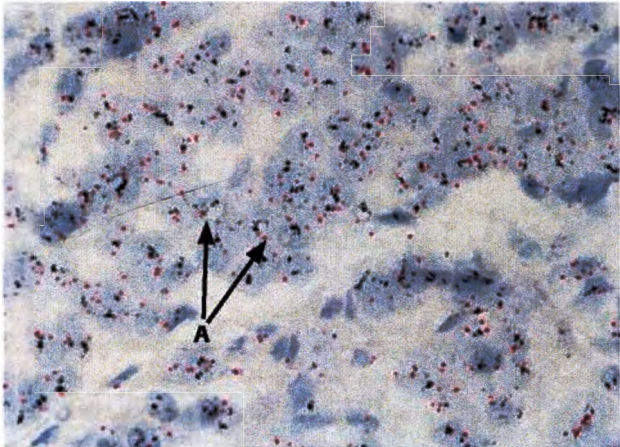
Срезы толщиной более 4 мкм могут потребовать более длительной предварительной обработки протеазой, такой как ISH Protease 3, в течение >20 минут. Такое более длительное инкубирование с протеазой эффективно при демаскировании ДНК в более толстых срезах образцов. Более тонкие срезы могут потребовать более слабой обработки протеазой (например, ISH Protease 3 в течение 8 минут), если наблюдается чрезмерное окрашивание ядерного фона или избыточный лизис (см. раздел «Устранение неисправностей»). Кроме того, в связи с избытком парафина в срезах тканей толщиной более 4 мкм может наблюдаться большая «пузырчатость ядер»,

Рисунок 14. Влияние толщины ткани на окрашивание

Случай 25: Карцинома молочной железы



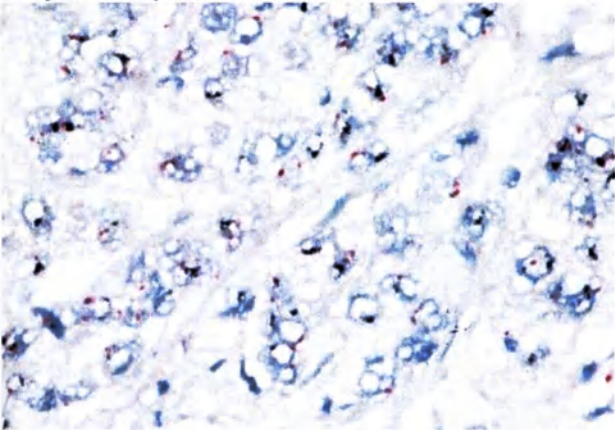
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; рекомендуемая толщина среза 4 мкм



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; удвоенная рекомендуемая толщина (срез толщиной 8 мкм) А: пузырьчатость ядра. Обратите внимание, что «пузырчатость ядра» усиливается в толстых срезах в связи с избытком парафина.

Рисунок 15. Пример «пузырчатости ядра»

Случай 26. Карцинома молочной железы



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; «пузырчатость ядер»

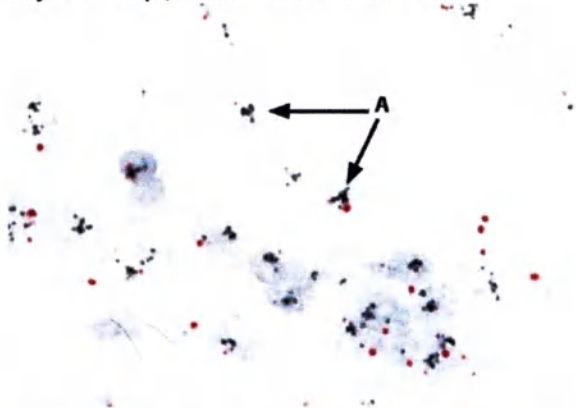
Другие факторы

Тип образца

Важно учитывать тип исследуемого образца в анализе (например, ткань, полученная при пункционной биопсии по сравнению с эксцизионной биопсией). Оптимизация предварительной обработки ISH для каждого типа образцов может быть необходимой, если наблюдаются различия в качестве окрашивания.

Рисунок 16. Ухудшение морфологических характеристик ядер в связи с недостаточной фиксацией и последующим чрезмерным лизированием протеазой

Случай 27. Карцинома молочной железы



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; чрезмерное лизирование. A: ядра с чрезмерным лизированием

Общее качество образца

Окрашивание может быть неоптимальным в тканях, содержащих участки артефактов при раздавливании, некроза или в ткани с ухудшением общих морфологических характеристик. В каждом случае для оценки общих морфологических характеристик образца рекомендуется проводить оценку окрашивания H&E (гематоксилином и эозином).

Баланс между морфологическими

характеристиками ядра и интенсивностью сигнала

В образцах, приготовленных без соблюдения рекомендаций, часто можно получить адекватное окрашивание просто оптимизируя время обработки протеазой ISH и/или время кондиционирования клеток. Тем не менее, использование протеазы ISH Protease 3 в течение продолжительного времени может отрицательно повлиять на морфологические характеристики ядра и привести к слабому ядерному контрасту. Каждый специалист должен знать об этом и найти баланс интенсивности сигнала с морфологическими характеристиками ядра и контрастностью. Кроме того, может снижаться интенсивность окрашивания HER2 или хромосомы 17, если используется слишком агрессивная обработка протеазой.

Ухудшение морфологических характеристик ядер в связи с чрезмерным лизисом протеазой (рисунок 16) обычно вызвано недостаточной фиксацией (<6 часов). Это может привести к потере сигнала в связи с лизисом ядерного материала.

Устранение неисправностей

Слабое окрашивание или отсутствие окрашивания

Случаи, в которых полностью отсутствует или слабо проявляется окрашивание как для HER2, так и для хромосомы 17 в такой степени, что это препятствует подсчету клеточных сигналов, вероятно, указывают на проблему (проблемы) с преаналитической подготовкой образца. Следует убедиться, что используется соответствующее время фиксации, тип и толщина среза. Если ядра не повреждены, увеличивают время инкубации перед обработкой.

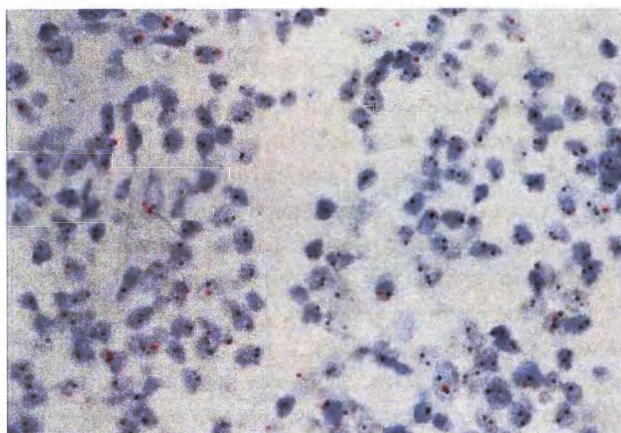
• Если препарат был окрашен соответствующим для одного зонда образом, но не для другого (например, HER2 окрашивается надлежащим образом, но хромосома 17 демонстрирует слабое окрашивание или его отсутствие), это может указывать на потенциальную проблему с реагентами, приводящую к ошибке детекции. В этом случае убеждаются, что дозаторы не засорены и что контейнеры для основного материала были заполнены соответствующим образом для обеспечения цикла. Также

убеждаются, что соблюден надлежащий процесс дегидратации, так как использование ванночки с этанолом, применение ацетона и продолжительная инкубация в ксилоле снижают интенсивность сигнала Red ISH. В случае слабых или затухающих сигналов SISH убедитесь, что для сохранения сигналов использовали совместимую гистологическую среду (см. инструкцию к применению зонда).

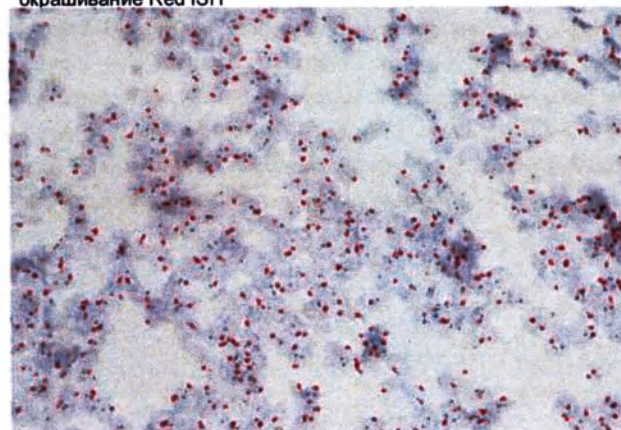
- Если вышеуказанные потенциальные причины исключены, тогда можно увеличить время некоторых изменяемых этапов протокола, например времени инкубирования с протеазой и/или времени кондиционирования клеток, так как эти действия являются самыми эффективными при слабом сигнале (рисунок 18). Более длительную по времени предварительную обработку следует использовать только в том случае, если ядра выглядят неповрежденными, а в клетках карциномы обнаруживается контрастирующее окрашивание. Если в ядрах прослеживаются сильные литические изменения, а потеря сигнала связана именно с этим, следует уменьшить время инкубирования с протеазой (например, ISH protease 3 в течение 8 или 12 минут)

Рисунок 17. Пример успешного повторного окрашивания после увеличения времени инкубации для обработки протеазой

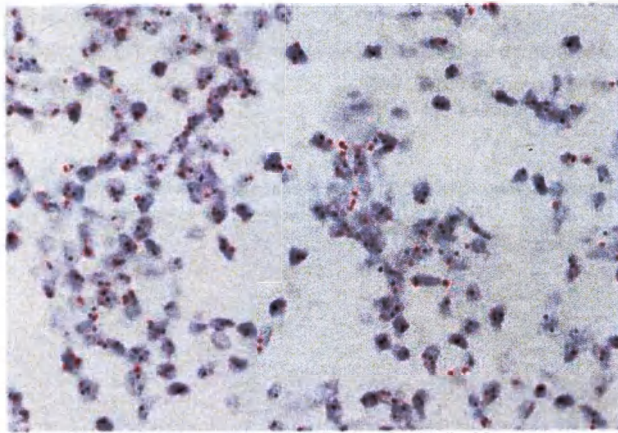
Случай 28. Карцинома молочной железы



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; неадекватное окрашивание Red ISH



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; чрезмерное время инкубирования с протеазой вызывает сильные литические изменения ядра



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; адекватное окрашивание. Увеличение времени инкубирования с протеазой «демаскирует» ДНК-мишень

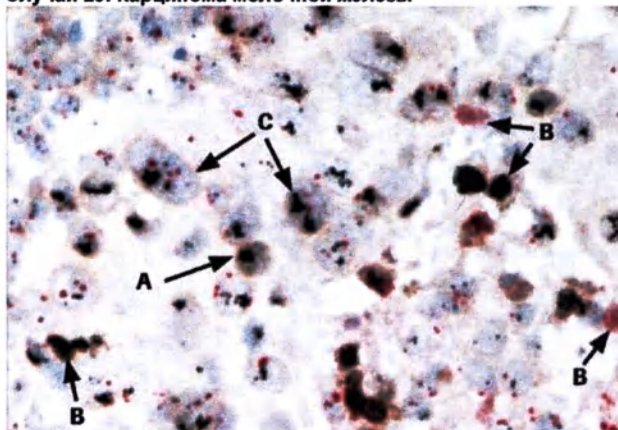
Постоянное отсутствие окрашивания структур, поддающихся подсчету, во внутренних положительных клетках

Каждый образец тканей человека содержит нормальные клетки, которые служат внутренним положительным контролем (см. раздел «Адекватность микропрепаратов»). Наличие соответствующего окрашивания в этих нормальных клетках (контроль «тот же слайд») указывает на приемлемое окрашивание. Многочисленные ошибки окрашивания, при которых наблюдается полное отсутствие окрашивания, в том числе внутри ядер клеток этого внутреннего положительного контроля, могут указывать на проблему с аппаратом или реагентом. В случаях, когда есть подозрение на проблему с аппаратом или реагентом, с целью устранения ошибок рекомендуется использовать образцы с положительным контролем или микропрепараты с ксенотрансплантатом HER2 3-in-1 Dual ISH Xenograft.

Неспецифическое и фоновое окрашивание

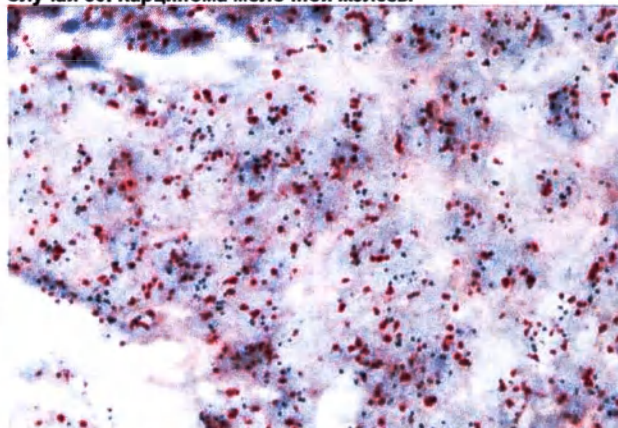
В некоторых случаях могут наблюдаться приемлемые уровни окрашивания фона Red ISH или SISH, которые не мешают подсчету специфических сигналов (рисунки 18 и 19). Тем не менее, если наблюдается чрезмерное окрашивание фона микропрепаратов, которое мешает подсчету специфических сигналов (то есть ядерная пыль или дымка), рекомендуется использовать более мягкую обработку протеазой (например, ISH Protease 3 в течение 8 или 12 минут). Если сигнал SISH сильный, и есть красный туман или дымка, и/или ядра также содержат неспецифические сигналы Red ISH, которые намного слабее по интенсивности, чем специфические сигналы Red ISH (рисунок 19), то повышение температуры до 76°C или 78°C при жесткой промывке смягчает неспецифический красный фон (красную дымку). Красная дымка особенно заметна в нижних слоях фиксированных тканей. На рисунке 19 показан умеренный или сильный уровень красного тумана или дымки в ядре или вокруг него. Есть также небольшие неспецифические красные сигналы, которые не должны быть включены в подсчет.

Рисунок 18. Пыль SISH
Случай 29. Карцинома молочной железы



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; пример ядерной пыли SISH, которая частично маскирует ядро (A). Существует множество незадействованных ядер, которые можно легко подсчитать (C). Существует также неспецифическое окрашивание некротических клеток (B) SISH и Red ISH, которое можно игнорировать.

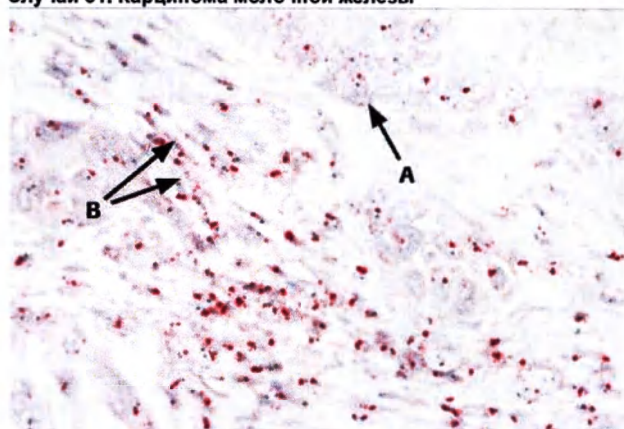
Рисунок 19. Неспецифический красный фон/красная дымка
Случай 30. Карцинома молочной железы



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; неспецифическая красная дымка/фон

На рисунке 20 показан неспецифический красный фон в виде ядерного сигнала в опухолевых клетках и в нормальных клетках. Этот сигнал выглядит светлее, чем специфический сигнал Red ISH для хромосомы 17, однако его широкое распространение мешает подсчёту специфических сигналов Red ISH. Несмотря на то, что наблюдается ядерное окрашивание, компания рекомендует выделить еще один участок для подсчета.

Рисунок 20. Неспецифический красный фон
Случай 31. Карцинома молочной железы



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; демонстрирует неспецифический красный фон в виде ядерного сигнала в опухолевых клетках (А) и в нормальных клетках (В). Этот сигнал выглядит светлее, чем специфический сигнал Red ISH для хромосомы 17, однако его широкое распространение мешает подсчёту специфических сигналов Red ISH.

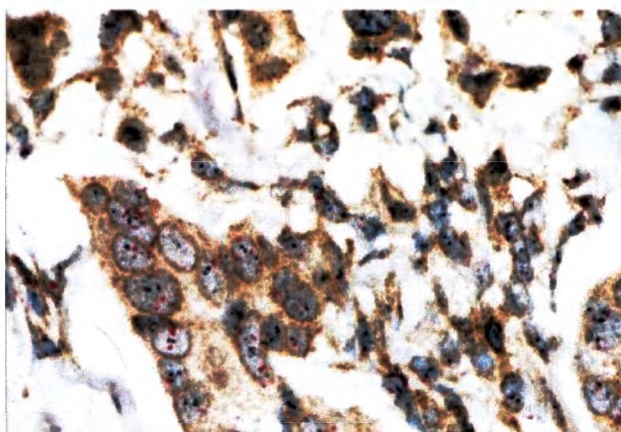
Осаждение в микропрепарате

Если на ядрах или вокруг них наблюдаются участки с сильным коричневым или черным осадком, компания рекомендует выделить еще один участок для подсчета или провести окрашивание второго микропрепарата (рисунок 21). Некоторый артефакт осаждения осаждения может быть результатом неправильного размещения метки на микропрепарате. Штрих-код метки должен наноситься без выступа на краю предметного стекла. Следует избегать двойной маркировки или повторного нанесения метки на предметное стекло. Убедитесь, что прибор и

дозаторы функционируют правильно и что заполнение основными реагентами проведено надлежащим образом. Также убедитесь, что дозаторы хранятся с надетыми крышками, так как известно, что ацетат серебра со временем окисляется. В качестве дальнейшего руководства: информация, находящаяся в таблице 2, помогает устранить некоторые ошибки, описанные выше. Для получения дополнительной информации см. раздел «Пошаговая процедура» в руководстве по эксплуатации прибора или обратитесь к местному представителю.

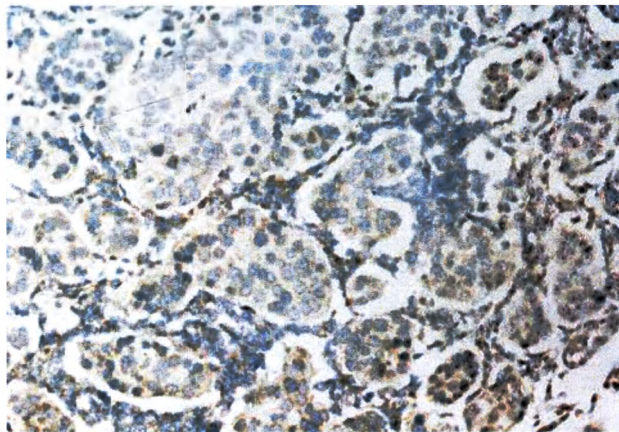
Рисунок 21. Осаждение

Случай 32a. Карцинома молочной железы



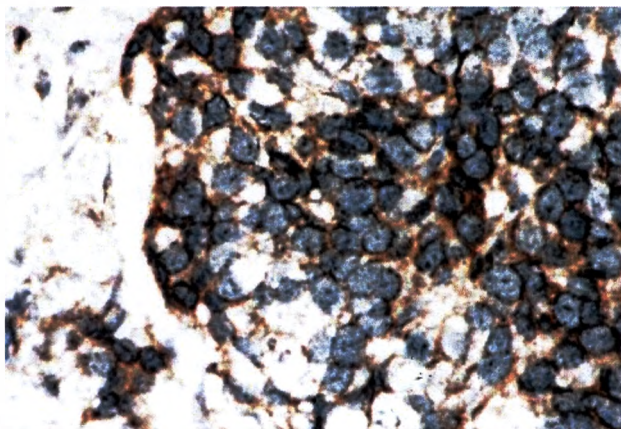
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; умеренная осаждение вокруг ядер

Случай 32b. Карцинома молочной железы



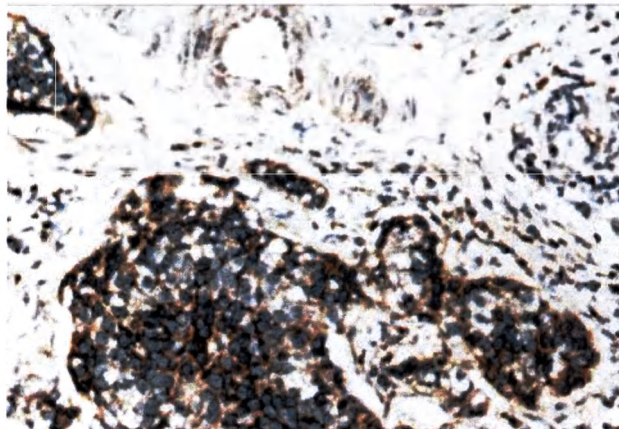
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 20x; зона без окрашивания прилегает к зоне осаждения

Случай 33a. Карцинома молочной железы



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; сильная преципитация вокруг ядра

Случай 33b. Карцинома молочной железы



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 20x; осадок на большей части микропрепарата

Таблица 2. Описание неоптимального окрашивания и предлагаемые меры снижения негативных последствий при анализе

Если встречается слабое окрашивание или его отсутствие	Изменение (-ия) процедуры для достижения желаемого окрашивания
Отсутствие или слабый SISH сигнал	1. Убедитесь, что дозаторы реагентов функционируют должным образом (т. е. не засорены или не опорожнены) и заполнены основным раствором. Проверьте заливочную камеру дозатора реагентов или мениск на наличие посторонних материалов или твердых частиц, таких как волокна или осадок. Если подача жидкости дозатором не осуществляется, не используйте дозатор и обратитесь к региональному представителю службы поддержки. Также можно повторно заправить дозатор. Его следует направить в контейнер для отходов, снять колпачок наконечника и нажать на верхнюю часть дозатора. Если окрашивание все еще слабое или отсутствует, перейдите к пункту 2 ниже. 2. Убедитесь, что тип фиксации, время и толщина среза подходят для анализов на основе ISH. 3. Убедитесь, что для сохранения сигнала SISH используются SISH-совместимые гистологические среды. Если окрашивание все еще слабое или отсутствует, перейдите к пункту 4 ниже. 4. Увеличьте время CC1 до > 16 мин. 5. Увеличьте время CC2 до > 16 мин для тканей карциномы желудка или до > 24 мин для тканей карциномы молочной железы. 6. Увеличьте время ISH Protease 3 до > 16 мин для тканей карциномы желудка или > 20 мин для тканей карциномы молочной железы, в случае если морфология ядра не нарушена.
Отсутствие или слабый красный сигнал	1. Убедитесь, что дозаторы реагентов функционируют должным образом (т. е. не засорены или не опорожнены) и заполнены основным раствором. Если окрашивание все еще слабое или отсутствует, перейдите к пункту 2 ниже. 2. Убедитесь, что спиртовые ванны и расширенные ксилоловые промывки не используются для обезживания окрашенных предметных стекол, так как это ухудшит качество красных сигналов ISH. Если окрашивание все еще слабое или отсутствует, перейдите к пункту 3 ниже. 3. Убедитесь, что тип фиксации, время и толщина среза подходят для анализов на основе ISH. 4. Увеличьте время CC1 до > 16 мин. 5. Увеличьте время CC2 до > 16 мин для тканей карциномы желудка или до > 24 мин для тканей карциномы молочной железы. 6. Увеличьте время ISH Protease 3 до > 16 мин для тканей карциномы желудка или > 20 мин для тканей карциномы молочной железы, в случае если морфология ядра не нарушена.
Если присутствует фоновое окрашивание	Изменение (-ия) процедуры для достижения желаемого окрашивания
Неспецифическое красное ISH фоновое окрашивание	1. Убедитесь, что используются положительно заряженные предметные стекла, образец зафиксирован и разделен соответствующим образом для анализов на основе ISH. 2. Если красное ISH фоновое окрашивание различимо для специфического красного ISH-сигнала, произведите подсчет, но не считайте неспецифические красные ISH-сигналы. 3. Если красное ISH фоновое окрашивание в ядре мешает подсчету, повторите окрашивание, используя температуру жесткой промывки 76 °C или 78 °C. Уменьшение времени кондиционирования клеток и экспозиции с протеазой также смягчает красный фон.
Неспецифическое фоновое окрашивание SISH	1. Убедитесь, что используются положительно заряженные предметные стекла, образец зафиксирован и разделен соответствующим образом для анализов на основе ISH. 2. Если фоновое окрашивание SISH различимо для специфического SISH сигнала, произведите подсчет, но не считайте неспецифические SISH сигналы. 3. Если фоновое окрашивание SISH в ядре мешает подсчету, повторите окрашивание с уменьшением времени кондиционирования клеток или экспозиции с протеазой.
Осадок	1. Если артефакт в виде осадка мешает подсчету, то повторите окрашивание. Если фоновое окрашивание SISH различимо для специфического SISH сигнала, произведите подсчет, но не считайте неспецифические SISH сигналы. 2. Убедитесь, что штрихкод на предметном стекле расположен по центру и нанесен на предметное стекло без нависания. Не дублируйте и не наносите повторно штрихкоды.
Пузырьки	Если образование пузырьков мешает подсчету, убедитесь, что предварительные аналитические процедуры и толщина образца соответствуют рекомендациям.

Таблица 3. Модификация выбираемых этапов процедуры окрашивания программного обеспечения и ее влияние на анализ

Выбираемый этап процедуры	Диапазон выбираемых этапов процедуры окрашивания программного обеспечения	Влияние манипулирования выбором
Прогрев	Проверено/не проверено	Прогрев может помочь свежесрезанной ткани прилипнуть к предметному стеклу.
Кондиционирование клеток 1,	16 – 40 мин	Увеличение интенсивности сигнала при окрашивании SISH и Red ISH при увеличении времени, Уменьшение интенсивности сигнала при уменьшении времени
Кондиционирование клеток 2,	16 – 40 мин	Увеличение интенсивности сигнала при окрашивании SISH и Red ISH при увеличении времени, Уменьшение интенсивности сигнала при
ISH-протеаза 3	8 – 24 мин	Увеличение интенсивности окрашивания сигнала SISH и Red ISH с увеличением времени, но может повлиять на морфологические характеристики, снижение интенсивности фона и сигнала с уменьшением времени
Температура жесткой промывки	72°C – 78°C	Снижение интенсивности неспецифических сигналов Red ISH при 76°C и 78°C

Затухание сигнала SISH

Окисление (обозначается изменением цвета с черного на оранжевый), затухание и/или исчезновение сигналов SISH может быть связано с использованием гистологических сред определенных марок. Известно, что вызывают окисление следующие гистологические среды: EUKITT (EMS), Entellan (Merck), Entellan NEW (Merck), HSR (Sysmex) и Malinol (Muto Chemical). См. инструкцию по применению зонда для ознакомления с совместимостью гистологической среды. Если используемая гистологическая среда не включена в этот список, то перед использованием в образцах пациентов рекомендуется проверить совместимость среды с обнаружением SISH. Внутренние исследования показали, что затухание сигналов SISH обычно происходит в течение от нескольких часов до одной недели.

Слабое окрашивание или отсутствие контраста

Для случаев, в которых отсутствует или проявляется слабое ядерное контрастирование (что затрудняет распознавание границ ядер), повторяют окрашивание нового микропрепарата и используют более мягкую предварительную обработку (то есть протеазу ISH Protease 3 в течение 8 или 12 минут или меньшее время кондиционирования клеток). Слабое контрастное окрашивание может указывать на то, что образец не был

подготовлен в соответствии с рекомендациями (то есть чрезмерный лизис в связи с недостаточной фиксацией). Также см. раздел «Преаналитические аспекты» для получения дополнительной информации о балансе между морфологическими характеристиками ядра и интенсивностью сигнала.

Пузырчатость ядра

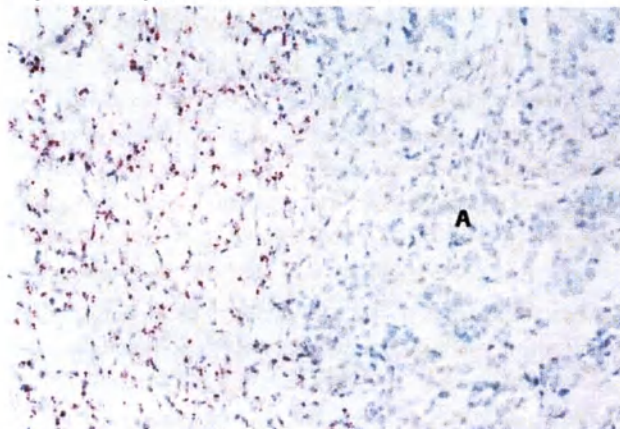
Как упомянуто в преаналитическом разделе, некоторые ядра могут выглядеть «пузырчатыми». Это может происходить на относительно низких уровнях во многих различных случаях и, как правило, происходит из-за избытка парафина в ткани и/или различий в проведении предварительных аналитических обработок, и не влияет на подсчет. В более толстых срезах (> 6 мкм) может наблюдаться большая частота пузырчатых ядер.

Слабо окрашенные или неокрашенные участки

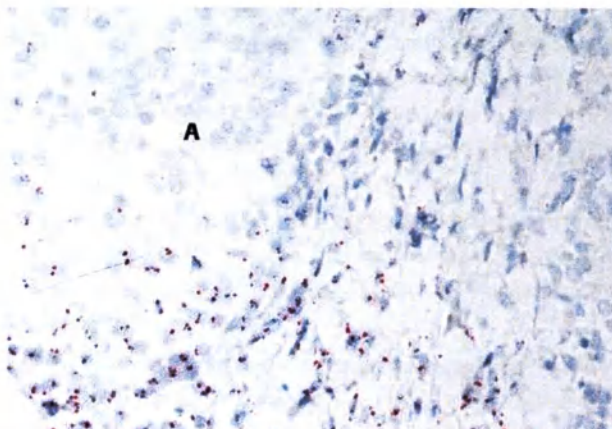
В некоторых случаях на микропрепарате могут появиться участки со слабым окрашиванием или без окрашивания. Если участок мал и присутствуют другие хорошо окрашенные зоны микропрепарата, проводят подсчет в этих зонах (рисунок 22).

Рисунок 22.

Случай 35. Карцинома молочной железы



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 20x; зона без окрашивания (A). Могут присутствовать другие хорошо окрашенные



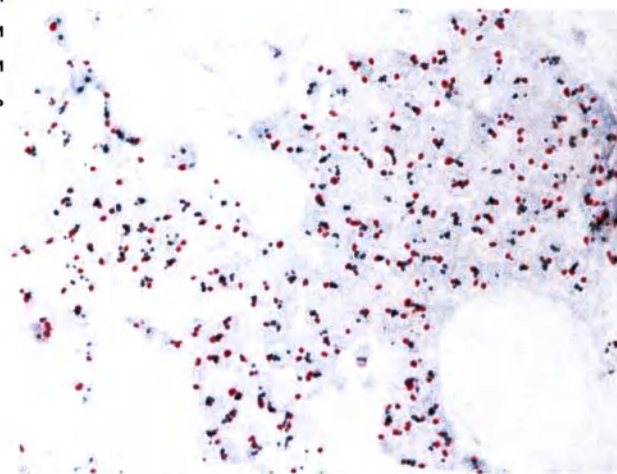
окрашивания (A). Могут присутствовать другие хорошо окрашенные зоны микропрепарата, и там необходимо производить подсчет.

Перекрывающийся сигнал

Как указано в таблице 1, некоторые сигналы могут быть сильными и перекрываться. Сигнал Red ISH может быть особенно сильным и перекрываться, что делает сигналы хромосомы 17 неразличимыми и затрудняет подсчет (рисунок 23). Подсчет должен быть сосредоточен на ядрах с дискретными сигналами хромосомы 17.

Рисунок 23.

Случай 36. Карцинома молочной железы



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; сильные, иногда перекрывающиеся сигналы Red ISH. Подсчитывают ядра с дискретными сигналами хромосомы 17.

Ссылки

1. Вольфф А. К., Хаммонд М.Э., Эллисон К. Х. и соавт. Исследование рецептора 2 эпидермального фактора роста человека при раке молочной железы: ориентированное на обновление руководство по клинической практике Американского общества клинической онкологии/Колледжа американских специалистов по лабораторной диагностике. Arch Pathol Lab Med. 2018;142: 1364-1382.
2. Бартли А. Н., Вашингтон М. К., Коласакко К. и соавт. Исследование HER2 и принятие клинических решений при гастрозофагеальной аденокарциноме: руководство Колледжа американских специалистов по лабораторной диагностике Американского общества клинической патологии и Американского общества клинической онкологии. J Clin Oncol. 2016; 35: 446-464.
3. Мидлтон Л. П., Прайс К. М., Пуиг П. и соавт. Внедрение рекомендации Американского общества клинической онкологии/Колледжа американских специалистов по лабораторной диагностике, касающейся определения HER2, в учреждения третичной помощи повышает уровень согласованности иммуногистохимического обнаружения и флуоресцентной гибридизации *in situ* HER2 и снижает число необусловленных случаев. Arch Pathol Lab Med. 2009;133(5):775-780.
4. Кури Т., Саит С., Хван Н, Чандрасекара Р. и соавт. Влияние задержки фиксации формалином на биомаркеры молочной железы. Mod Pathol. 2009;22(11):1457-1467.
5. Сламон Д. Дж., Кларк Г. М., Вонг С. Г. и соавт. Рак молочной железы человека: корреляция рецидива и выживаемости при амплификации онкогена HER-2/*neu*. Science. 1987;235(4785):177-182.
6. Нарита М., Накао К., Огино Н., Накахама М. и соавт. Независимые прогностические факторы у больных раком молочной железы. Am J Surg. 1998;175(1):73-75.
7. О'Рейли С. М., Барнс Д. М., Кемплджен Р. С. и соавт. Взаимосвязь между экспрессией c-erbB-2, долей S-фазы и прогнозом при раке молочной железы. Br J Cancer. 1991;63(3):444-446.
8. Пеграм М. Д., Финн Р. С., Арзоо К. и соавт. Влияние сверхэкспрессии HER-2/*neu* на химиотерапевтическую лекарственную чувствительность клеток рака молочной железы и яичников человека. Oncogene. 1997;15(5):537-547.
9. Пресс М. Ф., Пайк М. Кю, Чазин В.Р. и соавт. Экспрессия Her-2/*neu* при раке молочной железы без поражения лимфатических узлов: прямое количественное определение ткани с помощью компьютерного анализа изображений и связь гиперэкспрессии с повышенным риском рецидива заболевания. Cancer Res. 1993;53(20):4960-4970.
10. Пресс М. Ф., Бернштейн Л., Томас П. А. и соавт. Амплификация гена HER-2/*neu*, характеризующаяся флуоресцентной гибридизацией *in situ*: плохой прогноз при раке молочной железы без поражения лимфатических узлов. J Clin Oncol. 1997;15(8):2894-2904.
11. Густерсон Б. А., Гельбер Р. Д., Гольдхирш А. и соавт. Прогностическая значимость экспрессии c-erbB-2 при раке молочной железы. Международная (Людвиг) исследовательская группа по раку молочной железы. J Clin Oncol. 1992;10(7):1049-1056.
12. Хофманн М., Стосс О., Ши Д. и соавт. Анализ системы подсчета HER2 для карциномы желудка: результаты валидационного исследования. Histopathology. 2008;52(7):797-805.
13. Трокселл М. Л., Банг К. Д., Лоуце Х. Дж. и соавт. Оценка статуса Her-2/*neu* в карциномах с амплифицированным центромерным локусом хромосомы 17. Am J Clin Pathol. 2006;126(5):709-716.
14. Рейнхольц М. М., Брузек А. К., Висшер Д. В. и соавт. Рак молочной железы и аневзомия 17: последствия для канцерогенеза и терапевтический ответ. Lancet Oncol. 2009;10(3):267-277.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail для карциномы молочной
железы и карциномы желудка



Рош Диагностика ГмбХ (Roche Diagnostics GmbH)
Сандхофер Штрассе 116, D-68305 Маннхайм,
Германия (Sandhofer Strasse 116 DE-68305 Mannheim
Germany)



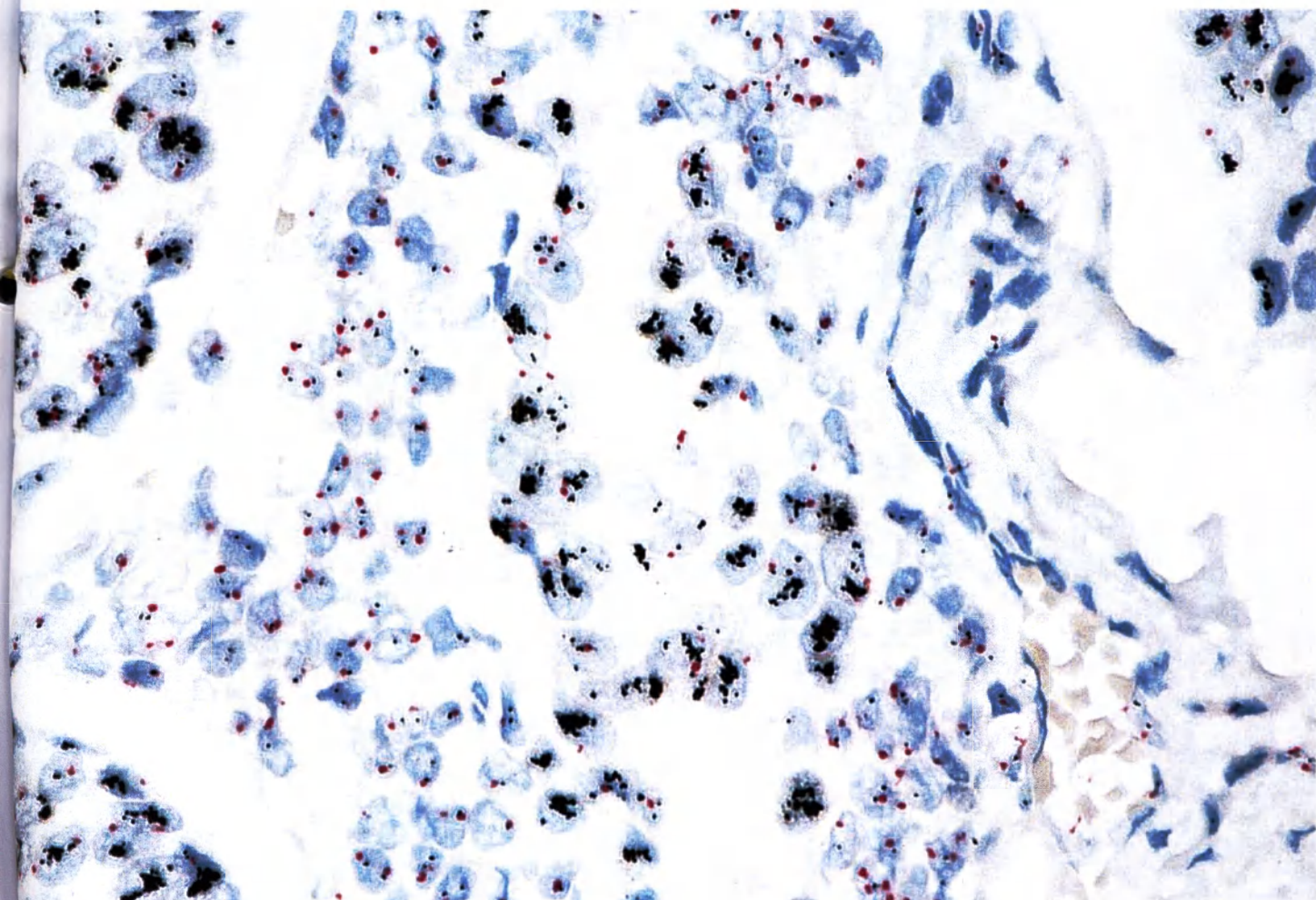
www.roche.com
www.ventana.com

© 2019 «Вентана Медикал Системс, Инк» (Ventana Medical Systems, Inc.) и «Рош Диагностика Интернейшнл, Инк. (Roche Diagnostics International, Inc.) Все права защищены.

VENTANA, BENCHMARK и логотип VENTANA являются торговыми марками компании «Рош». Все другие товарные марки являются собственностью соответствующих правообладателей.

1018386EN Ред. А

2019-03-31



[Перевод с английского языка на русский язык]

[Перевод надписей, штампов и нотариального заверения на документе «Руководство по интерпретации карциномы молочной железы и карциномы желудка на медицинское изделие „Набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit для определения DIG-меченых целевых участков нуклеиновых кислот при помощи красного хромогена методом гибридизации in situ (ISH) для диагностики in vitro на иммуноштейнерах автоматических серии BenchMark, производства «Ventana Medical Systems, Inc.», 1910 East Innovation Park Drive, Tucson, AZ 85755 USA (при применении совместно с VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, производства «Roche Diagnostics GmbH», Germany“», представленном на русском и английском языках.]

[Логотип компании «Вентана»]

[Логотип компании «Рош»]

Вер. 1.0

производства

«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).

производства

«Рош Диагностикс ГмбХ», Германия («Roche Diagnostics GmbH», Germany)

АДРЕС МЕСТА ПРОИЗВОДСТВА МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

«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).

Одобрено компанией «Вентана Медикал Системс, Инк.» (Ventana Medical Systems, Inc.)

/подпись/

Кэти Ким (Kathy Kim)

Специалист отдела нормативно-правового регулирования

13 января 2021 г.

Дата

[Штамп:

«Вентана Медикал Системс, Инк»

(Ventana Medical Systems, Inc)

1910 Е Инновейшн Парк Др

Тусон, Аризона 85755

(1910 E Innovation Park Dr

Tucson, AZ 85755)

(520) 887-2155]

[Штамп:

Штат Аризона, Округ Пима

Сегодня, 13 января 2021 г., ко мне лично явилась Кэти Ким (Kathy Kim) и на основании убедительных доказательств подтвердила, что является лицом, чье имя указано в качестве подписавшего лица в документе, а также подтвердила, что она подписала вышеприведенный/прилагаемый документ.

/подпись/

Нотариус]

[Штамп:

Селина Блуин Бибер (Celina Blouin Bieber)

Нотариус — штат Аризона

Округ Пима

Лицензия № 526689

Моя лицензия действительна до 29 апреля 2021 г.]

2021 г.

Перевела Громова Александра Дмитриевна

Российская Федерация

Город Москва

Одиннадцатого февраля две тысячи двадцать первого года

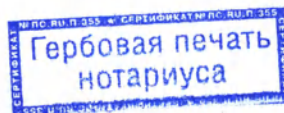
Я, Степанова Мария Михайловна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Король Викторией Алексеевны, свидетельствую подлинность подписи переводчика Громовой Александры Дмитриевны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: №08/82-н/77-2021- 8 - 985

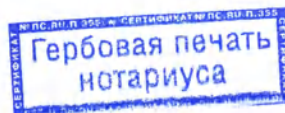
Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.



М.М. Степанова

Прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью 42 лист(-а.-ов)

М.М. Степанова



Российская Федерация
Город Москва

Одиннадцатого февраля две тысячи двадцать первого года

Я, Степанова Мария Михайловна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Король Виктории Алексеевны, свидетельствую верность копии с представленного мне документа.

Зарегистрировано в реестре: N 08/82-н/77- 2021-

Уплачено за совершение нотариального действия: 2580 руб.

М.М. Степанова



Всего прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 43 лист(-а,-ов)

