



SEELER & DR. FELLMETH

NOTARE

КОПИЯ

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

### Beglaubigte Ablichtung

Die Übereinstimmung nachstehender Fotokopie mit dem Original wird hiermit beglaubigt.

Mannheim, den 15.01.2021

Rolf Glenz

Notarvertreter des Notars

Dr. Stefan Fellmeth



**РУКОВОДСТВО ПО ИНТЕРПРЕТАЦИИ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И  
КАРЦИНОМЫ ЖЕЛУДКА**

**(INTERPRETATION GUIDE)**

**НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

**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 производства Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany**

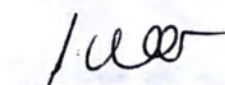
**РАЗРАБОТЧИК**

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

**Approved by**

**Roche Diagnostics GmbH**

**Date: 14 January 2021**



**Andrea Weber**  
**Manager Global Regulatory Affairs**

**Stamp Roche Diagnostics GmbH**  
Sandhofer Straße 116  
68305 Mannheim

**2021**

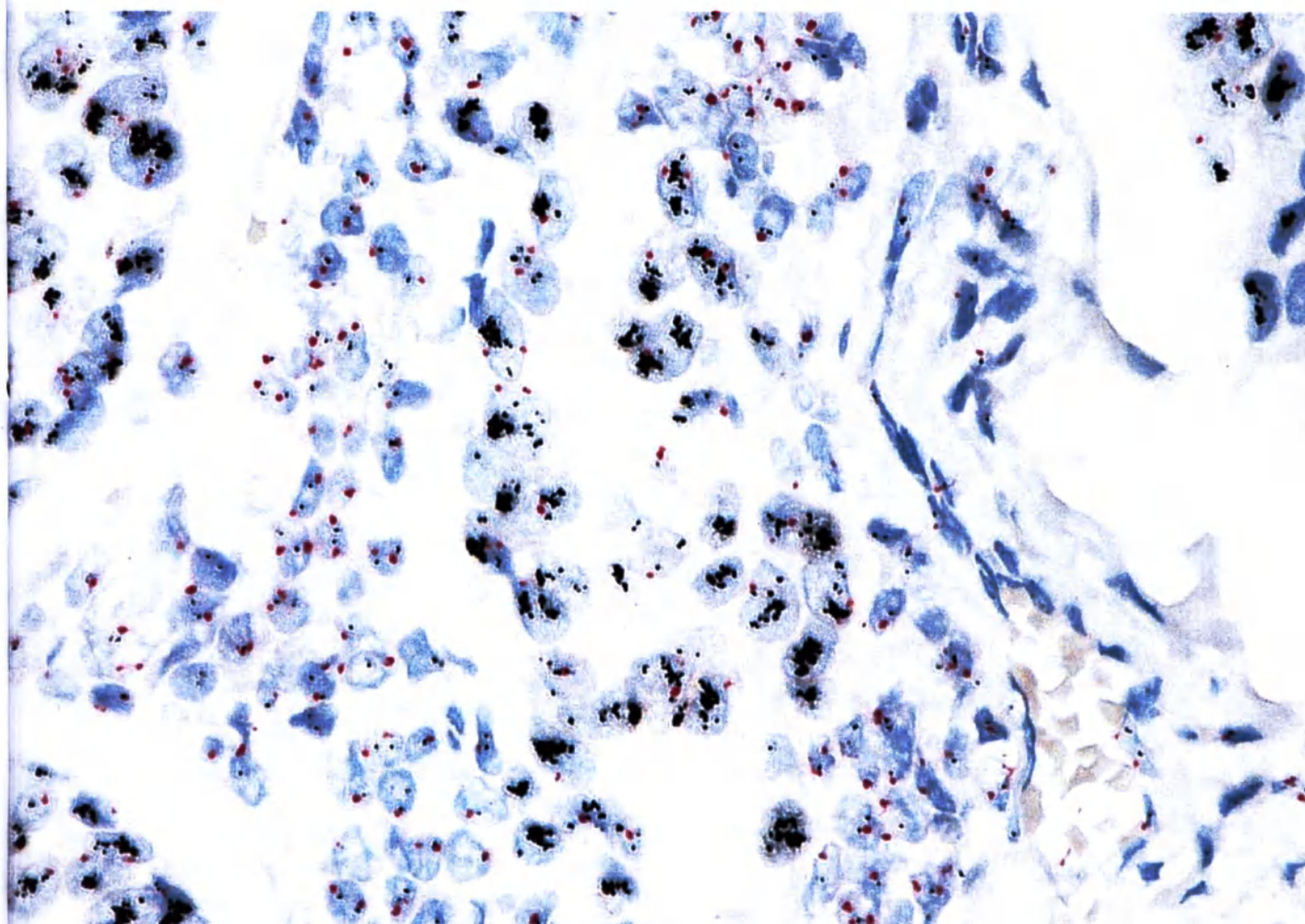
Roche Diagnostics GmbH; Sandhofer Strasse 116; D-68305 Mannheim; Telefon +49-621-759-0; Telefax +49-621-759-2890

Sitz der Gesellschaft: Mannheim - Registergericht: AG Mannheim HRB 3962 - Geschäftsführung: Claus Haberda; Andreas Schmitz -  
Aufsichtsratsvorsitzender: Dr. Thomas Schinecker



# VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

*Руководство по интерпретации карциномы  
молочной железы и карциномы желудка*



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

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



## Содержание

|                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Введение</b>                                                                                      | <b>1</b>  |
| 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         |
| <b>Идентификация соответствующей картины окрашивания</b>                                             | <b>4</b>  |
| Статус гена HER2                                                                                     | 4         |
| Адекватность микропрепаратов                                                                         | 9         |
| Визуализация сигналов и подсчет                                                                      | 12        |
| Оценка микропрепаратов                                                                               | 15        |
| <b>Примеры картин окрашивания HER2 и хромосомы 17 в клинических случаях</b>                          | <b>17</b> |
| Часто встречающиеся картины окрашивания                                                              | 17        |
| Дополнительные наблюдения                                                                            | 18        |
| Аневзомия хромосомы 17                                                                               | 20        |
| Амплификация перицентромерной области хромосомы 17                                                   | 21        |
| <b>Контроль качества окрашивания при гибридизации in situ (ISH)</b>                                  | <b>22</b> |
| В каждом препарате присутствуют ядра клеток положительного контроля                                  | 22        |
| Микропрепараты ксенотрансплантата HER2 Dual ISH 3-в-1                                                | 22        |
| <b>Преаналитические аспекты</b>                                                                      | <b>24</b> |
| Фиксация                                                                                             | 24        |
| Толщина образца                                                                                      | 25        |
| Другие факторы                                                                                       | 26        |
| <b>Устранение неисправностей</b>                                                                     | <b>27</b> |
| <b>Ссылки</b>                                                                                        | <b>34</b> |



## 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 гастрозофагеальный 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.<sup>1-2</sup> 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» фиксацию<sup>3</sup>, а также значительное время, прошедшее от момента забора ткани до фиксации.<sup>4</sup> Несмотря на то, что строгое соблюдение условий фиксации является вполне реализуемым<sup>3</sup>, 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

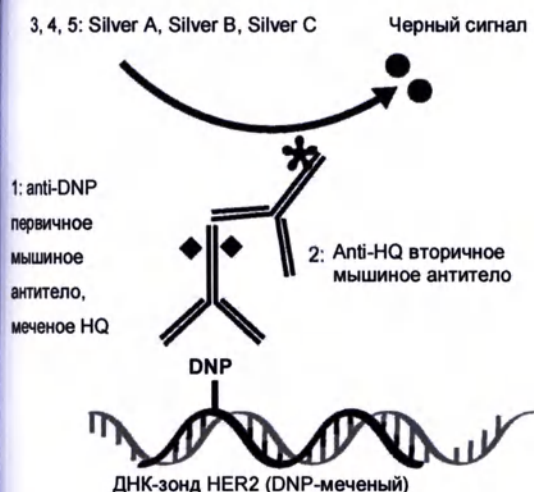
### Статус гена HER2

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.<sup>5–9</sup> 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.<sup>10–11</sup> Кроме того, исследования показали, что избыточная экспрессия HER2 отмечается в 24% случаев карциномы желудка.<sup>12</sup> 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, меченным динитрофенолом (DNP), а последующую визуализацию обеспечивают использованием набора для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit (рисунок 1A). Центромёру 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



динитрогенином (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.<sup>1</sup> 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

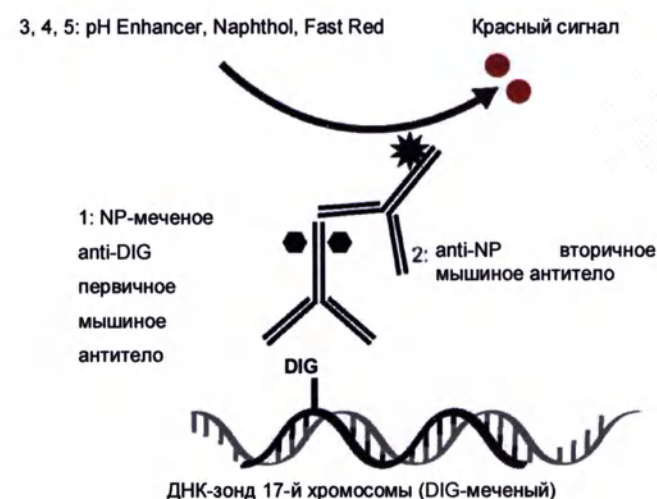
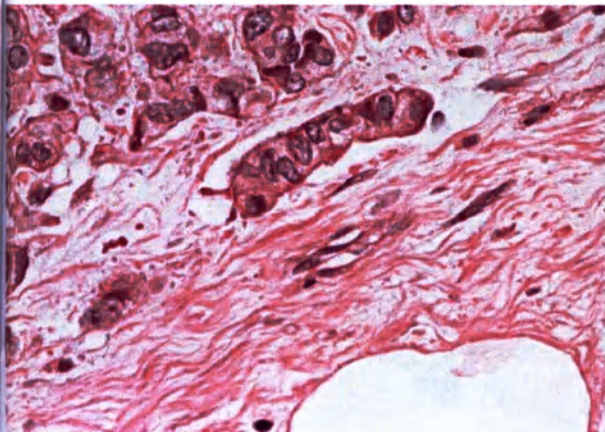


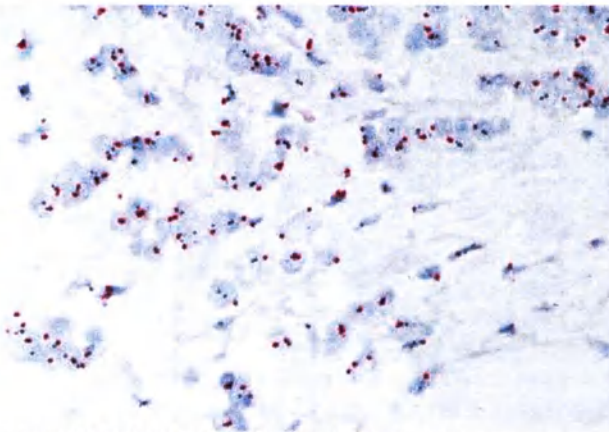


Рисунок 2. Статус гена HER2: типичные случаи карциномы молочной железы и карциномы желудка

Случай 1. Карцинома молочной железы: без амплификации HER2

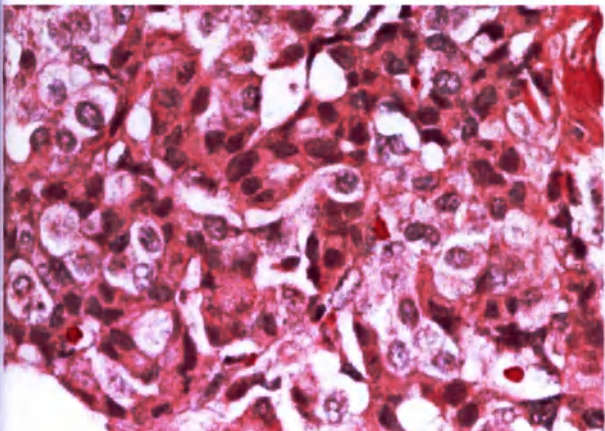


H&E 60x

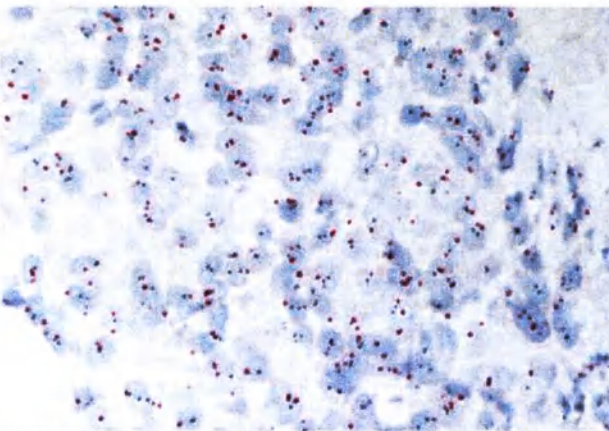


VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; видны отчетливые сигналы SISH и Red ISH видны как 1-2 копии в каждой опухолевой клетке

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



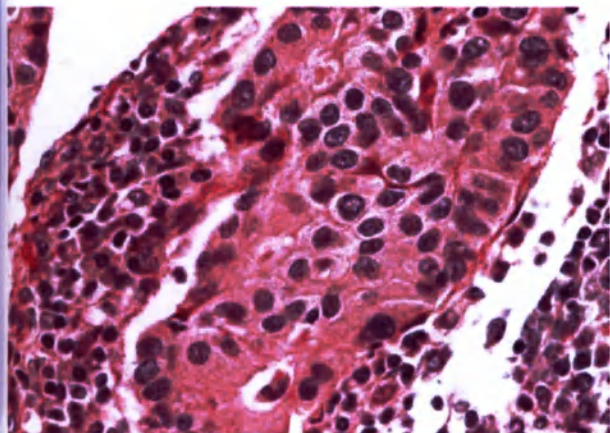
H&E 60x



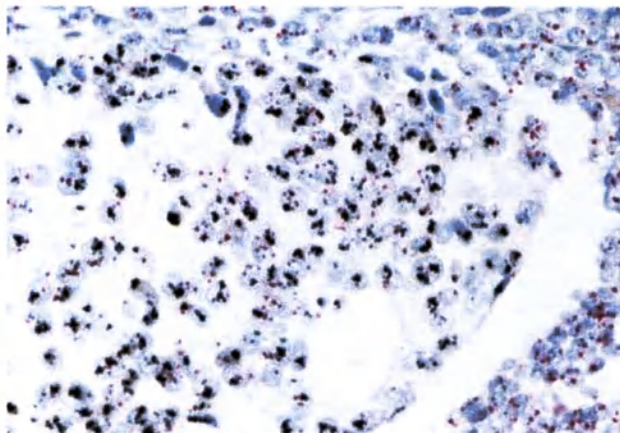
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; в некоторых опухолевых клетках присутствует более 2 сигналов SISH и Red ISH



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

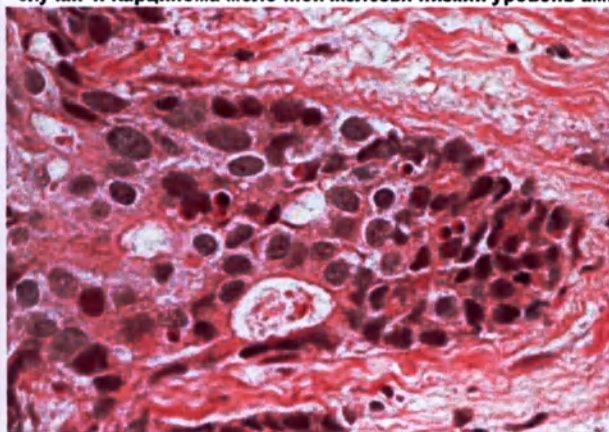


H&E 60x

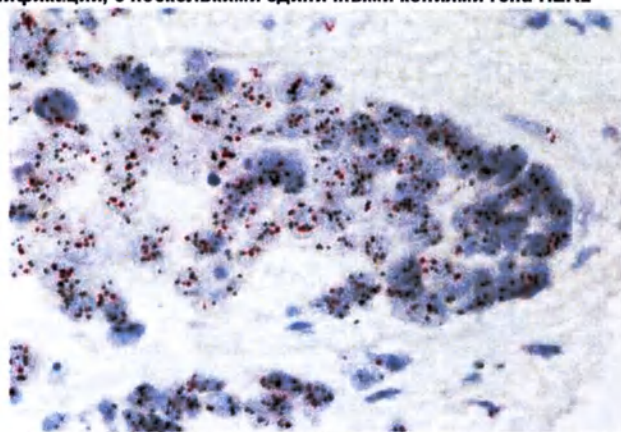


VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; присутствуют и оцениваются специалистом кластеры *HER2* SISH. Присутствуют 1-2 копии сигнала Red ISH хромосомы 17.

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



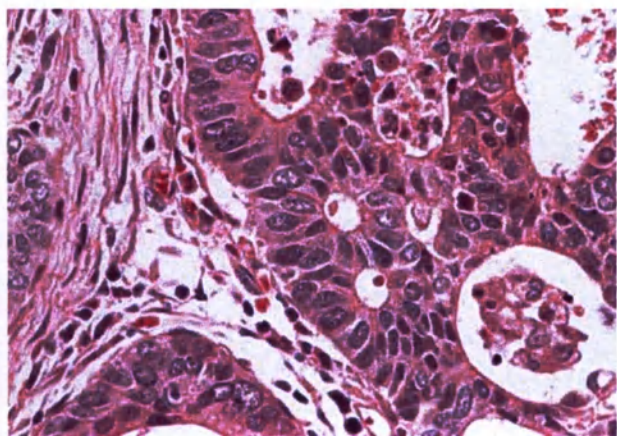
H&E 60x



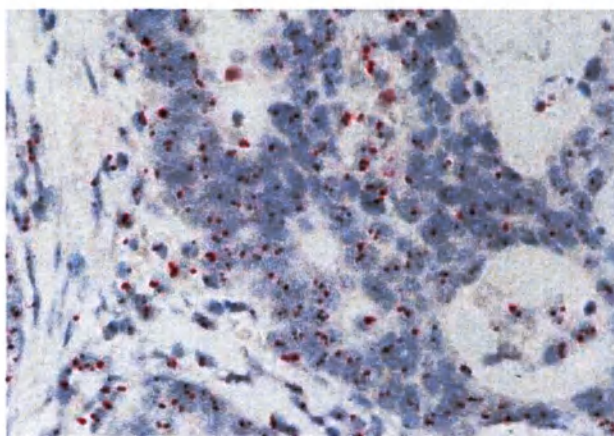
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; имеется более 6 копий *HER2*, но в среднем всего 1-2 копии хромосомы 17. Этот случай с низким уровнем амплификации.



**Случай 5. Карцинома желудка: без амплификации**

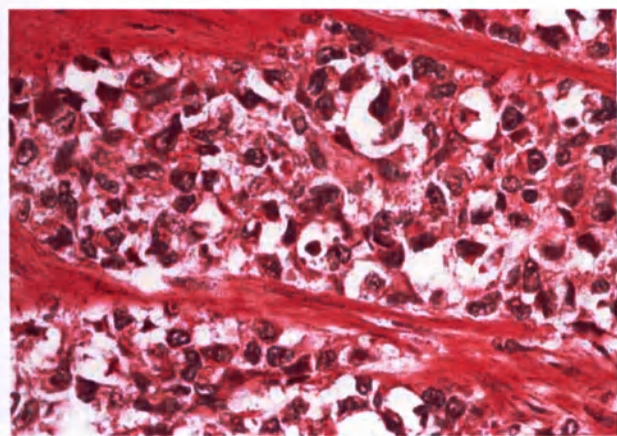


H&E 60x

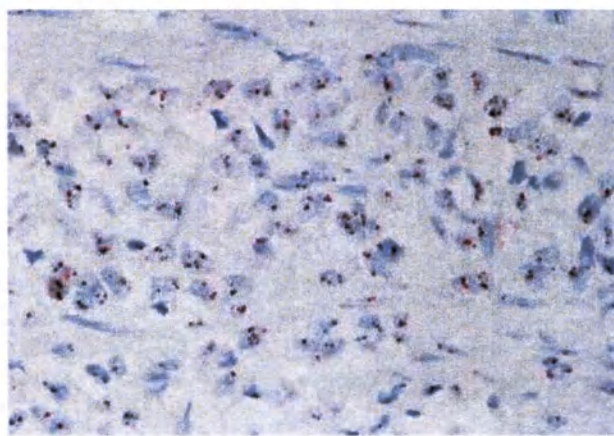


VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; видны отчетливые SISH и Red ISH сигналы видны в качестве 1-2 копий в каждой опухолевой клетке.

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

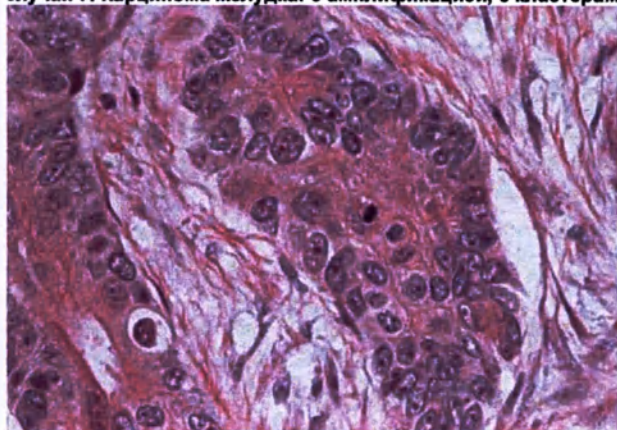


H&E 60x

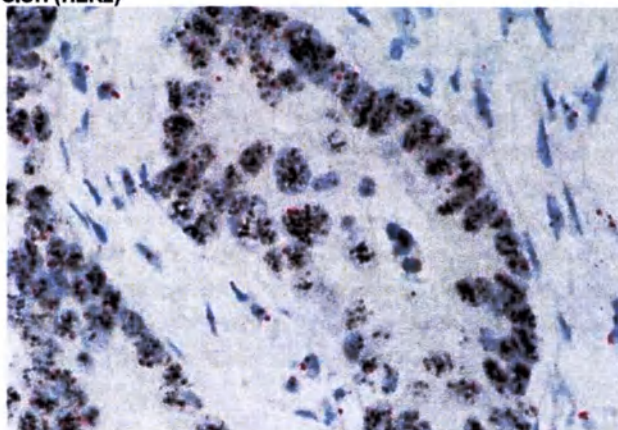


VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; в некоторых клетках присутствует более 2 копий HER2 и хромосомы 17.

**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 рассечением 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.

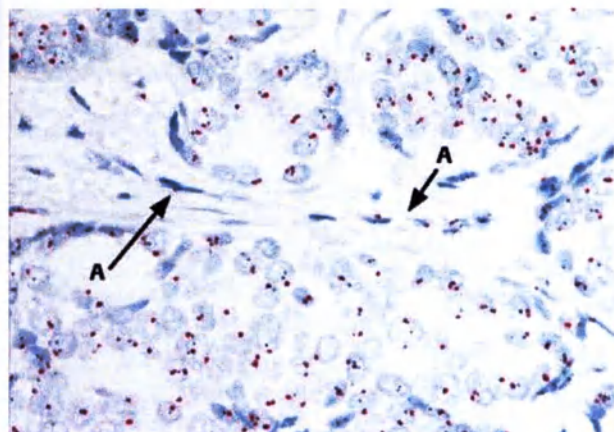
На рисунке 5 показан случай, который является неадекватным в связи с отсутствием окрашивания в ядрах клеток положительного контроля. Следовательно, для этого случая невозможно проведение подсчета, и он должен быть повторно исследован.

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



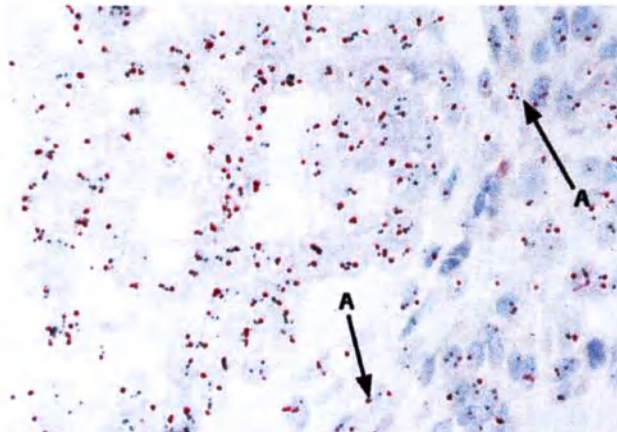
Рисунок 3. Адекватное окрашивание ядер клеток внутреннего положительного контроля.

Случай 8. Карцинома молочной железы: без амплификации



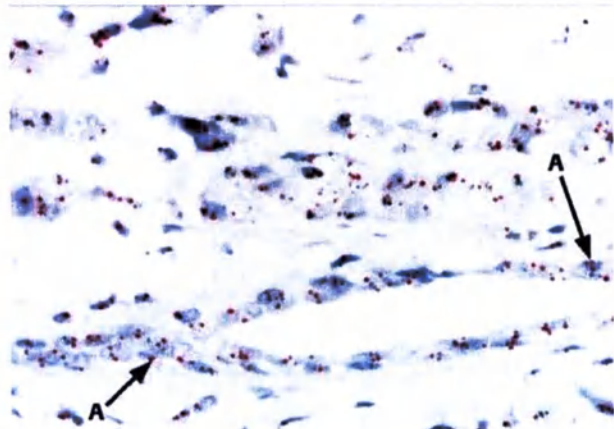
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; без амплификации HER2. A: ядра клеток внутреннего положительного контроля

Случай 9. Карцинома молочной железы: множественные копии HER2



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

Случай 10. Карцинома молочной железы: с амплификацией

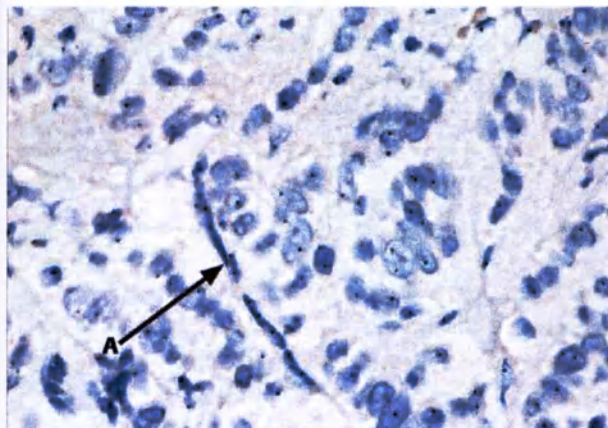


VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; HER2 с амплификацией кластеров SISH.

A: ядра клеток внутреннего положительного контроля

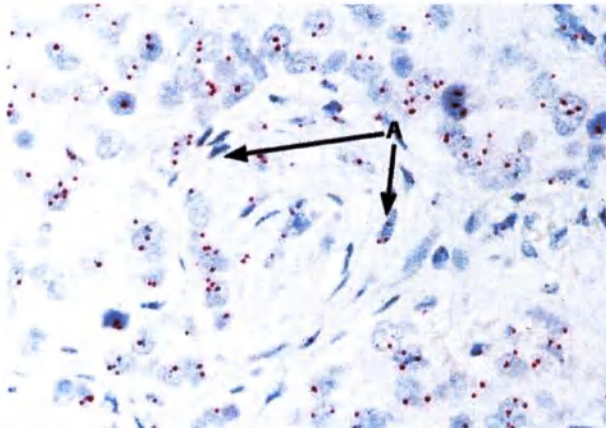
**Рисунок 4. Неадекватные образцы в связи с отсутствием окрашивания SISH или Red ISH**

**Случай 11. Карцинома молочной железы: неадекватное окрашивание Red ISH**



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

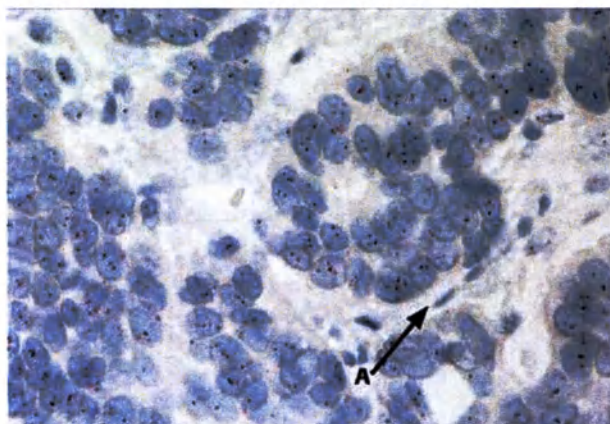
**Случай 12. Карцинома молочной железы: неадекватное окрашивание SISH**



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/фибробlastов 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.

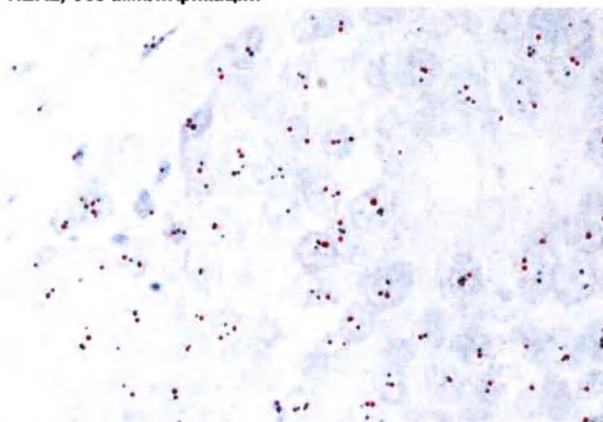
### Множественные копии

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.

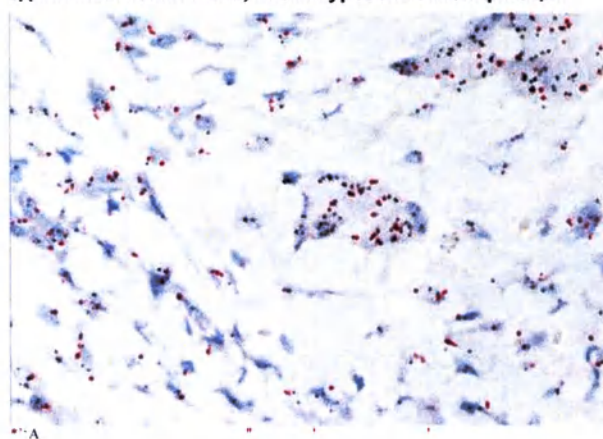
### Рисунок 6. Визуализация сигналов

**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**



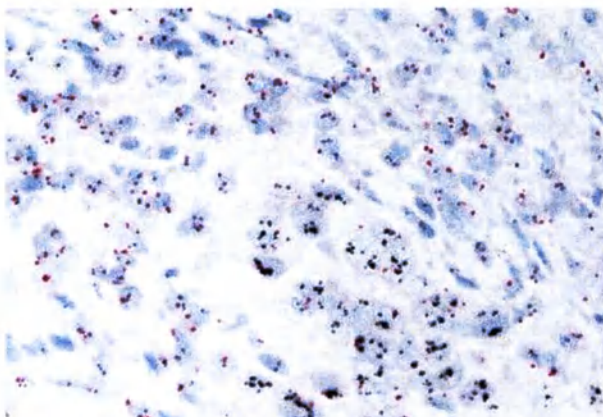
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60х; множественные единичные копии HER2, низкий уровень амплификации



### Кластеры

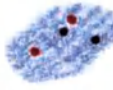
Кластер определяют, как многочисленные перекрывающиеся сигналы SISH в ядрах, которые нельзя различить по отдельности. Поскольку их трудно точно подсчитать, количество копий гена HER2 в кластере можно только оценить. Например, небольшой кластер может считаться как содержащий 6 сигналов, а более крупные 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

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p>Не считать, если наблюдается наложение ядер.</p>                                                                                                                                                                                                   |  <p>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.</p>                                 |
|  <p>Не считать, если сигнал отсутствует.</p>                                                                                                                                                                                                           |  <p>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.</p>                                                                                                                                                                             |
|  <p>Не считать, если присутствуют сигналы только одного цвета.</p>                                                                                                                                                                                     |  <p>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.</p>                                                           |
|  <p>Не считать, если сигналы расположены вне ядер.</p>                                                                                                                                                                                               |  <p>Кластер черных точек затемняет красный (-е) сигнал (-ы). Большее увеличение (×60) может использоваться при попытке подтвердить наличие или отсутствие красного сигнала (-ов); в противном случае не учитывайте эти сигналы: всегда учитывайте ядра с только четкими красными сигналами. Отметьте наличие SISH-кластеров в оценочном листе. В ядрах с SISH-кластерами должны засчитываться ядра с видимыми и более многочисленными красными сигналами.</p> |
|  <p>Считать как 1 черный (HER2) и 1 красный (Chr17) сигнал</p>                                                                                                                                                                                       |  <p>Если в ядрах возникает фоновая «пыль» SISH, учитывайте ее, только если специфические SISH-сигналы четко отличны от фона.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|  <p>Считать как 2 черных (HER2) и 2 красных (Chr17) сигнала</p>                                                                                                                                                                                      |  <p>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.</p>                                                                                                                        |
|  <p>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</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

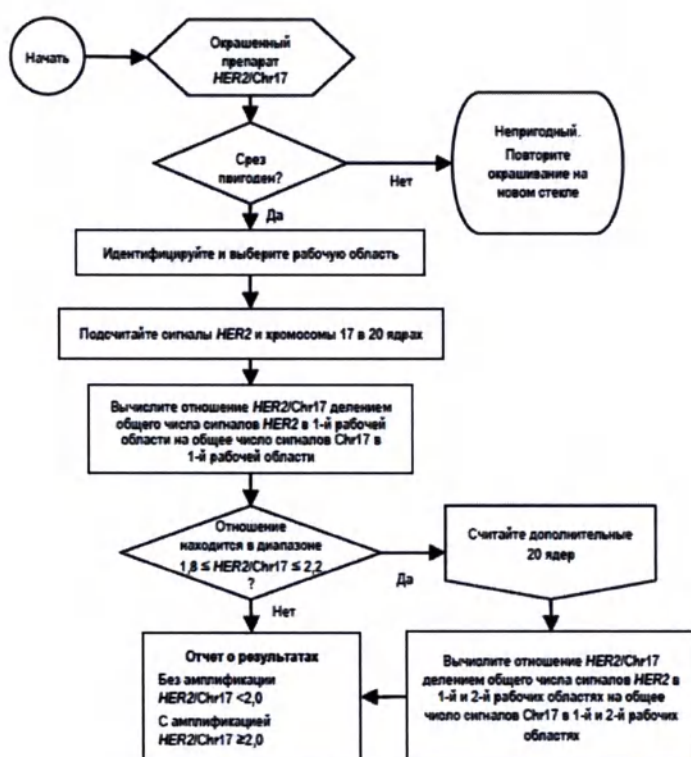


## Оценка микропрепаратов

Был разработан алгоритм количественной оценки, который максимизирует точность и эффективность для определения статуса гена HER2. Как только был идентифицирован адекватный целевой участок, специалист регистрирует количество копий HER2 и хромосомы 17, которые присутствуют в 20 репрезентативных ядрах. Если результирующее соотношение уровней HER2/Chr17 находится в пределах 1,8-2,2

(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, находящимися 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, отвечающих 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

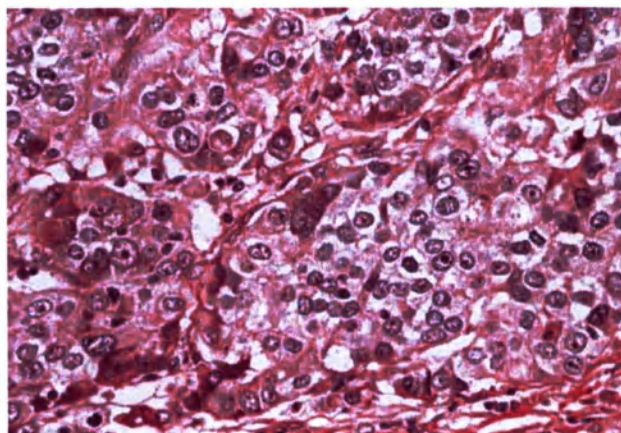
Следующие изображения (рисунки 8-11) представлены для иллюстрации разнообразных картин окрашивания, которые могут возникнуть в результате окрашивания препаратов карциномы молочной железы или карциномы желудка с помощью VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Назначение этих изображений

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»).

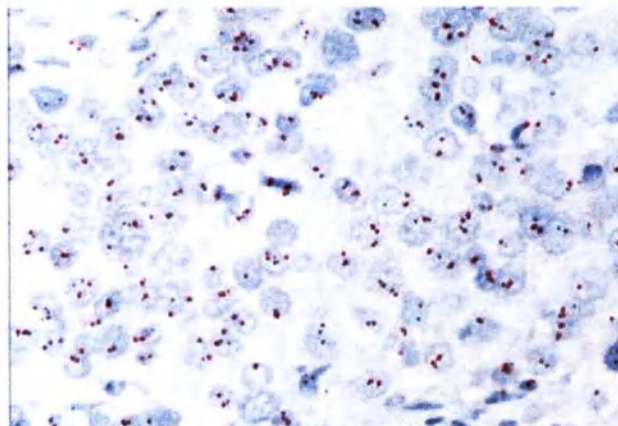
### Часто встречающиеся картины окрашивания

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

**Случай 17. Карцинома молочной железы: без амплификации**

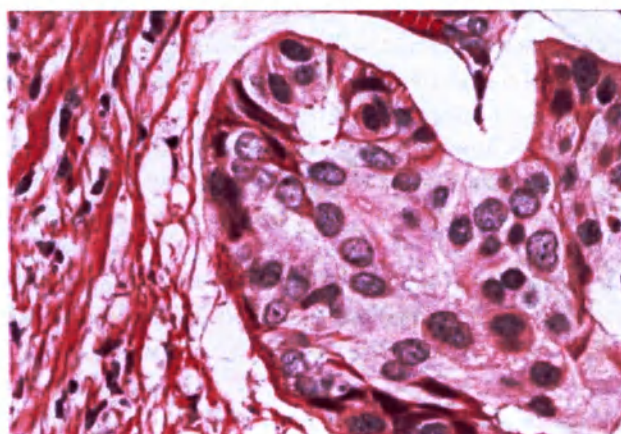


H&E 60x

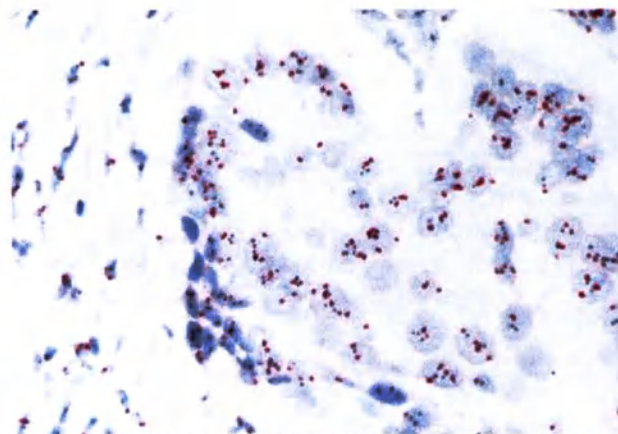


VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; единичные копии HER2, без амплификации

**Случай 18. Карцинома молочной железы: множественные копии**



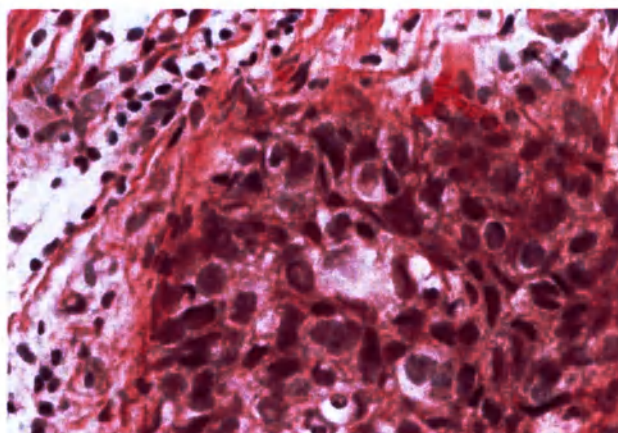
H&E 60x



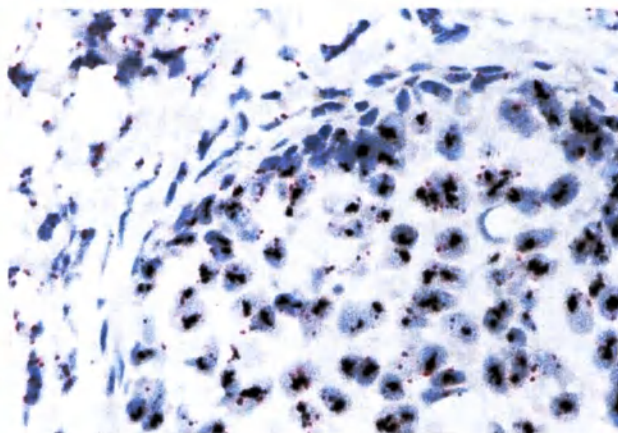
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; несколько отдельных копий HER2, несколько отдельных копий HER2 и хромосомы 17, которые следует учитывать с осторожностью.



#### 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.

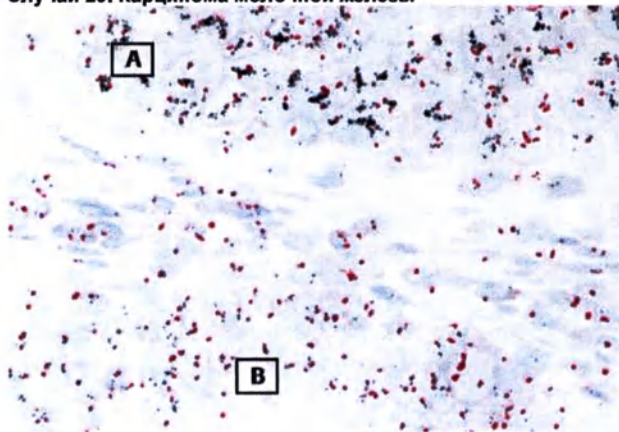
#### Гетерогенность

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

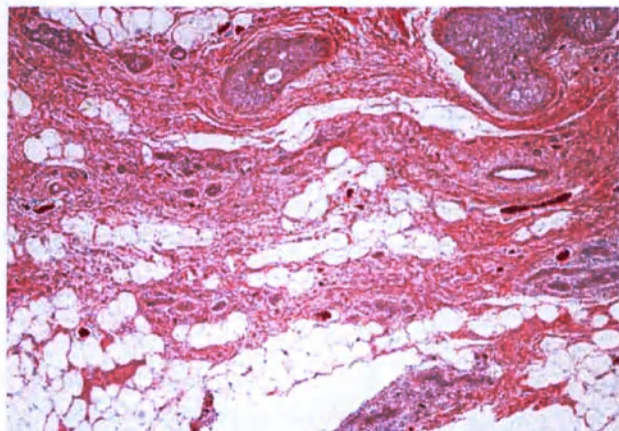


VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; гетерогенный для количества копий HER2 в пределах одной целевой области. А: большое число копий для HER2 и явная полисомия для хромосомы 17. В: небольшое число копий для HER2

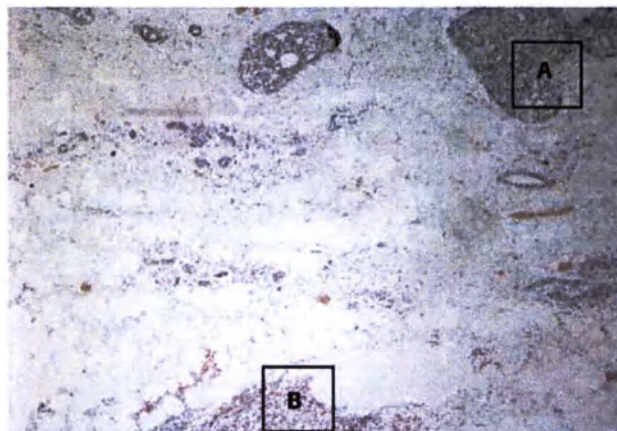


Рисунок 10. Инвазивная и протоковая карцинома in situ в образцах молочной железы

Случай 21. Карцинома молочной железы

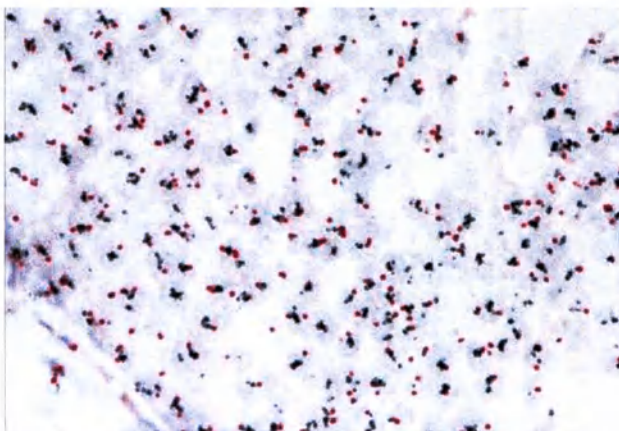


H&E, 4x; протоковая карцинома in situ и инвазивная карцинома



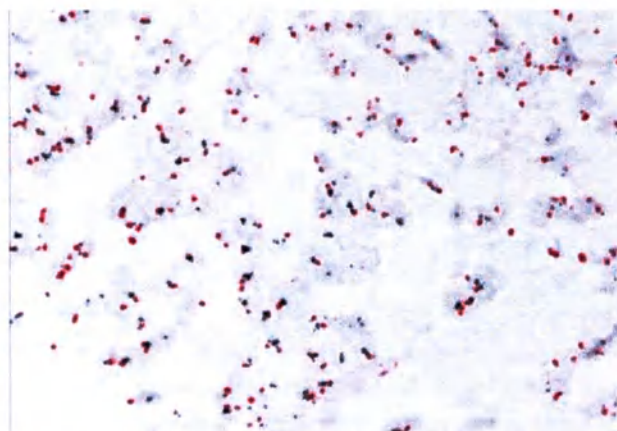
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 4x; протоковая карцинома in situ (A) и инвазивная карцинома (B)

(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.

## Аневзолия хромосомы 17

### Моносомия

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

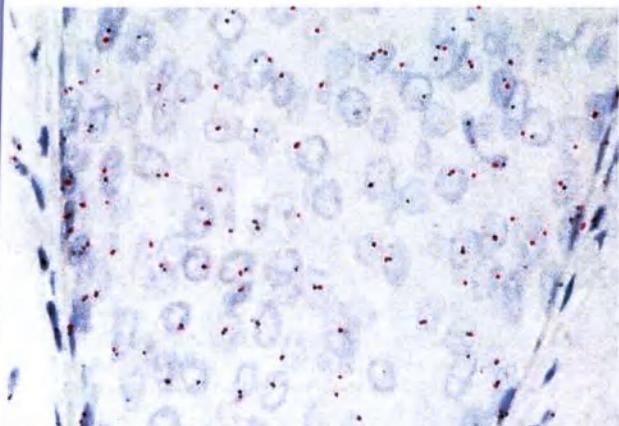
Число копий гена HER2 для случая 22 (рисунок 11) приблизительно равно единице, но обратите внимание, что хромосомы 17 также является моносомным. Таким образом, произошла генетическая потеря хромосомы. В отчете о случае 22 можно отметить моносомию 17.

### Полисомия

Полисомия — это состояние, при котором в ядрах клеток карциномы содержится по крайней мере на одну копию хромосомы больше, чем в нормальных ядрах.<sup>13</sup> 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.

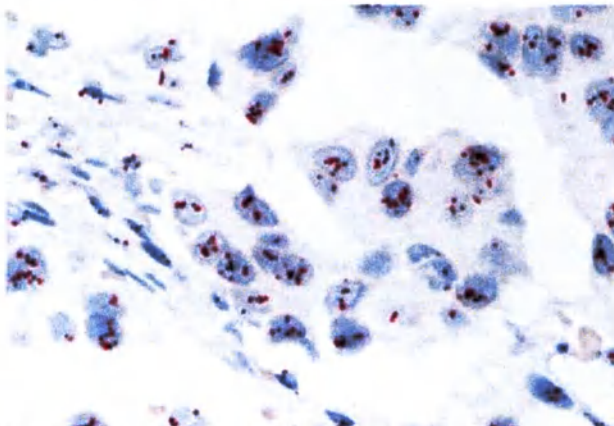
Рисунок 11. Аневзолия хромосомы 17

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

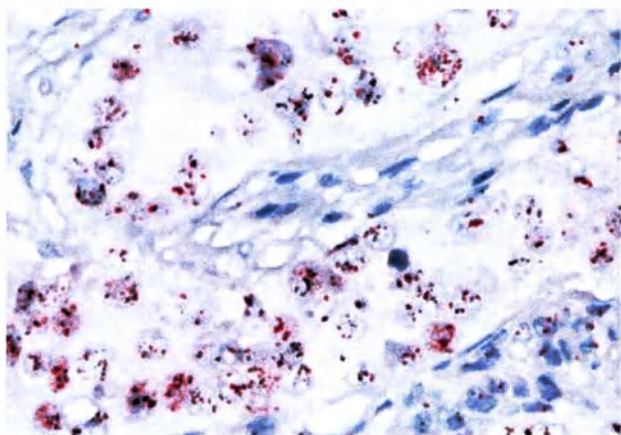
Существуют литературные данные о явной "амплификации", кластерах или полисомии хромосомы 17 (с явными кластерами HER2 или без них).<sup>13-14</sup> В случае 24 HER2 явно амплифицируется, а для хромосомы 17 также наблюдается кластеризованная картина окрашивания Red ISH (рисунок 11). Даже при том, что 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.

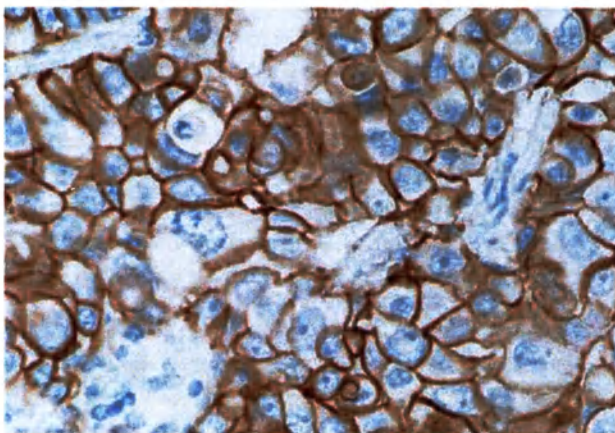
Рисунок 11. Аневзмия хромосомы 17 (продолжение)

Случай 24a. 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

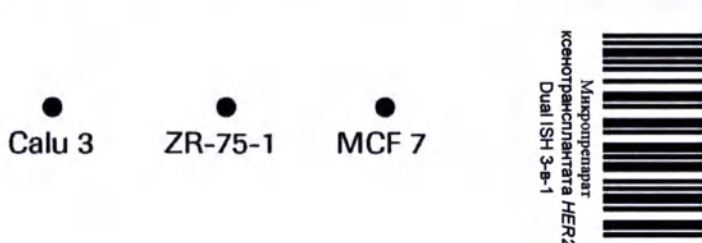
## Контроль качества окрашивания при гибридизации in situ (ISH)

### 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



## 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.

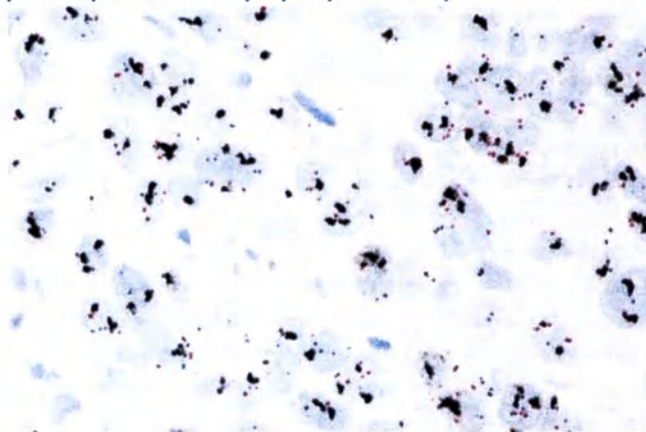
Микропрепараты с ксенотрансплантатами HER2 Dual ISH 3-в-1 содержат по три отдельных биоптата ксенотрансплантата, которые зафиксированы формалином и залиты в один парафиновый блок (рисунок 12). На основе их молекулярной характеристики числа копий гена HER2 и уровней белка были отобраны клеточные линии (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)

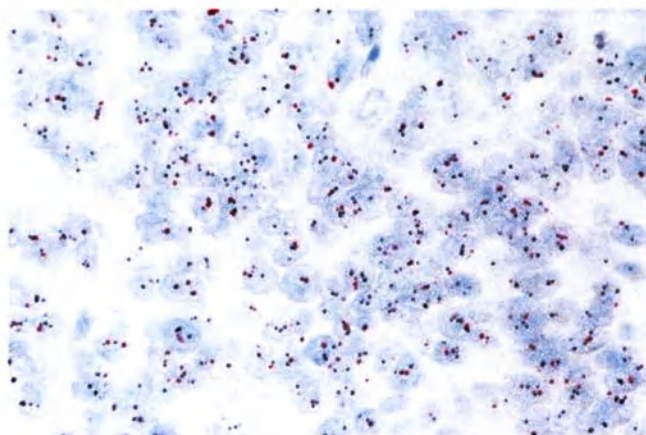
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail для карциномы молочной железы и карциномы желудка



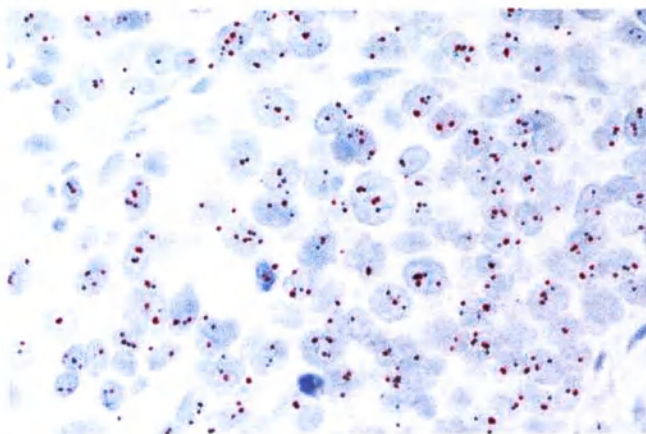
Рисунок 13. Характерная картина окрашивания микропрепарата ксенотрансплантата HER2 Dual ISH 3-в-1



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.

## Преаналитические аспекты

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

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» фиксацию<sup>3</sup> и позднюю фиксацию.<sup>4</sup> 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%.<sup>3</sup>

### 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.<sup>1-2</sup>

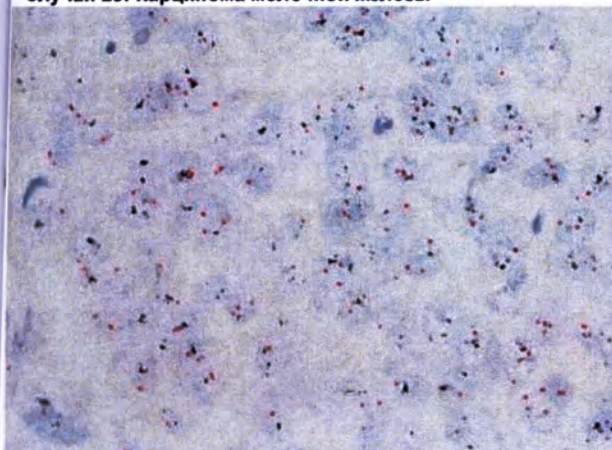


## Толщина образца

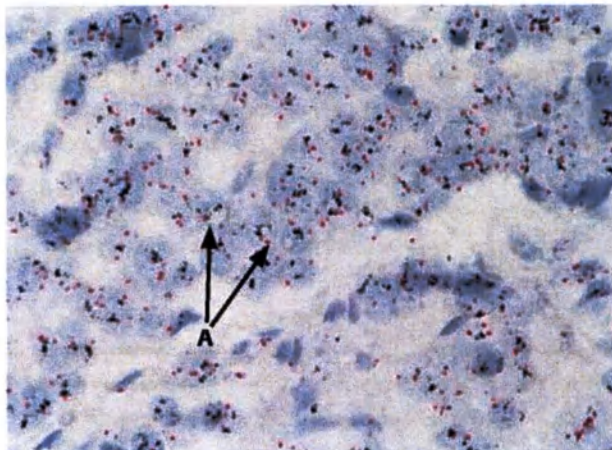
Срезы толщиной более 4 мкм могут потребовать более длительной предварительной обработки протеазой, такой как ISH Protease 3, в течение >20 минут. Такое более длительное инкубирование с протеазой эффективно при демаскировании ДНК в более толстых срезах образцов. Более тонкие срезы могут потребовать более 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**



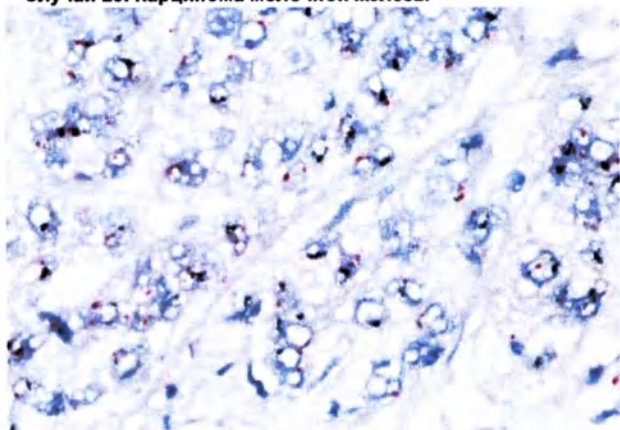
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; рекомендуемая толщина среза 4 мкм



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; удвоенная рекомендуемая толщина (срез толщиной 8 мкм) A: 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»

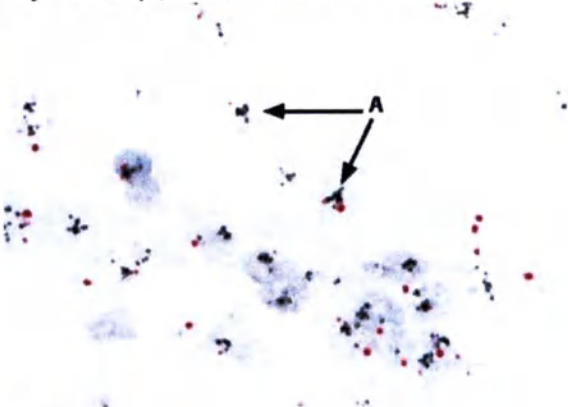
## Другие факторы

### 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.



## Лечение неисправностей

### Слабое окрашивание или отсутствие окрашивания

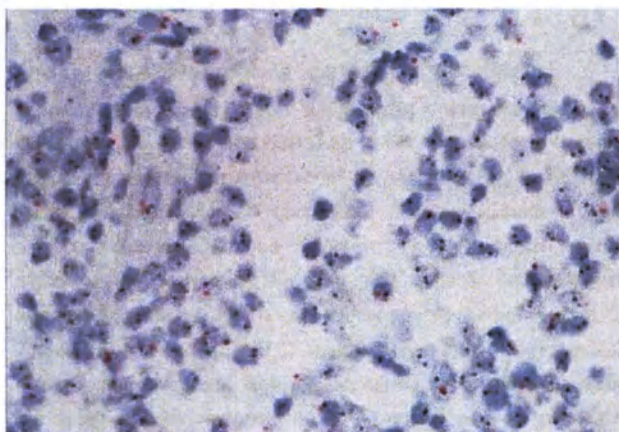
Случаи, в которых полностью отсутствует или слабо проявляется окрашивание как для HER2, так и для хромосомы 17 в такой степени, что это препятствует подсчету клеточных сигналов, вероятно, вызваны проблемой (проблемами) с преаналитической подготовкой образца. Следует убедиться, что используются соответствующие 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

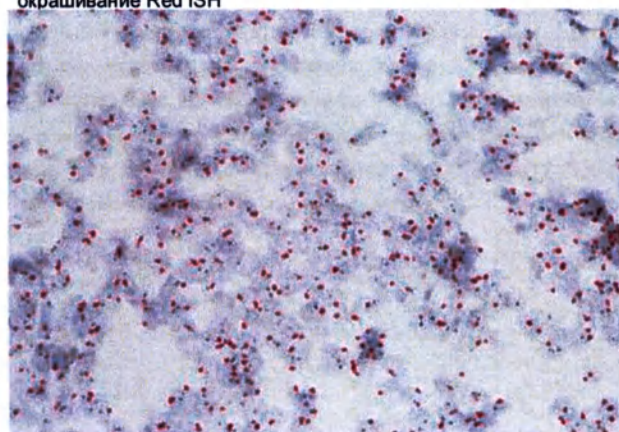
убеждаются, что соблюден надлежащий процесс дегидратации, так как использование ванночки с этанолом, применение ацетона и продолжительная инкубация в ксилоле снижают интенсивность сигнала Red ISH. В случае слабых или затухающих сигналов SISH убедитесь, что для сохранения сигналов использовали совместимую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

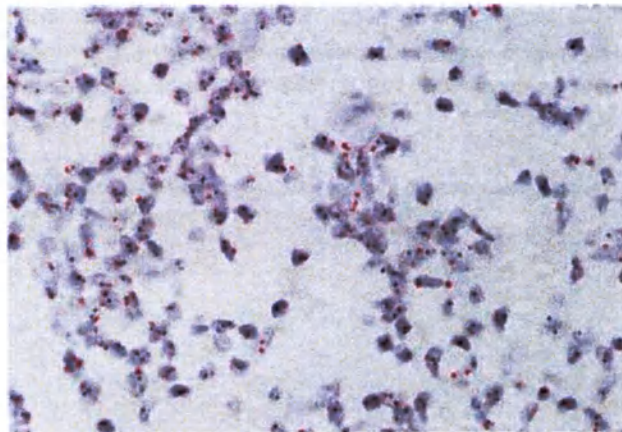
**Рисунок 17. Пример успешного повторного окрашивания после увеличения времени инкубации для обработки протеазой**  
**Случай 28. Карцинома молочной железы**



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



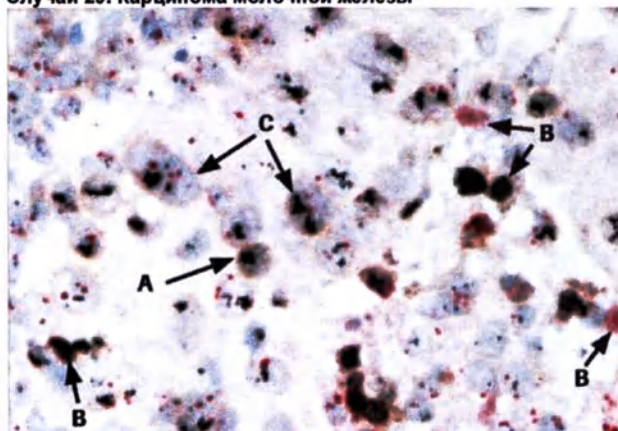
**Постоянное отсутствие окрашивания структур, поддающихся подсчету, во внутренних положительных клетках**

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**

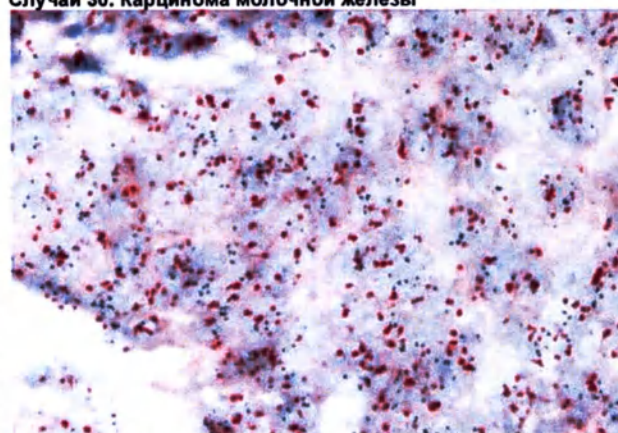
В некоторых случаях могут наблюдаться приемлемые уровни окрашивания фона Red ISH или SISH, которые не мешают подсчету специфических сигналов (рисунки 18 и 19). Тем не менее, если наблюдается чрезмерное окрашивание фона микропрепаратов, которое мешает подсчету специфических сигналов (то есть ядерная пыль 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



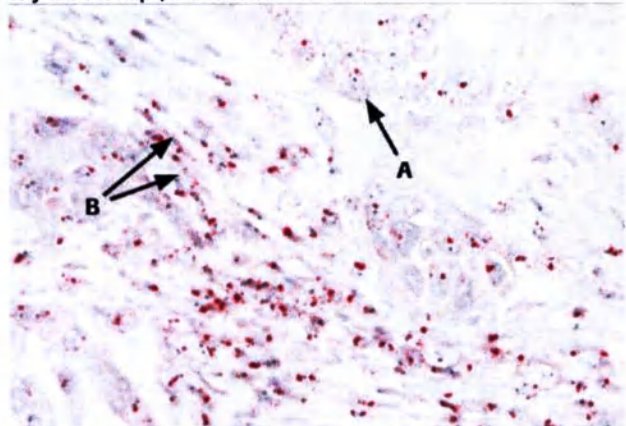
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x;  
неспецифическая красная дымка/фон



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 (A) и в нормальных клетках (B). Этот сигнал выглядит светлее, чем специфический сигнал Red ISH для хромосомы 17, однако его широкое распространение мешает подсчёту специфических сигналов Red ISH.

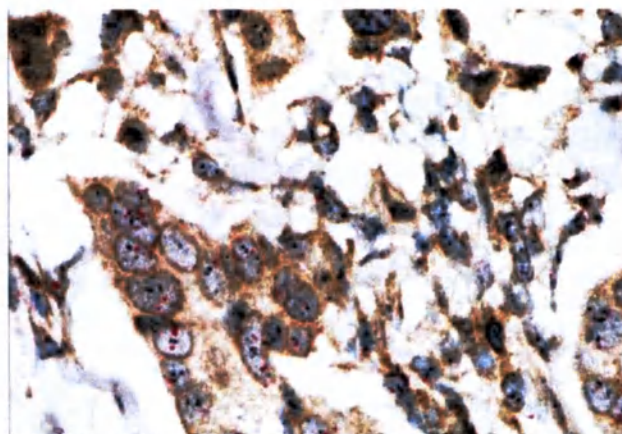
### Осаждение в микропрепарате

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.

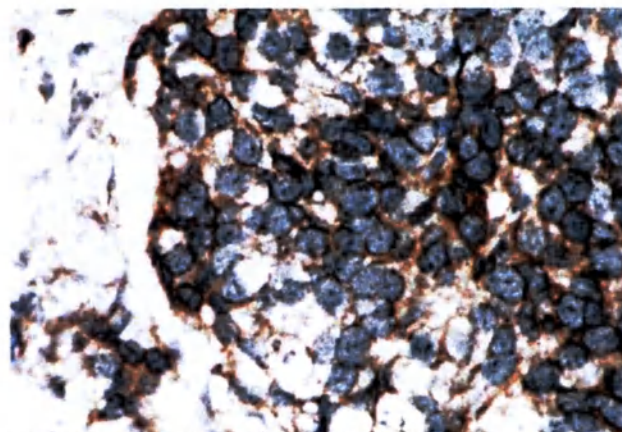
### Рисунок 21. Осаждение

#### Случай 32а. Карцинома молочной железы



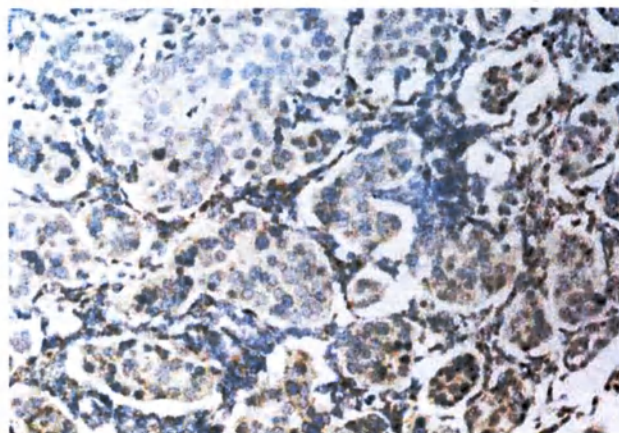
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; умеренная осаждение вокруг ядер

#### Случай 33а. Карцинома молочной железы



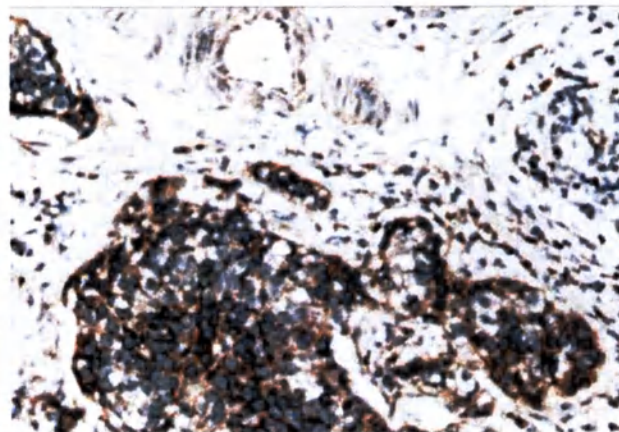
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 60x; сильная преципитация вокруг ядра

#### Случай 32b. Карцинома молочной железы



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

#### 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                      | <ol style="list-style-type: none"> <li>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.</li> <li>2. Убедитесь, что тип фиксации, время и толщина среза подходят для анализов на основе ISH.</li> <li>3. Убедитесь, что для сохранения сигнала SISH используются SISH-совместимые гистологические среды. Если окрашивание все еще слабое или отсутствует, перейдите к пункту 4 ниже.</li> <li>4. Увеличьте время CC1 до &gt; 16 мин.</li> <li>5. Увеличьте время CC2 до &gt; 16 мин для тканей карциномы желудка или до &gt; 24 мин для тканей карциномы молочной железы.</li> <li>6. Увеличьте время ISH Protease 3 до &gt; 16 мин для тканей карциномы желудка или &gt; 20 мин для тканей карциномы молочной железы, в случае если морфология ядра не нарушена.</li> </ol> |
| Отсутствие или слабый красный сигнал                   | <ol style="list-style-type: none"> <li>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.</li> <li>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.</li> <li>3. Убедитесь, что тип фиксации, время и толщина среза подходят для анализов на основе ISH.</li> <li>4. Увеличьте время CC1 до &gt; 16 мин.</li> <li>5. Увеличьте время CC2 до &gt; 16 мин для тканей карциномы желудка или до &gt; 24 мин для тканей карциномы молочной железы.</li> <li>6. Увеличьте время ISH Protease 3 до &gt; 16 мин для тканей карциномы желудка или &gt; 20 мин для тканей карциномы молочной железы, в случае если морфология ядра не нарушена.</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Если присутствует фоновое окрашивание                  | Изменение (-ия) процедуры для достижения желаемого окрашивания                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Неспецифическое красное ISH фоновое окрашивание        | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Убедитесь, что используются положительно заряженные предметные стекла, образец зафиксирован и разделен соответствующим образом для анализов на основе ISH.</li> <li>2. Если красное ISH фоновое окрашивание различимо для специфического красного ISH-сигнала, произведите подсчет, но не считайте неспецифические красные ISH-сигналы.</li> <li>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.</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Неспецифическое фоновое окрашивание SISH               | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Убедитесь, что используются положительно заряженные предметные стекла, образец зафиксирован и разделен соответствующим образом для анализов на основе ISH.</li> <li>2. Если фоновое окрашивание SISH различимо для специфического SISH сигнала, произведите подсчет, но не считайте неспецифические SISH сигналы.</li> <li>3. Если фоновое окрашивание SISH в ядре мешает подсчету, повторите окрашивание с уменьшением времени кондиционирования клеток или экспозиции с протеазой.</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Осадок                                                 | <ol style="list-style-type: none"> <li>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.</li> <li>2. Убедитесь, что штрихкод на предметном стекле расположен по центру и нанесен на предметное стекло без нависания. Не дублируйте и не наносите повторно штрихкоды.</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 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,<br>Уменьшение интенсивности сигнала при уменьшении времени                                                  |
| Кондиционирование клеток 2,  | 16 – 40 мин                                                               | Увеличение интенсивности сигнала при окрашивании SISH и Red ISH при увеличении времени,<br>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.

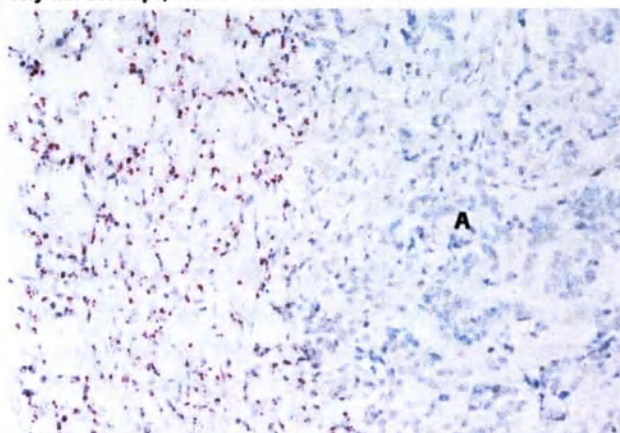


### Слабо окрашенные или неокрашенные участки

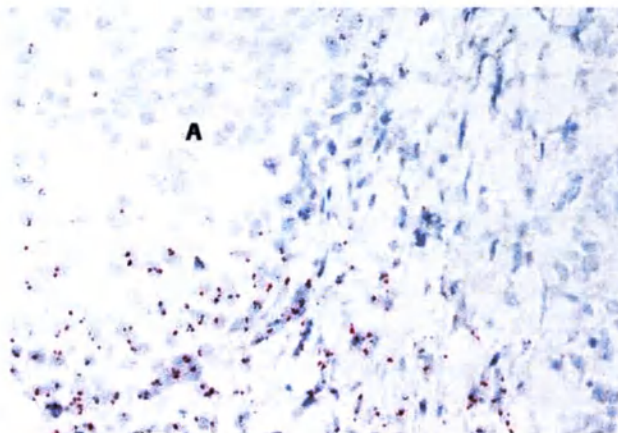
В некоторых случаях на микропрепарате могут появиться участки со слабым окрашиванием или без окрашивания. Если участок мал и присутствуют другие хорошо окрашенные зоны микропрепарата, проводят подсчет в этих зонах (рисунок 22).

Рисунок 22.

#### Случай 35. Карцинома молочной железы



VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 20x; зона без окрашивания (A). Могут присутствовать другие хорошо окрашенные зоны микропрепарата, и там необходимо производить подсчет.



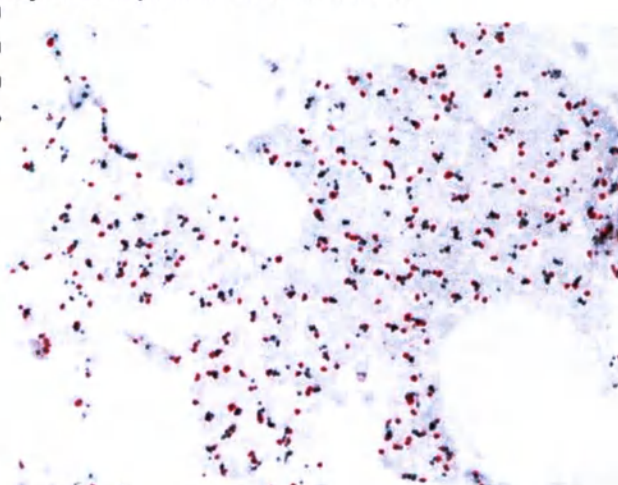
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, 40x; зона без окрашивания (A). Могут присутствовать другие хорошо окрашенные зоны микропрепарата, и там необходимо производить подсчет.

### 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 гастроэзофагеальной 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 неубедительных 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., Накахара 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 анеуплоидия 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)



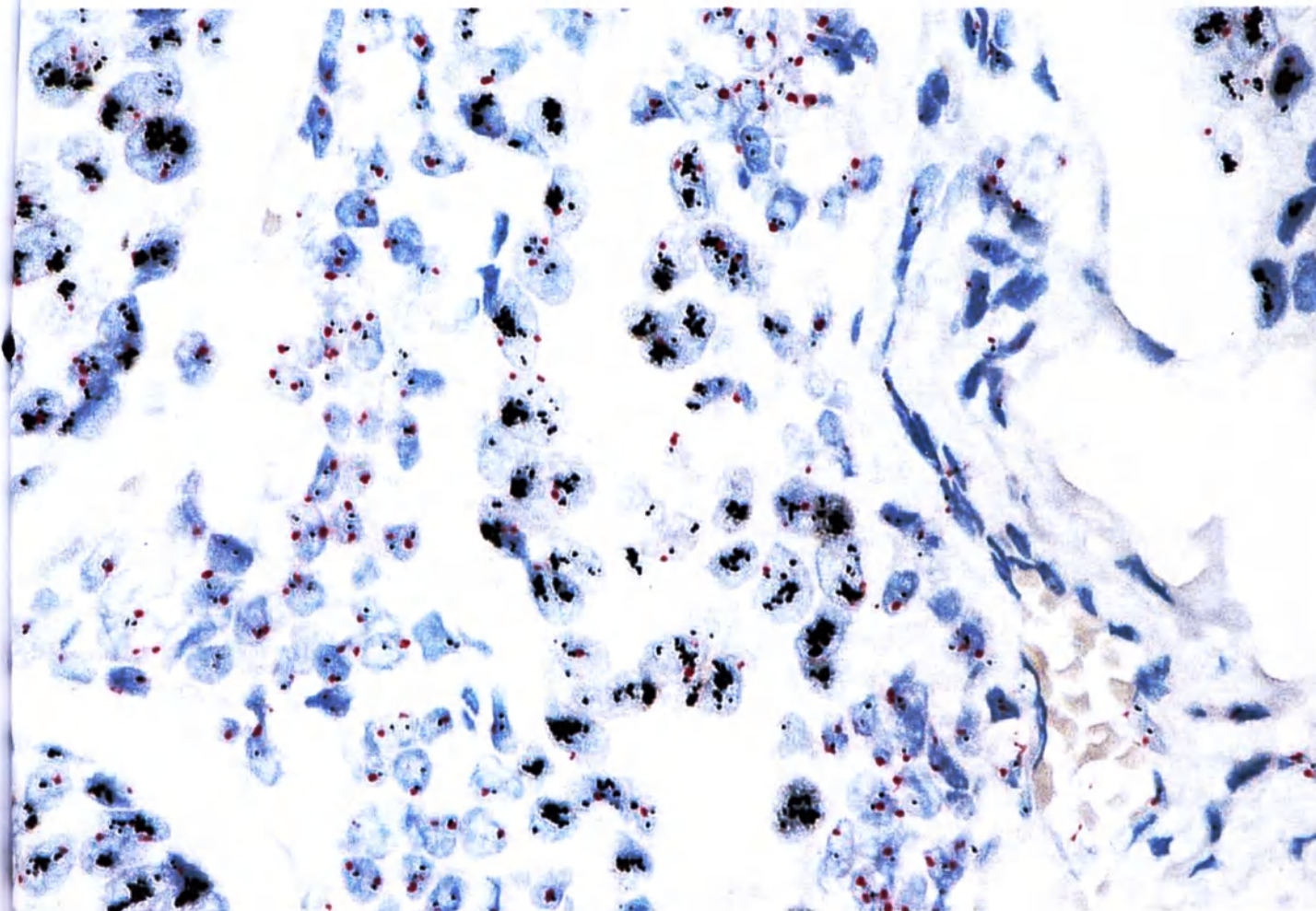
[www.roche.com](http://www.roche.com)  
[www.ventana.com](http://www.ventana.com)

© 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 немецкого и английского языков на русский язык]**

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

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

**Удостоверение копии**

**Настоящим удостоверяется соответствие приведенной ниже фотокопии представленному мне оригиналу.**

**г. Маннхайм, 15 января 2021 г.**

***/подпись/***

**Рольф Гленц (Rolf Glenz),  
заместитель нотариуса  
Д-ра Штефана Феллмета (Dr. Stefan Fellmeth)**

**[Печать:**

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



**[Далее следует текст документа «Руководство по интерпретации карциномы молочной железы и карциномы желудка на медицинское изделие „Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail для определения статуса гена HER2 методом гибридизации in situ (ISH) для диагностики in vitro на иммунотейнерах автоматических серии BenchMark“», представленного на русском, английском и немецком языках.]**

**[На бланке компании «Рош Диагностика ГмбХ»]**

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

**[Логотип компании «Рош»]**

**Вер. 1.0**

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

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

**Утверждено  
«Рош Диагностика ГмбХ»  
(Roche Diagnostics GmbH)  
Дата: 14 января 2021 г.**

**/подпись/  
Андреа Вебер (Andrea Weber)  
Руководитель проекта по международно-  
правовому регулированию**

**Штамп:** **[Штамп:  
«Рош Диагностика ГмбХ»  
(Roche Diagnostics GmbH)  
Сандхофер Штрассе 116  
68305 Маннхайм  
(Sandhofer Straße 116  
68305 Mannheim)]**

**2021 г.**

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





Текст данного документа перевёл переводчик Рахимкулов Эльдар Серкалиевич. Знание иностранного языка подтверждаю. Выполненный перевод является правильным, точным и полным.

**ПОДПИСЬ**

Российская Федерация

Город Москва

Одиннадцатого февраля две тысячи двадцать первого года.

Я, Журавлева Екатерина Владимировна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Точкина Дмитрия Валерьевича, свидетельствую подлинность подписи переводчика Рахимкулова Эльдара Серкалиевича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2079-н/77-2021-1-3048

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб.

**ПОДПИСЬ**

Гербовая печать  
нотариуса г.Москвы  
Точкина Д.В

Е.В. Журавлева

Всего прошнуровано, пронумеровано  
и скреплено печатью 25 лист(а)(ов)

ВРИО нотариуса

**ПОДПИСЬ**

Российская Федерация  
Город Москва

Одиннадцатого февраля две тысячи двадцать первого года  
Я, Журавлева Екатерина Владимировна, временно исполняющая  
обязанности нотариуса города Москвы Точкина Дмитрия  
Валерьевича, свидетельствую верность копии с представленного мне  
документа.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2079-н/77-2021-1-3048  
Уплачено за совершение нотариального действия: 2760 руб.

Е.В. Журавлева



Всего прошито, пронумеровано, скреплено  
печатью 45 лист(а) (ов)

ВрИО Нотариуса

M



SEELER & DR. FELLMETH  
NOTARE

КОПИЯ

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

### Beglaubigte Ablichtung

Die Übereinstimmung nachstehender Fotokopie mit dem Original wird hiermit  
beglaubigt.

Mannheim, den 15.01.2021

*Rolf Glenz*

Rolf Glenz

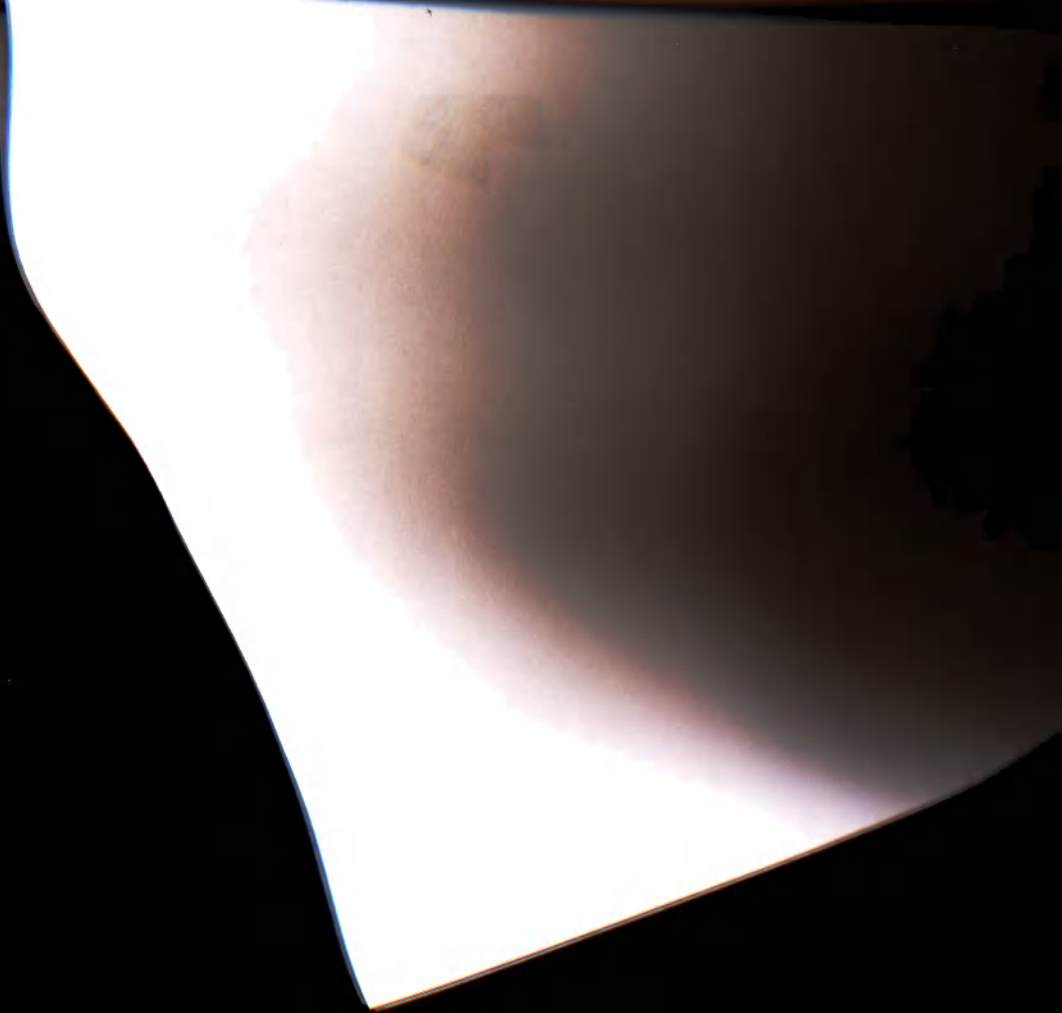
Notarvertreter des Notars

Dr. Stefan Fellmeth













V1.0

## **ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**

**(INSTRUCTION FOR USE)**

**НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

**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 производства Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany**

### **РАЗРАБОТЧИК**

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

**Approved by**

**Roche Diagnostics GmbH**

**Date: 14 January 2021**

**Andrea Weber**  
**Manager Global Regulatory Affairs**

**Stamp Roche Diagnostics GmbH**  
Sandhofer Straße 116  
68305 Mannheim

**2021**

Roche Diagnostics GmbH; Sandhofer Strasse 116; D-68305 Mannheim; Telefon +49-621-759-0; Telefax +49-621-759-2990

Sitz der Gesellschaft: Mannheim - Registergericht: AG Mannheim HRB 3962 - Geschäftsführung: Claus Heberda; Andreas Schmitz - Aufsichtsratsvorsitzender: Dr. Thomas Schinecker

## VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

**REF** 800-6043

08314373001

**IVD**  30

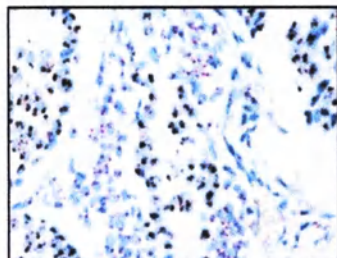


Рисунок 1. Амплификация статуса гена HER2 с помощью HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail VENTANA, карцинома молочной железы.

включая гастроэзофагеальный переход.

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

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

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

Ген HER2/neu (HER2) относится к семейству, состоящему из четырех трансмембранных рецепторных тирозинкиназ, которые обеспечивают рост, дифференцировку и выживание клеток<sup>1, 2</sup>. Ген HER2 кодирует белок HER2<sup>2, 3</sup>. Гиперэкспрессия белка HER2, амплификация гена HER2 или оба упомянутых процесса наблюдаются приблизительно в 15–25 % случаев рака молочной железы и сопровождаются агрессивным развитием опухоли<sup>4, 5</sup>. VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail содержит зонд HER2 (меченый с гаптеном динитрофенила (DNP)) и зонды хромосомы 17 (меченый с гаптеном диоксигенина (DIG)) в формамидном буфере. Эти зонды предназначены для выявления амплификации гена HER2 в клетках инвазивной карциномы молочной железы и желудка. ДНК-зонд HER2 представляет собой смесь олигонуклеотидов, специфично нацеленных на ген HER2 (который также известен под названиями ERBB2 и NEU). Данный ген находится на хромосоме 17 человека (17q12). Зонд к 17-й хромосоме представляет собой смесь олигонуклеотидов, специфичных к повторам центромерного участка хромосомы. Он служит для определения случаев анеуплоидии. Чтобы определить состояние амплификации HER2, в ядрах клеток опухоли подсчитывается количество копий обоих зондов и результаты представляются в виде соотношения HER2/хромосома 17 (значение отношения HER2/хромосома 17  $\geq 2,0$  соответствует наличию амплификации; если оно  $< 2,0$ , то амплификация отсутствует).

В ходе многих клинических исследований показано, что амплификация и (или) гиперэкспрессия HER2 указывает на плохой клинический прогноз для пациентов с инвазивным раком молочной железы и коррелирует с несколькими другими негативными прогностическими показателями, в том числе с негативным статусом по эстрогенным рецепторам (ER), высокой фракцией S-фазы, вовлечением лимфоузлов, мутацией p53, а также высоким ядерным индексом<sup>6, 7</sup>. В ходе нескольких исследований показано, что при инвазивном раке молочной железы (с вовлечением лимфоузлов и без него) с амплификацией гена HER2 снижается выживаемость и повышается вероятность рецидивов<sup>1, 8–11</sup>. Исследования, в ходе которых иммуногистохимическими методами определялась гиперэкспрессия белка HER2, показали сходные результаты с амплификацией гена HER2<sup>9, 11–13</sup>. Таким образом, определение статуса экспрессии и (или) амплификации HER2 при инвазивном раке молочной железы дает врачам ценную информацию для принятия решения о стратегии лечения.

Препарат трастузумаб (Herceptin) является гуманизированным моноклональным антителом к внеклеточному домену белка HER2. Он показал хорошие результаты при лечении рака молочной железы с положительным HER2-статусом<sup>14–19</sup>. Лечение трастузумабом показано только пациенткам, у которых обнаружена гиперэкспрессия белка и (или) амплификация гена HER2. Клинические исследования показали, что наилучшие результаты лечения трастузумабом наблюдаются у пациентов с высокой степенью гиперэкспрессии белка и (или) амплификации гена HER2<sup>20</sup>. Определение амплификации гена HER2 и (или) гиперэкспрессии белка необходимо у пациенток с инвазивным раком молочной железы для терапии трастузумабом. Аналогичные результаты были обнаружены в клинических исследованиях, посвященных раку желудка<sup>21</sup>. Терапия трастузумабом показана пациенткам с гиперэкспрессией или амплификацией HER2.

### ПРИНЦИП ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

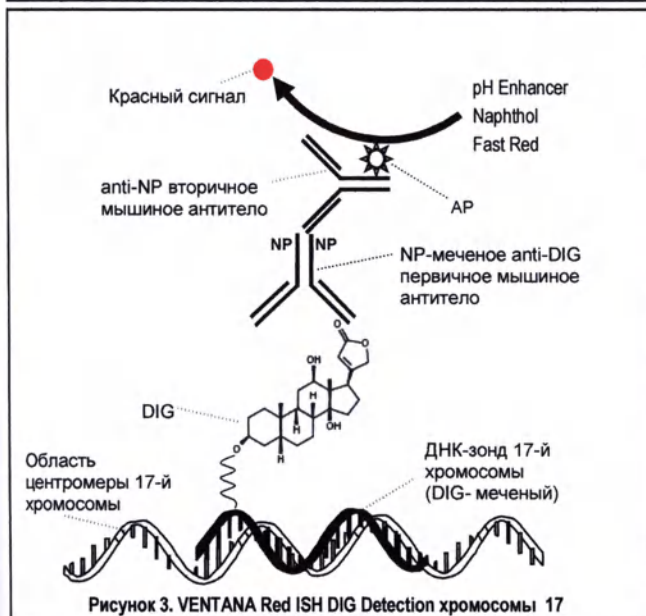
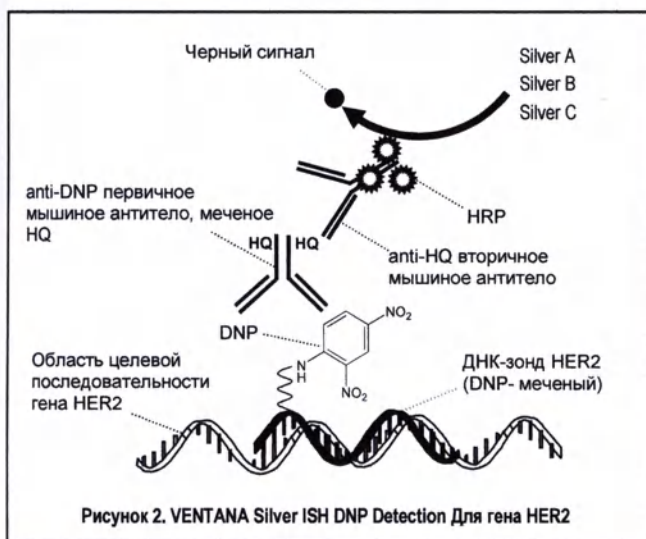
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail подходит для использования с VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit, VENTANA Red ISH DIG Detection Kit и дополнительными реагентами на аппарате BenchMark IHC/ISH.

Набор для обнаружения содержит первичное антитело и меченое ферментом вторичное антитело конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) или щелочной фосфатазой (AP), используемой в качестве хромогенного фермента. Во время двойной гибридизации *in situ* (Dual *in situ* hybridization, Dual ISH) два типа зондов, меченых соответственно DNP и DIG, гибридизуются с соответствующими специфическими комплементарными участками ДНК в ядрах клеток. Обнаружение зонда HER2, меченого DNP, происходит в первую очередь с использованием VENTANA Silver ISH (SISH) DNP Detection Kit, который содержит следующие дозы: anti-DNP первичное мышиное антитело, меченое гидроксикиналином (HQ), anti-HQ вторичное мышиное антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP), Chromogen A (Silver A), Chromogen B (Silver B) и Chromogen C (Silver C). После инкубации с HQ-меченым anti-DNP первичным мышиным антителом, а затем с anti-HQ вторичным мышиным антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) происходит реакция SISH. Описывая эту реакцию кратко, можно сказать, что она вызвана последовательным добавлением Chromogens A (ацетата серебра), B (гидроксикиналина) и C (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). При этом ионы серебра (Ag<sup>+</sup>) восстанавливаются гидроксиналином до атомов металлического серебра (Ag<sup>0</sup>). Источником энергии для протекания этой реакции является субстрат HRP — перекись водорода (Chromogen C). Осадок серебра осаждается в ядре клетки, и единичная копия гена HER2 визуализируется в виде черного сигнала. Схема протекания реакции SISH показана на рис. 2.

После обнаружения гена HER2 с помощью реакции SISH обнаружение меченой DIG хромосомы 17 проводится с помощью VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Этот набор включает следующие дозы: 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 микропрепарат инкубируется с NP-меченым anti-DIG первичным мышиным антителом (mouse anti-DIG primary antibody), которое связывается с гаптеном (hapten) DIG на зонде хромосомы 17. Первичное антитело против гаптана обнаруживается с помощью anti-NP вторичного мышиного антитела, конъюгированного с ферментом AP. Микропрепарат инкубируется с раствором pH Enhancer, который обеспечивает необходимый состав и концентрацию солей, а также буферный pH для оптимальной активности фермента AP. Затем добавляется нафтол-фосфат, который служит в качестве субстрата для фермента AP (AP обеспечивает дефосфорилирование нафтола). Fast Red, который вносят следующим в микропрепарат, соединяется с дефосфорилированным нафтолом и образует красный осадок, который легко визуализируется с помощью световой микроскопии. Рисунок 3 иллюстрирует реакцию Red ISH. Затем препарат окрашивается контрастным красителем Hematoxylin II и исследуется под световым микроскопом.

Протокол окрашивания состоит из нескольких этапов, на которых реагенты инкубируются в течение предварительно установленного времени и при предварительно заданной температуре. После завершения каждого этапа инкубации аппарат BenchMark IHC/ISH промывает срезы, чтобы удалить несвязанный материал, и жидкое покрывное стекло, минимизирующее испарение со стекла реагентов. Результаты интерпретируются с помощью светового микроскопа с увеличением объектива 20x, 40x и (или) 60x.





## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

Дозатор VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 30 анализов.

Один дозатор 6 мл VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail содержит приблизительно 14 мкг/мл меченого динитрофенилом (DNP) зонда HER2 и 0,24 мкг/мл зонда хромосомы 17, меченого дигоксигенином (DIG), в в буфере гибридизации на основе формамида. Оба зонда применяются для определения статуса гена HER2 (т. е. отношения HER2/хромосомы 17).

## ВОССТАНОВЛЕНИЕ, СМЕШИВАНИЕ, РАЗБАВЛЕНИЕ И ТИТРОВАНИЕ

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail оптимизирован для использования с аппаратами BenchMark IHC/ISH. Восстановление, смешивание, разбавление и титрование зонда не требуется.

## НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

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

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

Реагенты и материалы, необходимые для окрашивания, но не входящие в комплект поставки:

1. VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit (№ по каталогу 760-516 / 08318883001)
2. VENTANA Red ISH DIG Detection Kit (№ по каталогу 760-512 / 08318832001)
3. HybReady Solution (№ по каталогу 780-4409 / 05917557001)
4. ISH Protease 3 (№ по каталогу 780-4149 / 05273331001)
5. Hematoxylin II (№ по каталогу 790-2208 / 05277965001)
6. Bluing Reagent (№ по каталогу 760-2037 / 05266769001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-300 / 05353955001)
8. SSC (10X) (№ по каталогу 950-110 / 05353947001)
9. EZ Prep Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-102 / 05279771001)
10. ultraView Silver Wash II (Pre-dilute) (№ по каталогу 780-003 / 05446724001)
11. Основные реагенты, специфичные для аппаратов BenchMark GX и XT:
  - Cell Conditioning Solution 1 (CC1) (Pre-dilute) (№ по каталогу 950-124 / 05279801001)
  - Cell Conditioning Solution 2 (CC2) (Pre-dilute) (№ по каталогу 950-123 / 05279798001)
  - Liquid Coverslip (LCS) (Pre-dilute) (№ по каталогу 650-010 / 05264839001)
12. Основные реагенты, специфичные для аппарата BenchMark ULTRA:
  - ULTRA CC1 (Pre-dilute) (№ по каталогу 950-224 / 05424569001)
  - ULTRA CC2 (Pre-dilute) (№ по каталогу 950-223 / 05424542001)
  - ULTRA LCS (Pre-dilute) (№ по каталогу 650-210 / 05424534001)
13. Аппарат BenchMark IHC/ISH
14. Этикеты со штрихкодами
15. Предметные стекла для микроскопа с положительным зарядом (Superfrost Plus или эквивалентные)
16. Ксилол (гистологической степени очистки).
17. Деионизированная или дистиллированная вода
18. Заливочная среда \*\*
19. Покровное стекло для помещения образцов ткани под стекло
20. Автоматическое приспособление для накрывания препаратов покровным стеклом (например, Tissue-Tek SCA automated coverslipper)
21. Емкости или ванночки для окрашивания
22. Сушильный шкаф, способный поддерживать температуру 60 °C
23. Таймер
24. Световой микроскоп с объективом 20x, 40x и (или) 60x
25. Мягкое моющее средство
26. HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograft Slides (№ по каталогу 783-4422 / 05640300001): при необходимости возможно использование для устранения неполадок.

\*\* Совместимые с данным реагентом гистологические среды для заливки перечислены в Таблица 24.

## ХРАНЕНИЕ

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

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

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

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Данный зонд пригоден для использования с подвергшимися стандартной обработке, фиксированными формалином и залитыми в парафин (FFPE) срезами тканей на аппарате BenchMark IHC/ISH. Рекомендуемый фиксатор ткани — это 10-процентный нейтральный буферный формалин с продолжительностью фиксации от 6 часов до



72 часов<sup>22</sup>. Помимо анализов, проведенных компанией VENTANA, исследования показали, что большинство «неубедительных» результатов исследования гена HER2 методом FISH связаны с преданалитическими факторами, в частности недостаточной или избыточной фиксацией<sup>23</sup>, а также отсроченной фиксацией<sup>24</sup>. Строгое соблюдение условий фиксации (длительность которой не менее 6 часов) приводило к уменьшению «неубедительных» случаев на 68,5 %: с 10,8 до 3,4 %. В образцах, которые фиксировали <6 часов в формалине, может наблюдаться потеря сигнала или чрезмерное расщепление ядра, что характеризуется бледным/слабым окрашиванием. Фиксацию рекомендуется проводить в 10-процентном NBF, так как некоторые фиксаторы имеют переменное окрашивание на основе ISH-анализа (включая Bouin's и спирт-формалин-уксусную кислоту [AFA])<sup>21</sup>.

Препараты следует окрашивать немедленно, так как качество целевых нуклеиновых кислот в срезах ткани со временем может ухудшиться. Внутренние исследования показали, что образцы тканей молочных желез и желудка, хранящиеся при температуре 2–8 °C, сохраняют стабильность в течение 12 месяцев. Положительно заряженные предметные стекла могут быть подвержены неблагоприятным воздействиям со стороны окружающей среды, вследствие чего окрашивание любыми ISH-методами приведет к неудовлетворительным результатам, например вследствие недостаточного окрашивания или контрастного окрашивания в тканях. Запросите у своего представителя компании копию документа «Неблагоприятные воздействия со стороны окружающей среды на различные типы предметных стекол с гистологическими срезами» для того, чтобы лучше понять принцип использования предметных стекол.

Каждый срез следует приготовить соответствующей толщины (4 мкм), чтобы обеспечить проведение анализа и поместить на положительно заряженные предметные стекла (Superfrost Plus или аналог). Чтобы удалить избыток воды между стеклом и тканью, предметные стекла должны быть высушены.

Для срезов, толщина которых превышает 4 мкм, может потребоваться обработка протеазой интенсивнее рекомендованной. Ввиду избытка парафина в ткани может отмечаться большее количество пузырьков в ядрах, чем в более тонких срезах.

Пузырьки в ядрах могут иметь большие и малые размеры. Также возможно наличие вакуолей. При возникновении ядерных пузырей часто наблюдается целый спектр воздействия на сигналы SISH и Red ISH, которые характеризуются следующими признаками: 1) ядра с ядерными пузырями, в которых обнаруживаются сигналы SISH и Red ISH, обычно имеют центральное положение в ядре; 2) ядра с ядерными пузырями сдвигают сигналы SISH и Red ISH к периферии. Часто анализ можно засчитать как действительный в обоих случаях, если сигналы SISH и Red ISH четко различимы, не искажены и их возможно подсчитать. Однако иногда значительное количество ядерных пузырей может исказить сигналы SISH и Red ISH, что делает их неразличимыми. Выполнить подсчет в таком случае невозможно. Подобная ситуация чаще всего возникает, когда сигналы SISH и Red ISH сдвигаются на периферию ядра. При этом различимые ядра часто можно обнаружить в другом участке образца и засчитать такой анализ как действительный. Анализ не может быть засчитан как действительный при значительном количестве ядерных пузырей, которые не позволяют обнаружить достаточное количество различимых сигналов SISH и Red ISH. Ядерные пузыри могут проявляться вследствие недостаточной фиксации (1–3 часа в формалине): ядра при этом выглядят менее дискретными. Этот артефакт можно устранить изменением условий кондиционирования клеток и экспозиции с протеазой, если фиксация длилась 3 часа, но при фиксации в 1 час вероятность его устранения минимальна.

Для VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail предусмотрены дополнительные возможности предварительной обработки, способствующие оптимизации анализа в различных лабораториях и последующему устранению недостатков отдельных образцов тканей/гистологических препаратов с субоптимальным окрашиванием. Компания-производитель рекомендует каждой лаборатории выполнять первичный тест на репрезентативных контрольных образцах, которые были подготовлены в тех же условиях, что и предназначенные для тестирования клинические образцы. Такая практика способствует оптимизации условий специфического окрашивания в конкретных лабораториях, процедуры подготовки образцов в которых могут несколько различаться. При условии отклонения от рекомендуемых факторов преаналитической подготовки возможно получение переменных результатов. Образцы, прошедшие преаналитическую подготовку в условиях, отличных от рекомендованных компанией-производителем, в ходе анализа могут окрашиваться неправильно.

## 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. **Внимание: продукт содержит формамид.** Формамид токсичен при вдыхании и умеренно токсичен при приеме внутрь. Он оказывает раздражающее действие на кожу, глаза, слизистые оболочки и абсорбируется кожей. Вещество может оказывать вредное воздействие на плод. Обращаться с осторожностью! При обращении с предполагаемыми канцерогенами или токсичными материалами используйте одноразовые перчатки и защитную одежду.
5. Перед началом сеанса убедитесь, что контейнер для отходов пуст. В противном случае контейнер для отходов может переполниться, что приведет к риску для пользователя поскользнуться и упасть.
6. Материалы животного или человеческого происхождения должны рассматриваться как потенциально биологически опасные и утилизироваться с соблюдением надлежащих мер предосторожности.
7. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды. Избегайте вдыхания реагентов.
8. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, т.к. это может стать причиной неверных результатов.
9. Относительно рекомендованного способа утилизации проконсультируйтесь с местными или государственными органами власти.
10. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте [www.ventana.com](http://www.ventana.com).

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Зонды VENTANA предназначены для использования с аппаратом BenchMark IHC/ISH и в сочетании с наборами для обнаружения и принадлежностями VENTANA. Процедуры окрашивания для аппарата BenchMark IHC/ISH с помощью VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit перечислены в Таблица 1. Рекомендуемые протоколы окрашивания приведены в Таблица 2.

Параметры автоматизированных процедур можно выводить на дисплей, распечатывать и редактировать в соответствии с процедурой, приведенной в руководстве по эксплуатации прибора.

**Таблица 1.** Используйте следующие процедуры окрашивания для проведения VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail анализа на аппарате BenchMark IHC/ISH.

| Платформа       | Процедура окрашивания            |
|-----------------|----------------------------------|
| BenchMark GX    | GX VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT |
| BenchMark XT    | XT VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT |
| BenchMark ULTRA | U VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT  |

**Таблица 2.** Рекомендованные условия окрашивания для проведения VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail на аппаратах BenchMark IHC/ISH.

| Условие окрашивания          | Молочная железа                     | Желудок                             |
|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Прогрев                      | Не выбрано                          | Не выбрано                          |
| Cell Conditioning 1          | 16 мин                              | 16 мин                              |
| Cell Conditioning 2          | 24 мин                              | 16 мин                              |
| ISH Protease 3               | 20 мин                              | 16 мин                              |
| Температура жесткой промывки | 76 °C для аппаратов BenchMark GX/XT | 76 °C для аппаратов BenchMark GX/XT |
|                              | 74 °C для аппарата BenchMark ULTRA  | 74 °C для аппарата BenchMark ULTRA  |



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

#### Начало исследования на аппаратах BenchMark IHC/ISH

1. Считайте штрихкод, соответствующий выполняемому протоколу использования зонда.
2. Загрузите VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, реагенты из VENTANA Red ISH DIG и VENTANA Silver ISH DNP Detection Kits и необходимые вспомогательные реагенты в лоток (лотки) для реагентов или в карусель. Поместите лоток (лотки) для реагентов или карусель в аппарат.
3. Проверьте заполненность канистр с жидкостями и состояние контейнеров для отходов.
4. Канистры с раствором реакционного буфера должны быть заполнены.
5. Контейнер для отходов должен быть пустым до начала работы.
6. Поместите предметные стекла в аппарат.
7. Начните цикл окрашивания.
8. По завершении процесса извлеките стекла из прибора. Окрашенные покровные стекла будут иметь остатки буфера или жидкий раствор покровного стекла на своей поверхности. Продолжайте промывать и проводить дегидратацию (см. ниже).

#### Процедура дегидратации

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

1. Для удаления жидкого раствора 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. В печи время сушки варьируется от 10 минут до одного часа (сушка окрашенных предметных стекол в течение более длительного периода времени не влияет на результаты окрашивания). Убедитесь, что предметные стекла полностью высохли перед помещением их под покровное стекло, так как невысохшая вода на предметных стеклах может помешать и вызвать образование 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. Обратите внимание, что некоторые гистологические среды для заливки не совместимы с анализом и не должны использоваться (см. разделы «Ограничения» и «Устранение неисправностей»).

#### ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

##### Положительный тканевый контроль

Нормальные сигналы *HER2* и хромосомы 17 (1–2 копии на клетку) служат для внутреннего положительного контроля, они обязательно должны быть видны в образце с использованием объективов 20х, 40х и (или) 60х. Однако не все клетки будут демонстрировать одну копию гена из-за биологической гетерогенности. Специфическое ядерное окрашивание может располагаться в различных клетках, включая стромальные фибробласты, эндотелиальные клетки, лимфоциты и неопухолевые эпителиальные клетки. Если положительные контроли не способны продемонстрировать положительное окрашивание, это может указывать на проблему с реагентом или аппаратом. Поскольку для каждого образца есть внутренний положительный контроль (т. е. соответствующее окрашивание ISH в здоровых клетках), это служит достоверным «положительным контролем».

При выполнении каждой процедуры окрашивания можно использовать положительный лабораторный контроль, соответствующий требованиям лаборатории. Контрольные образцы могут быть образцами, приготовленными способом, идентичным для образцов, взятых от пациентов. Эти контроли могут обеспечить мониторинг всех этапов процедуры, от подготовки образцов до окрашивания. Использование образца, приготовленного способом, отличным от способа приготовления исследуемых образцов, обеспечит контроль за реагентами,

аппаратом и процедурами, но не за фиксацией и обработкой образцов. Результаты исследуемых образцов следует анализировать в ходе того же исследования.

##### Образцы ксенотрансплантатов

Образцы ксенотрансплантатов можно использовать для предварительной валидации метода окраски препаратов с помощью VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Они также рекомендуются в качестве вспомогательных средств для выявления неисправностей при использовании в исследованиях, содержащих клинические образцы. Дополнительную информацию см. в соответствующем листке-вкладыше по микропрепарату ксенотрансплантата.

##### Необъяснимые расхождения

В случае необъяснимых различий контрольных образцов необходимо немедленно обратиться к представителю местной службы поддержки. Если результаты контроля качества не соответствуют спецификациям, результаты для пациента являются неверными. См. раздел «Поиск и устранение 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 гибридизации *in situ* (см. прилагаемый к зонду листок-вкладыш и рекомендации по контролю качества College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist<sup>25</sup>, или CLSI Approved Guideline<sup>26</sup>, или оба документа). Процедуры контроля качества следует повторять для каждой новой серии реагента и при каждом изменении параметров исследования.

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Характер окрашивания VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail носит ядерный характер.

Патологоанатом, обладающий опытом в микроскопической интерпретации патологоанатомических образцов, проведении ISH-процедур и распознавании единичных и амплифицированных копий гена *HER2* и хромосомы 17 (Chr17) (которые требуют микроскопического исследования с помощью объектива с увеличением 20х, 40х и (или) 60х), должен определить качество контролей перед интерпретацией результатов.

Примечание. Не рекомендуется использовать объектив с увеличением 100х. Все образцы тканей были исследованы в течение проверки и валидации с увеличением объектива 20х, 40х и (или) 60х.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail необходимо использовать вместе с *Interpretation Guide VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail* [PIN 1018386] для оценки предметного стекла.

В следующих разделах описывается, как проводить интерпретацию и оценку образцов. Таблица 3 иллюстрирует, как вести подсчет дискретных сигналов.

##### Определения

1. Статус гена *HER2*. Статус гена *HER2* — это соотношение количества копий гена *HER2* к количеству копий хромосомы 17 (Chr17) на одну клетку в образце инвазивной карциномы молочной железы или желудка. Статус гена *HER2* классифицируется по следующим принципам.
  - a. Соотношение  $HER2/Chr17 \geq 2,0$  определяется как «с амплификацией».
  - b. Соотношение  $HER2/Chr17 < 2,0$  определяется как «без амплификации».
2. Пригодность микропрепаратов. Образец при анализе VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail должен соответствовать трем критериям, которые будут считаться достаточными для проведения подсчета; если образец не соответствует этим критериям, подсчет произвести нельзя, а результат будет считаться неудовлетворительным.
3. Внутренний положительный контроль. Нормальные сигналы *HER2* или Chr17 (1–2 копии на клетку) служат для внутреннего положительного контроля; они обязательно должны быть видны в образце. Ядерное окрашивание может располагаться в различных неопухолевых клетках, включая: стромальные фибробласты, эндотелиальные клетки, лимфоциты и неопухолевые эпителиальные клетки.
4. Неопухолевые клетки. При использовании объектива с увеличением 20х, 40х и (или) 60х инвазивная часть опухоли должна демонстрировать поле с подающими подсчету сигналами SISH и Red ISH.



- Фоновое окрашивание. Любое окрашивание фона, полученное с помощью систем детекции SISH или Red ISH, необходимо будет оценить, чтобы определить, не мешает ли оно подсчету специфических сигналов SISH или Red ISH. Фоновое окрашивание SISH обычно по внешнему виду напоминает «пыль» SISH, которая отличима от специфического сигнала. Красное окрашивание может выглядеть как красная дымка или редко встречающиеся неспецифические сигналы, которые выглядят слабее, чем специфические сигналы.
- Рабочие области для подсчета сигналов. Приемлемая рабочая область в пределах инвазивной карциномы служит полем зрения для подсчета сигналов SISH и Red ISH. Подсчет сигналов не следует проводить в тех областях, где сигнал SISH или Red ISH ослаблен, ядра сплюснуты или растянуты или наблюдается некроз. Если одна рабочая область представляется непригодной для подсчета, часто на том же срезе можно найти другие рабочие области, вполне пригодные для этой цели. Об этом можно судить по присутствию здоровых клеток, демонстрирующих удовлетворительное окрашивание SISH и Red ISH в пределах или поблизости от рабочей области.

#### Дополнительные наблюдения для HER2 и хромосомы 7

Другие наблюдения могут быть отмечены как комментарии в заключении патоморфолога.

- Неоднородность: в некоторых случаях ткань может содержать области карциномы, которые являются генетически неоднородными в отношении числа копий гена *HER2* (*m. e.* здесь может располагаться смесь неамплифицированных и амплифицированных ядер или смесь ядер, содержащих различные копии *HER2*). Это различие можно наблюдать как между раковыми клетками в пределах одной рабочей (целевой) области, так и между различными рабочими областями.
- Анеуплоидия — это любое состояние, при котором организм имеет дополнительные специфические хромосомы или же меньшее их число, чем обычно, *m. e.* число конкретной хромосомы (в данном случае хромосомы 17) не является диплоидным. При полисомии возможны три или более копий хромосомы вместо ожидаемых двух копий. При моносомии в опухолевых клетках может обнаруживаться только одна копия хромосомы 17. Об очевидной «амплификации», кластерах или полисомии хромосомы 17 (с SISH-кластерами *HER2* или без них) не сообщалось<sup>27</sup>. В случаях с кластерами *HER2* и хромосомы 17 следует соблюдать осторожность, чтобы не рассматривать их отношение как ~1,0. В таких случаях специалисту следует пользоваться методом иммуногистохимического исследования (ИHC) для анализа гиперэкспрессии белка *HER2*, так как в большинстве случаев экспрессия белка стремится к значению 3+.
- Моноаллельная делеция: делеция гена *HER2* из хромосомы 17 в опухолевых клетках дает отношение *HER2*/Chr17 <1,0.

#### Визуализация сигнала

Сигналы SISH и Red ISH визуализируются как:

- Единичная копия. Дискретная черная точка (SISH) считается одной копией *HER2*. Дискретные единичные точки, которые проявляются в ядрах при внутреннем контроле (неопухолевом), дают представление о размере отдельной копии гена в клетках инвазивных форм рака для SISH (черного) сигнала. Для сигналов Red ISH каждый дискретный сигнал считается как одна копия. Следует отметить, что красный ISH-сигнал от Chr17 может оказаться большего размера, чем сигналы SISH, а иногда быть удлиненным по форме. Может наблюдаться розовая размытость, которую не следует принимать за сигнал. Красные сигналы, очень светлые по цвету по сравнению с сигналом в ядрах внутреннего положительного контроля и в ядрах всей картины окрашивания, не должны подсчитываться, поскольку они могут быть неспецифическими. Специфические красные сигналы имеют прерывистые края, как показано в Таблица 3.
- 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.

- 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.
- 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 пузырями, не должны учитываться.

#### Подсчет сигналов SISH и Red ISH для определения статуса гена HER2

Изучите окрашенные предметные стекла H&E (гематоксилином и эозином), чтобы найти области, содержащие инвазивную карциному молочной железы или желудка. Изучите предметное стекло, окрашенное *HER2* Dual ISH, соответствующее окрашивание с помощью H&E (гематоксилином и эозином), и определите область инвазивного рака молочной железы или желудка. Перед подсчетом сигналов *HER2* и хромосомы 17 для определения статуса гена *HER2* крайне важно, чтобы инвазивная рабочая область (пораженная ткань) была правильно окрашена и соответствовала критериям пригодности микропрепарата (критерии описаны в разделе «Определения» выше, пункт 2. «Пригодность микропрепаратов»).

Компания разработала алгоритм подсчета для данного анализа, который обеспечивает максимальную прецизионность и эффективность подсчета. Двадцать ядер, каждое из которых содержит красный (Red ISH) и черный (SISH) сигналы, должны быть подсчитаны.

#### Критерии отбора клеток

Учитывайте только ядра с диаметрами, которые являются репрезентативными для средней популяции ядер клеток инвазивной карциномы в рабочей области. Не учитывайте сигналы в ядрах, которые:

- Намного больше в диаметре, чем средний размер ядер клеток карциномы.
  - Намного меньше в диаметре, чем средний размер ядер клеток карциномы.
- Подсчитайте только ядра, представляющие популяцию ядер инвазивной карциномы с наибольшим средним числом сигналов (как SISH, так и Red ISH). В тех целевых областях, где проявляется генетическая неоднородность по отношению к числу копий гена *HER2*, подсчитывают только ядра, представляющие популяцию ядер инвазивного рака с максимальным средним числом сигналов (как SISH, так и Red ISH). Обратите внимание на то, чтобы неоднородность была отмечена в оценочном листе.

Таблица 3. Визуализация сигнала

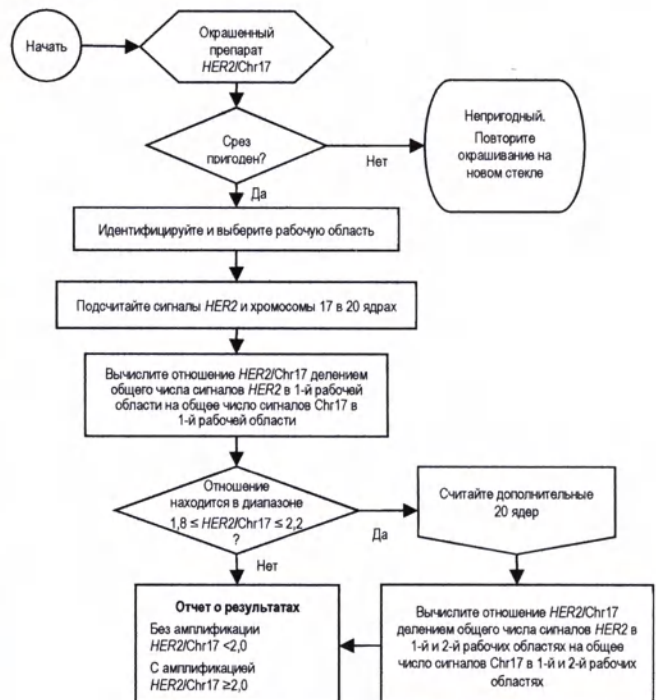
|  |                                                            |
|--|------------------------------------------------------------|
|  | Не считать, если наблюдается наложение ядер.               |
|  | Не считать, если сигнал отсутствует.                       |
|  | Не считать, если присутствуют сигналы только одного цвета. |
|  | Не считать, если сигналы расположены вне ядер.             |



|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | 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). Больше 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.                                                                                                                       |

#### Статус гена HER2: алгоритм оценки для VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

Двадцать ядер (каждое содержащее красный (Chr17) и черный (HER2) сигналы) должны быть подсчитаны. Окончательные результаты по статусу HER2 фиксируются на основе соотношения, полученного путем деления суммы сигналов HER2 для всех 20 ядер на сумму сигналов хромосомы 17 для всех 20 ядер. Статус амплификации определяется как «с амплификацией», если соотношение  $HER2/Chr17 \geq 2,0$ , и как «без амплификации», если соотношение  $HER2/Chr17 < 2,0$ . Если соотношение  $HER2/Chr17$  попадает в диапазон от 1,8 до 2,2, необходим подсчет дополнительных 40 ядер, а статус амплификации фиксируется в соответствии с описанием, приведенным выше.



#### Контроли

Нормальные клетки, расположенные внутри или рядом с целевой областью, служат в качестве внутреннего контроля окрашивания. Ядра нормальных клеток должны содержать в среднем 1–2 дискретные черные точки и 1–2 дискретные красные точки. Неспособность обнаружить единственную копию гена в нормальных клетках на любом препарате во время исследования указывает на то, что данный препарат не подходит для подсчета. Использование положительных контрольных образцов поможет в устранении потенциальных проблем с аппаратом и (или) реагентом.

#### ОГРАНИЧЕНИЯ

##### Общие ограничения

1. ISH — это многоступенчатая методика, которая требует специализированного обучения по отбору подходящих реагентов, подготовке образцов, обработке, подготовке ISH-препаратов и интерпретации результатов.
2. На результаты окрашивания ткани влияет обращение с тканью и подготовка ее к окрашиванию. Неправильное проведение процесса фиксации, замораживания, оттаивания, промывки, сушки, нагрева, микротомирования или загрязнения другими тканями или жидкостями могут привести к артефактам, накоплению реагентов, ложноотрицательным или ложноположительным результатам. Несогласующиеся результаты могут быть получены вследствие



несоблюдения режимов процессов фиксации и заливки или присущей исследуемой ткани неоднородности.

- Избыточное или неполное контрастное окрашивание может негативно повлиять на правильность интерпретации результатов.
- Клиническая интерпретация окрашивания должна проводиться с учетом истории болезни, морфологических данных и других гистопатологических критериев. Такая интерпретация должна проводиться квалифицированным специалистом-патологоанатомом, который обязан быть знаком с характеристиками используемого красителя и методикой, использованной для приготовления данного окрашенного среза. Окрашивание должно проводиться в сертифицированной и лицензированной лаборатории под наблюдением патоморфолога, который несет ответственность за просмотр окрашенных препаратов и за обеспечение адекватности контролей.
- Компания-производитель предоставляет реагенты в оптимальном разведении для проведения анализа при соблюдении инструкций. Любое отклонение от рекомендованных процедур проведения теста может привести к тому, что ожидаемые результаты будут недостоверны. Пользователи, которые отклоняются от рекомендованных процедур проведения теста, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.
- Вследствие различий в обработке образцов может возникнуть необходимость в увеличении или уменьшении времени обработки протеазами ISH. Кроме того, увеличение или уменьшение времени кондиционирования клеток повлияет на результаты окрашивания. Пользователь должен валидировать такие изменения. Пользователи, допускающие отклонения от рекомендуемых методик проведения исследования, несут ответственность за интерпретацию результатов, полученных на образцах ткани пациента.
- При использовании реагентов с тканями, которые ранее не тестировались, могут возникнуть непредвиденные реакции. В связи с биологической вариативностью 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

- Применение не всех фиксирующих веществ совместимо с данным анализом. Компания рекомендует использовать 10-процентный NBF в течение 6–72 часов.
- VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail был разработан для окрашивания участков ткани, толщина которых ~4 мкм<sup>28</sup>. В участках с толщиной срезов, превышающей 4 мкм, может наблюдаться потеря ткани.
- Анализ может регистрироваться не на каждом аппарате. Для получения дополнительной информации обратитесь к местному представителю компании Roche.
- Некоторые марки заливочных сред могут вызвать окисление, потускнение и (или) исчезновение сигнала SISH. Совместимость гистологической среды для заливки см. в Таблица 24.
- Для предотвращения сигнала Red ISH от распада окрашенные препараты не должны погружаться в ванночки со спиртом или ацетоном для дегидратации. Рекомендуется сушка на воздухе или сушка в печи. Окрашенные предметные стекла должны быть полностью сухими перед нанесением покровного стекла.
- Как и в любом тесте, отрицательный результат означает, что специфическая цель не обнаружена. Это не равнозначно отсутствию специфической цели в анализируемых клетках или ткани.
- Зонд был оптимизирован для использования с реагентами VENTANA на аппаратах BenchMark IHC/ISH. Пользователи, допускающие отклонения от рекомендуемых методик проведения исследования, несут ответственность за интерпретацию результатов, полученных на образцах ткани пациента.

#### РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определялись с помощью исследований чувствительности, специфичности и воспроизводимости. Во всех случаях, если не указано иное, окрашивание проводилось с помощью VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail по протоколу, указанному в Таблица 1, на аппаратах BenchMark IHC/ISH.

**Исследование сравнения методов: VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail на аппарате BenchMark ULTRA в сравнении с анализом, проведенным при помощи набора Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit**

Чтобы оценить чувствительность и специфичность VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail при определении статуса гена *HER2* при инвазивном раке молочной железы, было проведено исследование сравнения методов в разных лабораториях с использованием аналога Abbott/Vysis PathVysion HER-2 FISH Kit. В исследовании VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail приняли участие 3 центральных лаборатории. Шестьсот тридцать шесть случаев инвазивной карциномы молочной железы человека были предоставлены тремя клиническими лабораториями для потенциального включения в исследование на основе экспрессии белка *HER2/neu*, полученной ранее с помощью IHC (иммуногистохимии). Спонсор исследования предоставил еще 133 случая. Центральные лаборатории, проводившие VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и анализ PathVysion HER-2 FISH, были маскированы в отношении статуса IHC и оригинального идентификатора случая, чтобы предотвратить смещение в оценке образцов. Одна центральная лаборатория выполнила окрашивание IHC всех образцов, используя анализ PATHWAY HER2/neu (4B5) для проведения дополнительных анализов. Результаты окрашивания FISH и VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail были подсчитаны путем анализа по меньшей мере 20 ядер в каждом образце. Результаты были представлены следующим образом: соотношение *HER2/Chr 17*  $\geq 2,0$  с амплификацией; *HER2/Chr 17*  $< 2,0$  без амплификации. Из 678 случаев, которые были окрашены как по методу FISH, так и в VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, результаты 605 образцов были подсчитаны при проведении обоих анализов и, следовательно, включены в анализ частоты совпадений.

#### Первичные результаты

При проведении первичного анализа сравнивался процент отрицательных и положительных совпадений, чтобы продемонстрировать эквивалентные результаты между анализами VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и PathVysion HER-2 FISH. Для каждого анализа данные по клиническим оценкам «с амплификацией» и «без амплификации», обобщенные из всех лабораторий, представлены ниже в таблице 2x2, включая процент отрицательных и положительных совпадений, где PathVysion HER-2 FISH — это контрольный анализ. Критерии приемлемости для демонстрации эквивалентного выполнения этих двух методов анализа при использовании аппарата BenchMark ULTRA требовали, чтобы нижние границы 95-процентного доверительного интервала оценки составляли 85 % или выше при обобщении данных из всех трех лабораторий. Критерии приемлемости были соблюдены (Таблица 4). Кроме того, частота всех отрицательных и положительных процентных согласованностей лабораторий превышала 85 % (Таблица 5).

**Таблица 4** Совпадения между VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit в когорте образцов карциномы молочной железы человека.

| Результат для VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail | Результат для PathVysion HER-2 FISH |                  |       |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------|-------|
|                                                        | С амплификацией                     | Без амплификации | Всего |
| С амплификацией                                        | 270                                 | 12               | 282   |
| Без амплификации                                       | 32                                  | 291              | 323   |
| Всего                                                  | 302                                 | 303              | 605   |



|                                          | n/N     | % (ДИ подсчета 95 %) |
|------------------------------------------|---------|----------------------|
| Положительная процентная согласованность | 270/302 | 89,4 (85,4, 92,4)    |
| Отрицательная процентная согласованность | 291/303 | 96,0 (93,2, 97,7)    |

Таблица 5. Резюме отрицательной, положительной и общей частоты процентных согласованностей анализов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit для образцов карциномы молочной железы человека, представленных лабораторией.

| VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail по сравнению с PathVysion HER-2 FISH | Положительная процентная согласованность | Отрицательная процентная согласованность | Общая процентная согласованность |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------|
| Лаборатория А: n/N (%) (95 % ДИ)                                              | 92/100 (92,0 %) (85,0, 95,9)             | 92/93 (98,9 %) (94,2, 99,8)              | 184/193 (95,3 %) (91,4, 97,5)    |
| Лаборатория В: n/N (%) (95 % ДИ)                                              | 93/103 (90,3 %) (83,0, 94,6)             | 108/119 (90,8 %) (84,2, 94,8)            | 201/222 (90,5 %) (86,0, 93,7)    |
| Лаборатория С: n/N (%) (95 % ДИ)                                              | 85/99 (85,9 %) (77,7, 91,4)              | 91/91 (100,0 %) (95,9, 100,0)            | 176/190 (92,6 %) (88,0, 95,6)    |

Эти данные свидетельствуют о высокой частоте процентных согласованностей между VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и PathVysion HER-2 FISH Kit в определении статуса гена HER2 в образцах рака молочной железы человека.

#### Вторичные результаты

Общая процентная согласованность между VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и PathVysion HER-2 FISH Kit обобщающим данные из всех клинических лабораторий, составил 92,7 % (90,4, 94,5).

#### Вторичные результаты: ИHC по сравнению с ISH для определения статуса гена HER2

Исследование сравнения методов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и PathVysion FISH было разработано также для оценки случаев на основе ИHC-анализа для подсчета уровней белка HER2. Это позволило провести вторичный анализ для сравнения обоих анализов ISH и ИHC для определения частоты согласованностей в отношении статуса гена HER2. Анализы сравнивали в соответствии с рекомендациями FDA, где случаи 2+/3+ считались положительными в отношении гиперэкспрессии HER2. В начале, при использовании руководства FDA для оценки, PathVysion HER-2 FISH использовался в качестве эталонного стандарта, демонстрирующего, что частота положительных процентных согласованностей и 95-процентный доверительный интервал для PATHWAY HER2/neu (4B5) по сравнению с FISH были 91,1 % (87,4, 93,8) (Таблица 6). Аналогично, когда использовался VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail в качестве эталонного стандарта, частота положительных процентных согласованностей для PATHWAY HER2/neu (4B5) по сравнению с VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail была 93,2 % (89,6, 95,7) (Таблица 7).

Таблица 6. Сравнение анализа ИHC на аппарате BenchMark ULTRA с анализом FISH в соответствии с руководством FDA: обобщенные данные от всех лабораторий.

|                                          |                              | Результат для PathVysion HER-2 FISH |                      |       |
|------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|----------------------|-------|
|                                          |                              | С амплификацией                     | Без амплификации     | Всего |
| Результаты для PATHWAY HER2/neu (4B5)    | Положительные (2+/3+ случая) | 277                                 | 63                   | 340   |
|                                          | Отрицательные (0/1+)         | 27                                  | 238                  | 265   |
|                                          | Всего                        | 304                                 | 301                  | 605   |
|                                          |                              | n/N                                 | % (ДИ подсчета 95 %) |       |
| Положительная процентная согласованность |                              | 277/304                             | 91,1 (87,4, 93,8)    |       |

Таблица 7. Сравнение анализа ИHC на аппарате BenchMark ULTRA с VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail в соответствии с руководством FDA: обобщенные данные от всех лабораторий.

|                                          |                              | Результат для VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail |                      |       |
|------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------|-------|
|                                          |                              | С амплификацией                                        | Без амплификации     | Всего |
| Результаты для PATHWAY HER2/neu (4B5)    | Положительные (2+/3+ случая) | 248                                                    | 78                   | 326   |
|                                          | Отрицательные (0/1+)         | 18                                                     | 253                  | 271   |
|                                          | Всего                        | 266                                                    | 331                  | 597   |
|                                          |                              | n/N                                                    | % (ДИ подсчета 95 %) |       |
| Положительная процентная согласованность |                              | 248/266                                                | 93,2 (89,6, 95,7)    |       |

#### Исследование сравнения методов: анализ VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail на аппарате BenchMark ULTRA в сравнении с анализом, проведенным при помощи набора Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Kit

Чтобы оценить чувствительность и специфичность VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail при определении статуса гена HER2 при карциноме желудка, было проведено исследование сравнения методов с использованием Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Kit для флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Сопоставимость результатов анализа образцов ткани желудка, желудка и гастроэзофагеального перехода была определена путем сравнения результатов окрашивания двух анализов (Таблица 8). Сто тридцать четыре образца ткани желудка и 12 образцов ткани гастроэзофагеального перехода (смесь случаев с амплификацией и без) были окрашены с использованием VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Эту же когорту случаев окрасили с применением анализа Dako HER2 IQFISH pharmDx™. Результаты, подробно описывающие частоту отрицательных, положительных и общих процентных согласованностей для 146 клинических образцов из этой когорты, которые были подсчитаны как с помощью анализа Dako HER2 IQFISH pharmDx™, так и с помощью VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, показаны в Таблица 8 и Таблица 9.

Таблица 8. Совпадения между анализами VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и Dako HER2 IQFISH pharmDx™ в когорте образцов случаев карциномы желудка.

| Статус амплификации для VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail | Анализ Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Статус амплификации |                  |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------|
|                                                                  | С амплификацией                                      | Без амплификации |
| С амплификацией                                                  | 49                                                   | 8                |



| Статус амплификации для VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail | Анализ Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Статус амплификации |                  |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------|
|                                                                  | С амплификацией                                      | Без амплификации |
| Без амплификации                                                 | 5                                                    | 84               |

Таблица 9. Резюме отрицательной, положительной и общей частоты процентной согласованности анализов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail и Dako HER2 IQFISH pharmDx™ для образцов карциномы желудка человека.

|                                          | Частота процентной отрицательной согласованности |                              | Частота положительной процентной согласованности |                              | Частота общей процентной согласованности   |                              |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------|
|                                          | Необработанные данные / количество случаев       | Процентов (ДИ подсчета 95 %) | Необработанные данные / количество случаев       | Процентов (ДИ подсчета 95 %) | Необработанные данные / количество случаев | Процентов (ДИ подсчета 95 %) |
| VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail | 84/92                                            | 91,3 (83,8–95,5)             | 49/54                                            | 90,7 (80,1–96,0)             | 133/146                                    | 91,1 (85,4–94,7)             |

#### Повторяемость и прецизионность для аппарата BenchMark IHC/ISH при карциноме молочной железы

Повторяемость и прецизионность VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail была оценена на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX в сочетании с VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Повторяемость в пределах одного цикла определялась с использованием образцов карциномы молочной железы. Два одинаковых предметных стекла из каждого образца ткани карциномы молочной железы окрашивали с VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail на одном аппарате BenchMark ULTRA, XT или GX. Для анализа данных аппарата BenchMark XT и GX, вес пограничных отношений был определен с учетом их распространенности.

Также оценивали прецизионность между испытаниями в разные дни с использованием образцов ткани карциномы молочной железы. Повторяющиеся предметные стекла от каждого образца окрашивали с VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX в течение 5 непоследовательных дней. Для анализа данных аппарата BenchMark XT и GX вес пограничных отношений был определен с учетом их распространенности.

Повторяемость в пределах одного цикла определялась по среднему количеству положительных согласованностей (APA), среднему количеству отрицательных согласованностей (ANA) и общей процентной согласованности (OPA).

Прецизионность между испытаниями в разные дни определяли по проценту положительных согласованностей (PPA), проценту отрицательных согласованностей (NPA), общей процентной согласованности (OPA) во всех наблюдениях в исследуемой популяции. Резюме полученных результатов обоих исследований приведено в Таблица 10.

Таблица 10. Повторяемость в пределах одного цикла и прецизионность между испытаниями в разные дни на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX.

| Платформа | Повторяемость/прецизионность          | Клинический статус | Совпадения |         |     |             |
|-----------|---------------------------------------|--------------------|------------|---------|-----|-------------|
|           |                                       |                    | Тип        | n/N     | %   | 95 % ДИ     |
| ULTRA     | Повторяемость в пределах одного цикла | С амплификацией    | APA        | 146/146 | 100 | (97,4, 100) |
|           |                                       | Без амплификации   | ANA        | 188/188 | 100 | (98,0, 100) |
|           |                                       | Всего              | OPA        | 167/167 | 100 | (97,8, 100) |
| ULTRA     | Прецизионность                        | С амплификацией    | PPA        | 144/144 | 100 | (97,4, 100) |

| Платформа | Повторяемость/прецизионность                          | Клинический статус | Совпадения |             |      |             |
|-----------|-------------------------------------------------------|--------------------|------------|-------------|------|-------------|
|           |                                                       |                    | Тип        | n/N         | %    | 95 % ДИ     |
|           | между несколькими циклами в разные дни                | Без амплификации   | NPA        | 189/191     | 99,0 | (96,7, 100) |
|           |                                                       | Всего              | OPA        | 333/335     | 99,4 | (98,2, 100) |
| XT        | Повторяемость в пределах одного цикла                 | С амплификацией    | APA        | 128,8/128,8 | 100  | (97,1, 100) |
|           |                                                       | Без амплификации   | ANA        | 151,2/151,2 | 100  | (97,5, 100) |
|           |                                                       | Всего              | OPA        | 140,0/140,0 | 100  | (97,3, 100) |
| XT        | Прецизионность между несколькими циклами в разные дни | С амплификацией    | PPA        | 128,8/128,8 | 100  | (97,1, 100) |
|           |                                                       | Без амплификации   | NPA        | 151,2/151,2 | 100  | (97,5, 100) |
|           |                                                       | Всего              | OPA        | 280,0/280,0 | 100  | (98,6, 100) |
| GX        | Повторяемость в пределах одного цикла                 | С амплификацией    | APA        | 128,8/128,8 | 100  | (97,1, 100) |
|           |                                                       | Без амплификации   | ANA        | 151,2/151,2 | 100  | (97,5, 100) |
|           |                                                       | Всего              | OPA        | 140,0/140,0 | 100  | (97,3, 100) |
| GX        | Прецизионность между несколькими циклами в разные дни | С амплификацией    | PPA        | 128,8/128,8 | 100  | (97,1, 100) |
|           |                                                       | Без амплификации   | NPA        | 151,2/151,2 | 100  | (97,5, 100) |
|           |                                                       | Всего              | OPA        | 280,0/280,0 | 100  | (98,6, 100) |

Примечание. 95 % ДИ рассчитывали для процентилей методом бутстреп. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона.

В исследование были включены четыре случая с пограничным статусом.

#### Прецизионность между несколькими аппаратами при карциноме молочной железы

Прецизионность между несколькими аппаратами BenchMark IHC/ISH VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определили путем окрашивания повторяющихся предметных стекол образцов BC на 3 аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX при использовании VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail с VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Прецизионность между несколькими аппаратами определяли с помощью PPA, NPA и OPA во всех наблюдениях в исследуемой популяции. Для случаев пограничного отношения был определен вес данных по их распространенности. Резюме полученных результатов данного исследования приведено в Таблица 11.

Таблица 11. Прецизионность между несколькими аппаратами BenchMark IHC/ISH

| Платформа | Прецизионность                              | Клинический статус | Совпадения |             |      |             |
|-----------|---------------------------------------------|--------------------|------------|-------------|------|-------------|
|           |                                             |                    | Тип        | n/N         | %    | 95 % ДИ     |
| ULTRA     | Прецизионность между несколькими аппаратами | С амплификацией    | PPA        | 72,0/72,0   | 100  | (94,9, 100) |
|           |                                             | Без амплификации   | NPA        | 94,0/96,0   | 97,9 | (95,8, 100) |
|           |                                             | Всего              | OPA        | 166,0/168,0 | 98,8 | (97,6, 100) |
|           |                                             | Всего              | OPA        | 166,0/168,0 | 98,8 | (97,6, 100) |



| Платформа | Прецизионность                              | Клинический статус | Совпадения |             |     |               |
|-----------|---------------------------------------------|--------------------|------------|-------------|-----|---------------|
|           |                                             |                    | Тип        | n/N         | %   | 95 % ДИ       |
| ХТ        | Прецизионность между несколькими аппаратами | С амплификацией    | PPA        | 77,3/77,3   | 100 | (95,3, 100,0) |
|           |                                             | Без амплификации   | NPA        | 90,7/90,7   | 100 | (95,9, 100,0) |
|           |                                             | Всего              | OPA        | 168,0/168,0 | 100 | (97,8, 100,0) |
| GX        | Прецизионность между несколькими аппаратами | С амплификацией    | PPA        | 76,2/76,2   | 100 | (95,2, 100)   |
|           |                                             | Без амплификации   | NPA        | 90,7/90,7   | 100 | (95,9, 100)   |
|           |                                             | Всего              | OPA        | 166,9/166,9 | 100 | (97,8, 100)   |

Примечание. 95 % ДИ рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона. В исследование были включены четыре случая с пограничным статусом.

#### Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями при карциноме молочной железы

Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями на аппарате BenchMark IHC/ISH при использовании VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определили путем оценки 3 исследователями образцов ткани карциномы молочной железы, окрашенных VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, с использованием VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit на аппарате BenchMark ULTRA. Для определения прецизионности в пределах одного исследователя один и тот же набор предметных стекол оценивался исследователем дважды после минимум двух недель перерыва между оценками. Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями определяли с помощью APA, ANA и OPA во всех наблюдениях в исследуемой популяции. Резюме полученных результатов данного исследования приведено в Таблица 12.

Таблица 12. Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями на аппарате BenchMark ULTRA

| Прецизионность                  | Клинический статус | Совпадения |         |      |               |
|---------------------------------|--------------------|------------|---------|------|---------------|
|                                 |                    | Тип        | n/N     | %    | 95 % ДИ       |
| Между исследователями           | С амплификацией    | APA        | 146/158 | 92,4 | (90,2, 94,7)  |
|                                 | Без амплификации   | ANA        | 166/178 | 93,3 | (90,7, 95,7)  |
|                                 | Всего              | OPA        | 156/168 | 92,9 | (90,5, 95,2)  |
| В пределах одного исследователя | С амплификацией    | APA        | 76/78   | 97,4 | (95,0, 100,0) |
|                                 | Без амплификации   | ANA        | 88/90   | 97,8 | (95,5, 100,0) |
|                                 | Всего              | OPA        | 82/84   | 97,6 | (95,2, 100,0) |

Примечание. 95 % ДИ рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона.

#### Межплатформенная прецизионность при карциноме молочной железы

Межплатформенную прецизионность на аппарате BenchMark IHC/ISH при использовании VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определили путем оценки образцов ткани карциномы молочной железы, окрашенных с помощью VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail с использованием VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit на аппаратах BenchMark ULTRA, ХТ и GX. Межплатформенную прецизионность определяли с помощью PPA, NPA и OPA во всех наблюдениях в исследуемой популяции. Для случаев пограничного отношения был определен вес данных по их распространенности. Резюме полученных результатов данного исследования приведено в Таблица 13.

Таблица 13. Межплатформенная прецизионность аппарата BenchMark IHC/ISH

| Прецизионность                  | Клинический статус | Совпадения |             |      |             |
|---------------------------------|--------------------|------------|-------------|------|-------------|
|                                 |                    | Тип        | n/N         | %    | 95 % ДИ     |
| Межплатформенная прецизионность | С амплификацией    | PPA        | 230,8/230,8 | 100  | (98,4, 100) |
|                                 | Без амплификации   | NPA        | 271,0/272,2 | 99,6 | (98,3, 100) |
|                                 | Всего              | OPA        | 501,8/502,9 | 99,8 | (99,2, 100) |

Примечание. 95 % ДИ рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона. В исследование были включены четыре случая с пограничным статусом.

#### Повторяемость и прецизионность для аппарата BenchMark IHC/ISH при карциноме желудка

Повторяемость и прецизионность VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail была оценена на аппаратах BenchMark ULTRA, ХТ и GX в сочетании с VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Повторяемость в пределах одного цикла была оценена с использованием образцов карциномы желудка. Два одинаковых предметных стекла из каждого образца ткани карциномы желудка окрашивали с VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail на одном аппарате BenchMark ULTRA, ХТ или GX. Для случаев пограничного отношения был определен вес данных по их распространенности.

Также оценивали прецизионность между испытаниями в разные дни с использованием образцов ткани карциномы желудка. Повторяющиеся предметные стекла от каждого из образцов окрашивали с VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail на аппаратах BenchMark ULTRA, ХТ и GX в течение 5 непоследовательных дней. Для случаев пограничного отношения был определен вес данных по их распространенности.

Повторяемость в пределах одного цикла определялась по среднему количеству положительных согласованностей (APA), среднему количеству отрицательных согласованностей (ANA) и общей процентной согласованности (OPA). Прецизионность между испытаниями в разные дни определяли по проценту положительных согласованностей (PPA), проценту отрицательных согласованностей (NPA), общей процентной согласованности (OPA) во всех наблюдениях в исследуемой популяции. Резюме полученных результатов обоих исследований приведено в Таблица 14.

Таблица 14. Повторяемость в пределах одного цикла и прецизионность между

| Платформа | Повторяемость/прецизионность          | Клинический статус | Совпадения |           |     |             |
|-----------|---------------------------------------|--------------------|------------|-----------|-----|-------------|
|           |                                       |                    | Тип        | n/N       | %   | 95 % ДИ     |
| ULTRA     | Повторяемость в пределах одного цикла | С амплификацией    | APA        | 70,0/70,0 | 100 | (94,8, 100) |
|           |                                       | Без амплификации   | ANA        | 70,0/70,0 | 100 | (94,8, 100) |
|           |                                       | Всего              | OPA        | 70,0/70,0 | 100 | (94,8, 100) |
| ULTRA     | Прецизионность                        | С амплификацией    | PPA        | 70,0/70,0 | 100 | (94,8, 100) |



| Платформа | Повторяемость/прецизионность                            | Клинический статус | Совпадения |             |      |             |
|-----------|---------------------------------------------------------|--------------------|------------|-------------|------|-------------|
|           |                                                         |                    | Тип        | n/N         | %    | 95 % ДИ     |
|           | между несколькими и циклами в разные дни                | Без амплификации   | NPA        | 70,0/70,0   | 100  | (94,8, 100) |
|           |                                                         | Всего              | OPA        | 140,0/140,0 | 100  | (97,3, 100) |
| XT        | Повторяемость в пределах одного цикла                   | С амплификацией    | APA        | 70,0/70,0   | 100  | (94,8, 100) |
|           |                                                         | Без амплификации   | ANA        | 70,0/70,0   | 100  | (94,8, 100) |
|           |                                                         | Всего              | OPA        | 70,0/70,0   | 100  | (94,8, 100) |
| XT        | Прецизионность между несколькими и циклами в разные дни | С амплификацией    | PPA        | 70,0/70,0   | 100  | (94,8, 100) |
|           |                                                         | Без амплификации   | NPA        | 70,0/70,0   | 100  | (94,8, 100) |
|           |                                                         | Всего              | OPA        | 140,0/140,0 | 100  | (97,3, 100) |
| GX        | Повторяемость в пределах одного цикла                   | С амплификацией    | APA        | 64,6/65,1   | 99,1 | (95,9, 100) |
|           |                                                         | Без амплификации   | ANA        | 70,0/70,6   | 99,2 | (95,2, 100) |
|           |                                                         | Всего              | OPA        | 67,3/67,9   | 99,2 | (96,9, 100) |
| GX        | Прецизионность между несколькими и циклами в разные дни | С амплификацией    | PPA        | 67,3/67,9   | 99,2 | (96,5, 100) |
|           |                                                         | Без амплификации   | NPA        | 70,0/70,0   | 100  | (94,8, 100) |
|           |                                                         | Всего              | OPA        | 137,3/137,9 | 99,6 | (98,5, 100) |

Примечание. 95 % ДИ рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона. В исследование были включены два случая с пограничным статусом.

#### Прецизионность между несколькими аппаратами при карциноме желудка

Прецизионность между несколькими аппаратами BenchMark IHC/ISH при использовании VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определили путем окрашивания повторяющихся предметных стекол образцов карциномы желудка на 3 аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX при помощи VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail с VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Прецизионность между несколькими аппаратами определяли с помощью PPA, NPA и OPA во всех наблюдениях в исследуемой популяции. Для случаев пограничного отношения был определен вес данных по их распространенности. Резюме полученных результатов данного исследования приведено в Таблица 15.

Таблица 15. Прецизионность между несколькими аппаратами BenchMark IHC/ISH

| Платформа | Прецизионность                              | Клинический статус | Совпадения |           |      |             |
|-----------|---------------------------------------------|--------------------|------------|-----------|------|-------------|
|           |                                             |                    | Тип        | n/N       | %    | 95 % ДИ     |
| ULTRA     | Прецизионность между несколькими аппаратами | С амплификацией    | PPA        | 42,0/42,0 | 100  | (91,6, 100) |
|           |                                             | Без амплификации   | NPA        | 42,0/42,0 | 100  | (91,6, 100) |
|           |                                             | Всего              | OPA        | 84,0/84,0 | 100  | (95,6, 100) |
| XT        | Прецизионность между несколькими аппаратами | С амплификацией    | PPA        | 40,4/40,9 | 98,6 | (94,1, 100) |
|           |                                             | Без амплификации   | NPA        | 40,9/40,9 | 100  | (91,4, 100) |
|           |                                             | Всего              | OPA        | 81,3/81,9 | 99,3 | (97,5, 100) |

| Платформа | Прецизионность                              | Клинический статус | Совпадения |           |     |             |
|-----------|---------------------------------------------|--------------------|------------|-----------|-----|-------------|
|           |                                             |                    | Тип        | n/N       | %   | 95 % ДИ     |
| GX        | Прецизионность между несколькими аппаратами | С амплификацией    | PPA        | 40,9/40,9 | 100 | (91,4, 100) |
|           |                                             | Без амплификации   | NPA        | 42,0/42,0 | 100 | (91,6, 100) |
|           |                                             | Всего              | OPA        | 82,9/82,9 | 100 | (95,6, 100) |

Примечание. 95 % ДИ рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона. В исследование были включены два случая с пограничным статусом.

#### Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями при карциноме желудка

Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями на аппарате BenchMark IHC/ISH при помощи VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определили путем оценки 3 исследователями образцов ткани карциномы желудка, окрашенных VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, с использованием VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit на аппарате BenchMark ULTRA. Все предметные стекла были рандомизированы и заклеены в отношении диагноза. Для определения прецизионности в пределах одного исследователя один и тот же набор предметных стекол оценивался исследователем дважды после минимум двух недель перерыва между оценками. Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями определяли с помощью APA, ANA и OPA во всех наблюдениях в исследуемой популяции. Резюме полученных результатов данного исследования приведено в Таблица 16.

Таблица 16. Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями на аппарате BenchMark ULTRA

| Прецизионность                  | Клинический статус | Совпадения |       |      |               |
|---------------------------------|--------------------|------------|-------|------|---------------|
|                                 |                    | Тип        | n/N   | %    | 95 % ДИ       |
| Между исследователями           | С амплификацией    | APA        | 80/84 | 95,2 | (90,5, 100,0) |
|                                 | Без амплификации   | ANA        | 80/84 | 95,2 | (90,5, 100,0) |
|                                 | Всего              | OPA        | 80/84 | 95,2 | (90,5, 100,0) |
| В пределах одного исследователя | С амплификацией    | APA        | 82/84 | 97,6 | (95,2, 100,0) |
|                                 | Без амплификации   | ANA        | 82/84 | 97,6 | (95,2, 100,0) |
|                                 | Всего              | OPA        | 82/84 | 97,6 | (95,2, 100,0) |

Примечание. 95 % ДИ рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона.

#### Межплатформенная прецизионность при карциноме желудка

Межплатформенную прецизионность на аппарате BenchMark IHC/ISH при помощи VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определили путем оценки образцов ткани карциномы желудка, окрашенных с помощью VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail с использованием VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit на аппаратах BenchMark ULTRA, XT и GX. Межплатформенную прецизионность определяли с помощью PPA, NPA и OPA во всех наблюдениях в исследуемой популяции. Для случаев пограничного отношения был определен вес данных по их распространенности. Резюме полученных результатов данного исследования приведено в Таблица 17.

Таблица 17. Межплатформенная прецизионность аппарата BenchMark IHC/ISH



| Прецизионность                  | Клинический статус | Совпадения |             |      |             |
|---------------------------------|--------------------|------------|-------------|------|-------------|
|                                 |                    | Тип        | n/N         | %    | 95 % ДИ     |
| Межплатформенная прецизионность | С амплификацией    | PPA        | 123,3/123,9 | 99,5 | (98,1, 100) |
|                                 | Без амплификации   | NPA        | 124,9/124,9 | 100  | (97,0, 100) |
|                                 | Всего              | OPA        | 248,2/248,8 | 99,8 | (99,2, 100) |

Примечание. 95 % ДИ рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона. В исследование были включены два случая с пограничным статусом.

#### Прецизионность от серии к серии при карциноме молочной железы

Прецизионность от серии к серии была определена путем исследования 3 производственных серий VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit на аппаратах BenchMark ULTRA. Образцы ткани карциномы молочной железы были окрашены с использованием каждого зонда и набора для обнаружения. Резюме результатов прецизионности от серии к серии анализа представлены в Таблица 18.

Таблица 18. Прецизионность от серии к серии

| Прецизионность                    | Клинический статус | Совпадения |         |     |           |
|-----------------------------------|--------------------|------------|---------|-----|-----------|
|                                   |                    | Тип        | n/N     | %   | 95 % ДИ   |
| Воспроизводимость между партиями. | С амплификацией    | PPA        | 121/121 | 100 | 96,9; 100 |
|                                   | Без амплификации   | NPA        | 123/123 | 100 | 97,0; 100 |
|                                   | Всего              | OPA        | 244/244 | 100 | 98,5; 100 |

Примечание. 95 % ДИ рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона. В исследование были включены четыре случая с пограничным статусом.

#### Исследование межлабораторной воспроизводимости при карциноме молочной железы и карциноме желудка на аппарате BenchMark ULTRA

Исследование межлабораторной повторяемости было проведено для оценки повторяемости VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail для определения статуса гена *HER2* в ткани карциномы молочной железы и карциномы желудка, окрашенных на аппарате BenchMark ULTRA в сочетании с VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Использовали образцы фиксированной формалином и залитой в парафин ткани карциномы молочной железы и желудка, приблизительно в половине случаев была амплификация экспрессии гена *HER2*, а оставшаяся половина была без амплификации гена *HER2*.

Было сделано несколько срезов каждого образца, их направили в 3 внешних исследовательских центра. В каждом исследовательском центре образцы случаев рака молочной железы и случаев рака желудка окрашивали в 5 непоследовательных дней с промежутком между ними не менее 20 дней. После окрашивания на аппарате BenchMark ULTRA исследователь проводил оценку препаратов для определения статуса гена *HER2*.

Резюме результатов данного исследования см. в Таблица 19 и Таблица 20 далее. Данные оценивали по проценту положительных согласованностей (PPA) и проценту отрицательных согласованностей (NPA) во всех наблюдениях. Для каждого случая сравнивали подлежащие оценке наблюдения (усиленные с неусиленными) с модальным результатом этого случая. Для случаев пограничного отношения был определен вес данных по их распространенности. Результаты этих сравнений объединялись по исследовательским центрам и дням, затем была сделана сводка результатов между случаями.

Таблица 19. Межлабораторная повторяемость: частота совпадений на аппарате BenchMark ULTRA при карциноме молочной железы

| Межлабораторная воспроизводимость       |               | Совпадения |             |      |               |
|-----------------------------------------|---------------|------------|-------------|------|---------------|
|                                         |               | Тип        | n/N         | %    | 95 % ДИ       |
| Между лабораториями (3 лаборатории)     |               | PPA        | 208,9/208,9 | 100  | (98,2, 100,0) |
|                                         |               | NPA        | 198,1/200,3 | 98,9 | (96,8, 100,0) |
|                                         |               | OPA        | 407,0/409,3 | 99,5 | (98,4, 100,0) |
| Межсуточная (5 непоследовательных дней) | Лаборатория А | PPA        | 72/74       | 97,3 | (92,3, 100,0) |
|                                         |               | NPA        | 63/63       | 100  | (94,3, 100,0) |
|                                         |               | OPA        | 135/137     | 98,5 | (95,6, 100,0) |
|                                         | Лаборатория В | PPA        | 70/70       | 100  | (94,8, 100,0) |
|                                         |               | NPA        | 63/64       | 98,4 | (95,8, 100,0) |
|                                         |               | OPA        | 133/134     | 99,3 | (97,8, 100,0) |
|                                         | Лаборатория С | PPA        | 70/70       | 100  | (94,8, 100,0) |
|                                         |               | NPA        | 69/69       | 100  | (94,7, 100,0) |
|                                         |               | OPA        | 139/139     | 100  | (97,3, 100,0) |

Таблица 20. Межлабораторная повторяемость: частота совпадений на аппарате BenchMark ULTRA при карциноме желудка

| Межлабораторная воспроизводимость          |               | Совпадения |             |      |               |
|--------------------------------------------|---------------|------------|-------------|------|---------------|
|                                            |               | Тип        | n/N         | %    | 95 % ДИ       |
| Между лабораториями<br>(3 лаборатории)     |               | PPA        | 206,8/206,8 | 100  | (98,2, 100,0) |
|                                            |               | NPA        | 208,4/208,9 | 99,7 | (99,2, 100,0) |
|                                            |               | OPA        | 415,1/415,7 | 99,9 | (99,6, 100,0) |
| Межсуточная<br>(5 непоследовательных дней) | Лаборатория А | PPA        | 70/70       | 100  | (94,8, 100,0) |
|                                            |               | NPA        | 69/70       | 98,6 | (96,0, 100,0) |
|                                            |               | OPA        | 139/140     | 99,3 | (97,9, 100,0) |
|                                            | Лаборатория В | PPA        | 67/67       | 100  | (94,6, 100,0) |
|                                            |               | NPA        | 69/69       | 100  | (94,7, 100,0) |
|                                            |               | OPA        | 136/136     | 100  | (97,3, 100,0) |
|                                            | Лаборатория С | PPA        | 70/70       | 100  | (94,8, 100,0) |
|                                            |               | NPA        | 70/70       | 100  | (94,8, 100,0) |
|                                            |               | OPA        | 140/140     | 100  | (97,3, 100,0) |

#### Аналитическая чувствительность/специфичность

Аналитическая чувствительность (эффективность гибридизации) VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail была определена путем окрашивания нормальных метафазных пластинок человека на аппарате BenchMark XT. Из 125 проанализированных метафазных пластинок 100 % выявили специфическую колокализацию как зонда *HER2*, так и зонда хромосомы 17.

Аналитическая чувствительность измеряет способность зонда обнаруживать конкретную цель, в то время как специфичность заключается в его способности отличать цель от других последовательностей в образце. Тест обладает аналитической чувствительностью и контролем специфичности, включенным в каждую ткань человека. Нормальные клетки человека (включая стромальные



фибробласты, эндотелиальные клетки, лимфоциты и неопуховые эпителиальные клетки молочной железы) должны содержать 1–2 копии *HER2* и *Chr17*. Таким образом, 1–2 копии *HER2* и *Chr17* в нормальных человеческих клетках указывают на то, что зонды обнаруживают свою специфическую цель (мера чувствительности). От одной до двух копий *HER2* и *Chr17* в обычных клетках также указывает на то, что зонд обнаруживает только свои специфические цели (мера специфичности). Уровень первого прохода для VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail в 40 образцах тканей молочной железы, зафиксированных в рекомендациях ASCO CAP (10-процентный NBF в течение 6–72 часов), составил 100 % (91,2–100) на приборах BenchMark ULTRA, 100 % (91,2–100) на приборах BenchMark XT и 97,5 % (87,1–99,6) на приборах BenchMark GX. Специфичность этих же 40 образцов ткани молочной железы без контроля зонда составила 100 % (91,2–100) на приборах BenchMark ULTRA.

Уровень первого прохода для VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail в 39 образцах тканей желудка, зафиксированных в рекомендациях ASCO CAP (10-процентный NBF в течение 6–72 часов), составил 97,4 % (86,8–99,5) на аппаратах BenchMark ULTRA, 97,4 % (86,8–99,5) на приборах BenchMark XT и 100 % (91–100) на приборах BenchMark GX.

Аналитическая чувствительность и специфичность была также оценена путем окрашивания множества случаев нормальной и опухолевой ткани человека с VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Результаты приведены в Таблица 21 и Таблица 22. Неожиданное окрашивание не наблюдали при VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail при окрашивании нормальных и опухолевых тканей.

\* Количество случаев инвазивной карциномы молочной железы и аденокарциномы желудка, включенных в исследование, описано выше.

Таблица 21. Аналитическую чувствительность/специфичность VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определяли путем окрашивания зафиксированных формалином и залитых в парафин здоровых тканей.

| Ткань                        | Кол-во приемлемых случаев/общее кол-во случаев | Ткань                 | Кол-во приемлемых случаев/общее кол-во случаев |
|------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------|
| Надпочечник                  | 3/3                                            | Легкое                | 3/3                                            |
| Мочевой пузырь               | 3/3                                            | Лимфоузел             | 3/3                                            |
| Костный мозг                 | 3/3                                            | Мезотелий             | 3/3                                            |
| Яичник                       | 3/3                                            | Поджелудочная железа  | 3/3                                            |
| Молочная железа              | 3/3                                            | Паращитовидная железа | 3/3                                            |
| Мозжечок                     | 3/3                                            | Периферический нерв   | 3/3                                            |
| Головной мозг                | 3/3                                            | Простата              | 3/3                                            |
| Шейка матки                  | 3/3                                            | Скелетная мускулатура | 3/3                                            |
| Толстая кишка                | 3/3                                            | Кожа                  | 3/3                                            |
| Эндометрий                   | 3/3                                            | Селезенка             | 3/3                                            |
| Пищевод                      | 3/3                                            | Желудок               | 3/3                                            |
| Сердце                       | 3/3                                            | Яичко                 | 3/3                                            |
| Гипофиз (питуитарная железа) | 3/3                                            | Тимус                 | 3/3                                            |
| Стенка кишечника             | 3/3                                            | Щитовидная железа     | 3/3                                            |
| Почка                        | 3/3                                            | Язык/слюнная железа   | 3/3                                            |
| Печень                       | 3/3                                            | Миндалины             | 3/3                                            |

Таблица 22. Аналитическую чувствительность/специфичность VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail определяли путем окрашивания зафиксированных формалином и залитых в парафин различных опухолевых тканей.

| Патология                                                                    | Кол-во приемлемых случаев/общее кол-во случаев |
|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Глиобластома (головной мозг)                                                 | 3/3                                            |
| Менингиома (головной мозг)                                                   | 1/1                                            |
| Олигодендроглиома (головной мозг)                                            | 1/1                                            |
| Эндометриодная карцинома (яичники)                                           | 1/1                                            |
| Аденокарцинома (яичники)                                                     | 1/1                                            |
| Нейроэндокринное новообразование поджелудочной железы (поджелудочная железа) | 1/1                                            |
| Аденокарцинома (поджелудочная железа)                                        | 1/1                                            |
| Семиниома (яички)                                                            | 1/1                                            |
| Эмбриональная карцинома (яички)                                              | 1/1                                            |
| Медуллярная карцинома (щитовидная железа)                                    | 1/1                                            |
| Папиллярная карцинома (щитовидная железа)                                    | 1/1                                            |
| Протоковая карцинома (молочная железа) in situ                               | 1/1                                            |
| Мелкоклеточная карцинома (легкое)                                            | 1/1                                            |
| Плоскоклеточная карцинома (легкое)                                           | 1/1                                            |
| Аденокарцинома (пищевод)                                                     | 1/1                                            |
| Плоскоклеточная карцинома (пищевод)                                          | 1/1                                            |
| Аденокарцинома (желудок)                                                     | 1/1                                            |
| Аденокарцинома (пищеводно-желудочный переход)                                | 1/1                                            |
| Аденокарцинома (тонкая кишка)                                                | 1/1                                            |
| Стромальная опухоль ЖКТ (тонкая кишка)                                       | 1/1                                            |
| Желудочно-кишечная стромальная опухоль (ЖКСО) (толстая кишка)                | 1/1                                            |
| Аденокарцинома (толстая кишка)                                               | 1/1                                            |
| Аденокарцинома (прямая кишка)                                                | 1/1                                            |
| Желудочно-кишечная стромальная опухоль (ЖКСО) (прямая кишка)                 | 1/1                                            |
| Гепатобластома (печень)                                                      | 1/1                                            |
| Гепатоцеллюлярная карцинома (печень)                                         | 1/1                                            |
| Светлоклеточная карцинома (почки)                                            | 1/1                                            |
| Аденокарцинома (простата)                                                    | 2/2                                            |
| Лейомиома (матка)                                                            | 1/1                                            |
| Эндометриодная аденокарцинома (матка)                                        | 1/1                                            |
| Светлоклеточная карцинома (матка)                                            | 1/1                                            |
| Плоскоклеточная карцинома (шейка матки)                                      | 2/2                                            |
| Эмбриональная рабдомиосаркома (поперечно-полосатая мускулатура)              | 1/1                                            |
| Плоскоклеточная карцинома (кожа)                                             | 1/1                                            |
| Базальноклеточная карцинома (кожа)                                           | 1/1                                            |
| Нейрофиброма (поясница)                                                      | 1/1                                            |
| Нейробластома (забрюшинное пространство)                                     | 1/1                                            |
| Мезотелиома (брюшина)                                                        | 1/1                                            |



| Патология                                                    | Кол-во приемлемых случаев/общее кол-во случаев |
|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| В-клеточная лимфома; неутонченная (лимфатический узел)       | 2/2                                            |
| Лимфома Ходжкина (Hodgkin) (лимфатический узел)              | 3/3                                            |
| Анапластическая крупноклеточная лимфома (лимфатический узел) | 1/1                                            |
| Лейомиосаркома (мочевой пузырь)                              | 1/1                                            |
| Уротелиальная карцинома (мочевой пузырь)                     | 1/1                                            |
| Остеосаркома                                                 | 1/1                                            |
| Мезотелиома (брюшина)                                        | 1/1                                            |
| Лейомиосаркома (гладкая мускулатура)                         | 1/1                                            |

### ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Таблица 23. Поиск и устранение неисправностей.

| Проблема                          | Способ устранения                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Отсутствие или слабый SISH сигнал | <ol style="list-style-type: none"> <li>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.</li> <li>Убедитесь, что тип фиксации, время и толщина среза подходят для анализов на основе ISH.</li> <li>Убедитесь, что для сохранения сигнала SISH используются SISH-совместимые гистологические среды (см. Таблица 24). Если окрашивание все еще слабое или отсутствует, перейдите к пункту 4 ниже.</li> <li>Увеличьте время CC1 до &gt; 16 мин.</li> <li>Увеличьте время CC2 до &gt; 16 мин для тканей карциномы желудка или до &gt; 24 мин для тканей карциномы молочной железы.</li> <li>Увеличьте время ISH Protease 3 до &gt; 16 мин для тканей карциномы желудка или &gt; 20 мин для тканей карциномы молочной железы, в случае если морфология ядра не нарушена.</li> </ol> |

| Проблема                                        | Способ устранения                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Отсутствие или слабый красный ISH сигнал        | <ol style="list-style-type: none"> <li>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.</li> <li>Убедитесь, что спиртовые ванны и расширенные кислотные 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.</li> <li>Убедитесь, что тип фиксации, время и толщина среза подходят для анализов на основе ISH.</li> <li>Увеличьте время CC1 до &gt; 16 мин.</li> <li>Увеличьте время CC2 до &gt; 16 мин для тканей карциномы желудка или до &gt; 24 мин для тканей карциномы молочной железы.</li> <li>Увеличьте время ISH Protease 3 до &gt; 16 мин для тканей карциномы желудка или &gt; 20 мин для тканей карциномы молочной железы, в случае если морфология ядра не нарушена.</li> </ol> |
| Неспецифическое красное ISH фоновое окрашивание | <ol style="list-style-type: none"> <li>Убедитесь, что используются положительно заряженные предметные стекла, образец зафиксирован и разделен соответствующим образом для анализов на основе ISH.</li> <li>Если красное ISH фоновое окрашивание различимо для специфического красного ISH-сигнала, произведите подсчет, но не считайте неспецифические красные ISH-сигналы.</li> <li>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.</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Неспецифическое фоновое окрашивание SISH        | <ol style="list-style-type: none"> <li>Убедитесь, что используются положительно заряженные предметные стекла, образец зафиксирован и разделен соответствующим образом для анализов на основе ISH.</li> <li>Если фоновое окрашивание SISH различимо для специфического SISH сигнала, произведите подсчет, но не считайте неспецифические SISH сигналы.</li> <li>Если фоновое окрашивание SISH в ядре мешает подсчету, повторите окрашивание с уменьшением времени кондиционирования клеток или экспозиции с протеазой.</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Осадок                                          | <ol style="list-style-type: none"> <li>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.</li> <li>Убедитесь, что штрихкод на предметном стекле расположен по центру и нанесен на предметное стекло без нависания. Не дублируйте и не наносите повторно штрихкоды.</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Пузырьки                                        | Если образование пузырьков мешает подсчету, убедитесь, что предварительные аналитические процедуры и толщина образца соответствуют рекомендациям.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Ткани смываются с предметных стекол             | Убедитесь, что используются положительно заряженные предметные стекла.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |



Таблица 24. Совместимость гистологической среды для заливки с анализами на основе SISH.

| Гистологическая среда для заливки | Производитель                | Тип (ксилол, спирт, водная) | Совместимость с SISH |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Entellan                          | Merck                        | Ксилол                      | Нет                  |
| Entellan New                      | Merck                        | Ксилол                      | Нет                  |
| Eukitt                            | EMS                          | Ксилол                      | Нет                  |
| HSR                               | Sysmex                       | Ксилол                      | Нет                  |
| Malinol                           | Muto Chemical                | Ксилол                      | Нет                  |
| Acrytol                           | SurgiPath                    | Ксилол                      | Да                   |
| Alcolmout                         | Diapath                      | Спирт                       | Да                   |
| BioMount 2                        | BBInternational              | Ксилол                      | Да                   |
| Cytoseal 60                       | Richard Allan Scientific     | Ксилол                      | Да                   |
| Diamount                          | Diapath                      | Ксилол                      | Да                   |
| DPX                               | BDH: Raymond Lamb            | Ксилол                      | Да                   |
| FloTexx                           | Lerner Labs                  | Ксилол                      | Да                   |
| Gel Mount                         | Biomeda                      | Водная                      | Да                   |
| Histomount                        | Raymond Lamb                 | Ксилол                      | Да                   |
| MicroMount                        | SurgiPath                    | Ксилол                      | Да                   |
| MM24                              | SurgiPath                    | Ксилол                      | Да                   |
| Mountex                           | Histolab                     | Ксилол                      | Да                   |
| MountQuick                        | Daido Sangyo Co.             | Водная                      | Да                   |
| Paramount                         | Protaqs Quartett: Dako       | Ксилол                      | Да                   |
| Permout                           | Fisher                       | Ксилол                      | Да                   |
| Pertex                            | Cell Path                    | Ксилол                      | Да                   |
| Shandon Consul mount              | Thermo Scientific            | Ксилол                      | Да                   |
| Softmount                         | WAKO                         | Лемазол А (Lemasol A)       | Да                   |
| SureMount                         | Triangle Biomedical Sciences | Ксилол                      | Да                   |
| Thermo EZ Mount                   | Thermo Scientific            | Ксилол                      | Да                   |
| Ultramount                        | Dako                         | Ксилол                      | Да                   |

## ССЫЛКИ

- Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:361-370.
- Muleris M, et al. Assignment of v-erb-b2 avian erythroblastic leukemic viral oncogene homolog 2 (ERBB2) to human chromosome band 17121.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1997;76:34-5.
- Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*. 1985;230:1132-1139.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244:707-712.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177-182.
- Narita M, Nakao K, Ogino N, et al. Independent prognostic factors in breast cancer patients. *Am J Surg*. 1998;175:73-75.
- O'Reilly SM, Barnes DM, Camplejohn RS, et al. The relationship between c-erbB-2 expression, S-phase fraction, and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer*. 1991;63:444-446.
- Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, et al. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene*. 1997;15:537-547.
- Press MF, Pike MC, Chazin VR, et al. HER-2/neu expression in node-negative breast cancer: Direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res*. 1993;53:4960-4970.
- Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence *in situ* hybridization: Poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol*. 1997;15:2894-2904.
- Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1992;10:1049-1056.
- Bianchi S, Paglierani M, Zampi G, et al. Prognostic significance of c-erbB-2 expression in node negative breast cancer. *Br J Cancer*. 1993;67:625-629.
- Kallioniemi O-P, Holli K, Visakorpi T, et al. Association of c-erbB-2 protein expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer*. 1991;49:650-655.
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20:719-726.
- Baselga J, Carbonell X, Castaneda-Soto NJ, et al. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol*. 2005;23:2162-2171.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Concurrent administration of anti-HER2 monoclonal antibody and first-line chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. A phase III, multinational, randomized controlled trial. *N Engl J Med*. 2001;344:783-792.
- Marty M, Cognetti F, Maraninich D, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: The M77001 Study Group. *J Clin Oncol*. 2005;23:4265-4274.
- Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:1659-1672.
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:1673-1684.
- Bilous M et al. Current perspectives on HER2 Testing: A review of national testing guidelines. *Mod Pathol*. 2003;173-182.
- Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al: ToGA Trial Investigators: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376: 687-697.
- Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
- Middleton LP, et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133:775-780.
- Khouri T, Sait S, Hwang H, Chandrasekhar R, Wilding G, Tan D, Kulkarni S. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Mod Pathol*. 2009;22:1457-1467.
- College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, *Anatomic Pathology Checklist*, 2007.
- 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.





27. Reinholz MM, et al. Breast cancer and aneuploidy 17: Implications for carcinogenesis and therapeutic response. *Lancet Oncol.* 2009 Mar;10:267-277.
28. Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and practice of histotechnology*, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.

#### ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

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

© 2019 Ventana Medical Systems, Inc.

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
D-68305 Mannheim  
Germany

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

|                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1. Идентификационный номер случая / Идентификационный номер пациента:</b>                                                                                                                  | <b>2. Проведен подсчет в данном случае?</b> 2a. <input type="checkbox"/> Да — перейдите к пункту № 3. 2b. <input type="checkbox"/> Нет — пропустите пункт № 3. Перейдите к пункту № 4.                            | <b>3. Существует ли гетерогенность опухоли?</b> 3a. <input type="checkbox"/> Да — пропустите пункт № 4. Перейдите к пункту № 5. 3b. <input type="checkbox"/> Нет — пропустите пункт № 4, перейдите к пункту № 5. |                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>4. Этот случай не подсчитан по причине, пометьте ВСЕ, что применимо:</b>                                                                                                                   | 4a. <input type="checkbox"/> На предметном стекле, окрашенном ISH, не осталось ткани                                                                                                                              | 4b. <input type="checkbox"/> На предметном стекле, в образце окрашенной ISH ткани не обнаружено инвазивной карциномы                                                                                             | 4c. <input type="checkbox"/> Морфология ядра неприменима; невозможно отличить структурные элементы ткани нормальных клеток от целевых клеток карциномы.<br><br><div style="text-align: right;"> <input type="checkbox"/> HER2    <input type="checkbox"/> Chr 17         </div> |
| 4e. <input type="checkbox"/> Внутренний сигнал положительного контроля не обнаружен<br><div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/> HER2    <input type="checkbox"/> Chr 17</div> | 4f. <input type="checkbox"/> Слабое/отсутствующее окрашивание ISH в целевых клетках, невозможно оценить<br><div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/> HER2    <input type="checkbox"/> Chr 17</div> | 4g. <input type="checkbox"/> Другое (указать):                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

**5. Подсчет в целевой области 1:** количество сигналов HER2 и Chr17 от каждого из 20 ядер. Добавьте количество сигналов HER2. Добавьте количество Chr 17. Определите соотношение статуса гена, разделив общее количество сигналов HER2 на общее количество сигналов Chr 17. Округлите до 0,1 десятичного знака после запятой. Задокументируйте, было ли подсчитано количество кластеров или сигналов.

| КОЛИЧЕСТВО СИГНАЛОВ В ЦЕЛЕВОЙ ОБЛАСТИ 1 — 20 ядер |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |           |                                                          |                |
|---------------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|-----------|----------------------------------------------------------|----------------|
|                                                   | 5a | 5b | 5c | 5d | 5e | 5f | 5g | 5h | 5i | 5j | 5k | 5l | 5m | 5n | 5o | 5p | 5q | 5r | 5s | 5t | 5u    | 5v        | 5w                                                       | 5x Комментарии |
|                                                   | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | ИТОГО | ОТНОШЕНИЕ | Кластеры?                                                |                |
| HER2                                              |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |           | <input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Нет |                |
| Chr17                                             |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |           | <input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Нет |                |

**6. Результат, полученный при исследовании 20 ядер:** 6a. ☐ Без амплификации: HER2/Chr17 <2,0    или    6b. ☐ С амплификацией: HER2/Chr17 ≥2,0  
 Если отношение HER2/Chr17 попадает в диапазон от 1,8 до 2,2, необходим подсчет дополнительных 20 ядер.

**7. Подсчет в целевой области 2:** количество сигналов HER2 и Chr17 от каждого из 20 ядер. Добавьте количество сигналов HER2. Добавьте количество Chr 17. Задокументируйте, было ли подсчитано количество кластеров или сигналов.

| КОЛИЧЕСТВО СИГНАЛОВ В ЦЕЛЕВОЙ ОБЛАСТИ 2 — вторые 20 ядер (если соотношение в целевой области 1 — 1,8–2,2) |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |                                                          |                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|----------------------------------------------------------|----------------|
|                                                                                                           | 7a | 7b | 7c | 7d | 7e | 7f | 7g | 7h | 7i | 7j | 7k | 7l | 7m | 7n | 7o | 7p | 7q | 7r | 7s | 7t | 7u    | 8w                                                       | 8x Комментарии |
|                                                                                                           | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | ИТОГО | Кластеры?                                                |                |
| HER2                                                                                                      |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       | <input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Нет |                |
| Chr17                                                                                                     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       | <input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Нет |                |

**8. Результат, полученный при исследовании всех 40 ядер:**

8a. Целевая область 1 HER2 Общее \_\_\_\_\_ + Целевая область 2 HER2 Общее \_\_\_\_\_ = Общее количество HER2 \_\_\_\_\_  
 (из коробки 5u) (из коробки 7u)

8b. Целевая область 1 Chr17 Общее \_\_\_\_\_ + Целевая область 2 Chr17 Общее \_\_\_\_\_ = Общее количество Chr17 \_\_\_\_\_  
 (из коробки 5u) (из коробки 7u)

8d. Окончательный результат, полученный при исследовании 40 ядер: ☐ Без амплификации: HER2/Chr17 <2,0    или    ☐ С амплификацией: HER2/Chr ≥2,0

Подсчет провел: \_\_\_\_\_

Дата: \_\_\_\_\_



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

### Полное наименование изделия на русском языке

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail для определения статуса гена HER2 методом гибридизации in situ (ISH) для диагностики in vitro на иммунотейнерах автоматических серии BenchMark (далее по тексту может использоваться коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, зонд, реагент)

### Назначение для обращения на территории Российской Федерации

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 иммунотейнерах 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 гастрозофагеальный 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).

### Примечание:

\*уточнение квалификации специалиста должно регулироваться в соответствии с местным законодательством.

Herceptin (трастузумаб) - Торговое наименование лекарственного препарата Герцептин® (Трастузумаб), производитель Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцария (Регистрационное удостоверение ЛП-002743 от 14.12.2014г., годно до 31.12.2025 г.).

### Внимание!

Указание характеристик чувствительности и специфичности как «аналитические» просим не учитывать для обращения на территории Российской Федерации. Просим по тексту всей инструкции считать верным названия характеристик «чувствительность и специфичность» в связи с различной интерпретацией понятия «аналитическая» в разных странах мира.

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

### Область применения

Для профессионального использования медицинским персоналом клинико-диагностических лабораторий.

### Принцип метода определения (дополнение)

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

### Срок годности

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail стабилен максимально 18 месяцев с даты производства. Дату производства см. на упаковке. VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail следует хранить при 2-8°C. Не замораживать!

При вскрытой упаковке флакон-дозатор с реагентом 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 антитело после истечения срока годности.

### Стабильность

До вскрытия упаковки дозатор с реагентом можно хранить – максимально 18 месяцев с даты производства (дату производства см. на упаковке).

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

Стабильность установленного на прибор реагента 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.

- Не используйте сверх указанного количества анализов.

- Для получения дополнительной информации об использовании этого набора реагентов см. Руководство пользователя приборов серии BenchMark IHC / ISH и инструкции по использованию всех необходимых компонентов, расположенные на сайте [dialog.roche.com](http://dialog.roche.com).

- Маркировка безопасности продукции в первую очередь соответствует директивам ЕС по СГС. Паспорт безопасности предоставляется профессиональному пользователю по запросу.

- Чтобы сообщить о предполагаемых серьезных инцидентах, связанных с этим реагентом, обратитесь к местному представителю компании «Рош» и в компетентный орган государства-члена или страны, в которой зарегистрирован пользователь.

### Предупреждения:



H351 Предполагается, что данное вещество вызывает раковые заболевания

H360 Может отрицательно повлиять на способность к деторождению или на неродившегося ребенка

H373 Может поражать органы в результате многократного или продолжительного воздействия

H360D Способен оказывать токсическое воздействие на плод.

### Предотвращение:

P201 Перед использованием пройти инструктаж по работе с данной продукцией.

P202 Перед использованием ознакомиться с инструкциями по технике безопасности.

P260 Не вдыхать газ/ пары/ пыль/ аэрозоли/ дым/ туман.

P280 Использовать перчатки/спецодежду/средства защиты глаз/лица.

### Реагирование:

P308 + P313 ПРИ подозрении на возможность воздействия обратиться за медицинской помощью

### Утилизация:

P501 Удалить содержимое/контейнер на утвержденных станциях утилизации отходов.

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

Процедура получения тканевых срезов идентична для разных видов ткани.

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

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

### Комплект поставки

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail поставляется в пластиковом дозаторе, упакованном в коробку из мелованной бумаги. Один дозатор содержит достаточное количество реагента для проведения 30 анализов.

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

### Показания к применению



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

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 иммуногистохимических 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 гастрозофагеальный 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).

Примечание:

\*уточнение квалификации специалиста должно регулироваться в соответствии с местным законодательством.

Herceptin (трастузумаб) - Торговое наименование лекарственного препарата Герцептин® (Трастузумаб), производитель Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцария (Регистрационное удостоверение ЛП-002743 от 14.12.2014г., годно до 31.12.2025 г.).

### Противопоказания к применению

Противопоказаний в рамках установленного назначения не имеет.

### Побочные действия

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

### Процедура окрашивания (дополнение)

Для получения более подробной информации обратитесь к соответствующей инструкции системы детекции (набора для обнаружения) VENTANA.

### Контроль качества (дополнение)

#### Положительный тканевый контроль

Следует использовать свежие образцы тканей, полученных в ходе вскрытия, биопсии или хирургических операций.

### Интерпретация окрашивания (дополнение)

Характер окрашивания VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail носит ядерный характер.

Квалифицированный специалист, обладающий опытом в микроскопической интерпретации патологоанатомических образцов, проведении ISH-процедур и распознавании единичных и амплифицированных копий гена HER2 и хромосомы 17 (Chr17) (которые требуют микроскопического исследования с помощью объектива с увеличением 20х, 40х и (или) 60х), должен определить качество контролей перед интерпретацией результатов.

Примечание. Не рекомендуется использовать объектив с увеличением 100х. Все образцы тканей были исследованы в течение проверки и валидации с увеличением объектива 20х, 40х и (или) 60х.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail необходимо использовать вместе с Руководством по интерпретации карциномы молочной железы и карциномы желудка (Interpretation Guide VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail) для оценки предметного стекла. Руководство по интерпретации не входит в комплект поставки зонда VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Таблица 3 инструкции по применению иллюстрирует, как вести подсчет дискретных сигналов.

### Определения (дополнение)

1. Статус гена HER2. Статус гена HER2 — это соотношение количества копий гена HER2 к количеству копий хромосомы 17 (Chr17) на одну клетку в образце инвазивной карциномы молочной железы или желудка. Статус гена HER2 классифицируется по следующим принципам:

а) Соотношение HER2/Chr17  $\geq 2,0$  определяется как «с амплификацией».

б) Соотношение HER2/Chr17  $< 2,0$  определяется как «без амплификации».

Двадцать ядер (каждое содержащее красный (Chr17) и черный (HER2) сигналы) должны быть подсчитаны. Окончательные результаты по статусу HER2 фиксируются на основе соотношения, полученного путем деления суммы сигналов HER2 для всех 20 ядер на сумму сигналов хромосомы 17 для всех 20 ядер.

Если соотношение HER2/Chr17 попадает в диапазон от 1,8 до 2,2, необходим подсчет дополнительных 20 ядер. Новое соотношение затем должно быть выведено на основании всех 40 ядер.

2. Пригодность микропрепаратов.

Образец при анализе VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail должен соответствовать трем критериям, которые будут считаться достаточными для проведения подсчета; если образец не соответствует этим критериям, подсчет произвести нельзя, а результат будет считаться неудовлетворительным.

Критерий 1. Внутренний положительный контроль. Нормальные сигналы HER2 или Chr17 (1–2 копии на клетку) служат для внутреннего положительного контроля; они обязательно должны быть видны в образце. Ядерное окрашивание может располагаться в различных неопухолевых клетках, включая: стромальные фибробласты, эндотелиальные клетки, лимфоциты и неопухолевые эпителиальные клетки.

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. 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. 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 непригодным 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 непригодным и не может быть использован для подсчета.

Неопухолевые клетки. При использовании объектива с увеличением 20х, 40х и (или) 60х инвазивная часть опухоли должна демонстрировать поле с поддающимися подсчету сигналами SISH и Red ISH.

Критерий 3. Фоновое окрашивание. Любое окрашивание фона, полученное с помощью систем детекции (наборов для обнаружения) SISH или Red ISH, необходимо будет оценить, чтобы определить, не мешает ли оно подсчету специфических сигналов SISH или Red ISH. Фоновое окрашивание SISH обычно по внешнему виду напоминает «пыль» SISH, которая отличима от специфического сигнала. Красное окрашивание может выглядеть как красная дымка или редко встречающиеся неспецифические сигналы, которые выглядят слабее, чем специфические сигналы.

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



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

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

3. 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 растянuty или наблюдается некроз. Если одна рабочая область представляется непригодной для подсчета, часто на том же срезе можно найти другие рабочие области, вполне пригодные для этой цели. Об этом можно судить по присутствию здоровых клеток, демонстрирующих удовлетворительное окрашивание SISH и Red ISH в пределах или поблизости от рабочей области.

### Дополнительные наблюдения для HER2 и хромосомы 17 (дополнение)

Другие наблюдения могут быть отмечены как комментарии в заключении квалифицированного специалиста.

### Морфология ткани

Морфология тканей должна сохраняться как минимум у 85% окрашенных образцов.

Приемлемость морфологии тканей оценивают для каждого отдельного случая, используя критерии, описанные в Таблице 1.

Таблица 1 - Критерии приемлемости морфологии

| Интерпретация | Наблюдение с помощью микроскопа                                                                                                                                            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Приемлемое    | Исследуемое клеточное вещество визуализируется, что позволяет оценить окрашивание (различить структурные элементы тканей (здоровые клетки) и целевые клетки (опухолевые)). |
| Неприемлемое  | Исследуемое клеточное вещество не визуализируется, что препятствует оценке окрашивания                                                                                     |

### Ограничения (дополнение)

#### Общие ограничения

1. ISH — это многоступенчатая методика, которая требует специализированного обучения по отбору подходящих реагентов, подготовке образцов, обработке, подготовке ISH-препаратов и интерпретации результатов.
2. На результаты окрашивания ткани влияет обращение с тканью и подготовка ее к окрашиванию. Неправильное проведение процесса фиксации, замораживания, оттаивания, промывки, сушки, нагрева, микротомирования или загрязнение другими тканями или жидкостями могут привести к артефактам, накоплению реагентов, ложноотрицательным или ложноположительным результатам. Несогласующиеся результаты могут быть получены вследствие несоблюдения режимов процессов фиксации и заливки или присущей исследуемой ткани неоднородности.
3. Избыточное или неполное контрастное окрашивание может негативно повлиять на правильность интерпретации результатов.
4. Клиническая интерпретация окрашивания должна проводиться с учетом истории болезни, морфологических данных и других гистопатологических критериев. Такая интерпретация должна проводиться квалифицированным специалистом, 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 за обеспечение адекватности контролей.
5. Компания - производитель поставляет реагенты в оптимальном разведении для проведения анализа при соблюдении инструкций. Любое отклонение от рекомендованных процедур проведения теста может привести к тому, что ожидаемые результаты будут недостоверны. Пользователи, которые отклоняются от рекомендованных процедур проведения теста, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

6. Вследствие различий в обработке образцов может возникнуть необходимость в увеличении или уменьшении времени обработки протеазами ISH. Кроме того, увеличение или уменьшение времени кондиционирования клеток повлияет на результаты окрашивания. Пользователь должен валидировать такие изменения. Пользователи, допускающие отклонения от рекомендуемых методик проведения исследования, несут ответственность за интерпретацию результатов, полученных на образцах ткани пациента.

7. При использовании реагентов с тканями, которые ранее не тестировались, могут возникать непредвиденные реакции. В связи с биологической вариативностью 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.

### Эксплуатационные характеристики - чувствительность / специфичность (дополнение)

В таблицах 21, 22 (основная часть инструкции) приводятся результаты проведенных исследований с применением VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail.

Цель исследования заключалась в оценке специфичности, чувствительности VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail с использованием ряда различных здоровых и опухолевых тканей.

### Чувствительность и специфичность (дополнение)

Чувствительность (эффективность гибридизации) VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail была определена путем окрашивания нормальных метафазных пластинок человека на аппарате VENTANA BenchMark XT с применением набора для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набором для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Из 125 проанализированных метафазных пластинок 100 % выявили специфическую колокализацию как зонда HER2, так и зонда хромосомы 17.

Чувствительность измеряет способность зонда обнаруживать конкретную цель, в то время как специфичность заключается в его способности отличать цель от других последовательностей в образце. Тест обладает Чувствительностью и контролем специфичности, включенным в каждую ткань человека. Нормальные клетки человека (включая стромальные фибробласты, эндотелиальные клетки, лимфоциты и неопухолевые эпителиальные клетки молочной железы) должны содержать 1–2 копии HER2 и Chr17. Таким образом, 1–2 копии HER2 и Chr17 в нормальных человеческих клетках указывают на то, что зонды обнаруживают свою специфическую цель (мера чувствительности). От одной до двух копий HER2 и Chr17 в обычных клетках также указывает на то, что зонд обнаруживает только свои специфические цели (мера специфичности).

Для демонстрации приемлемого уровня чувствительности и специфичности было использовано 40 образцов ткани молочной железы и 39 образцов ткани желудка на основе статуса амплификации гена HER2. Кроме того, была исследована приемлемость морфологии, фоновое окрашивание, ожидаемой картины окрашивания. Исследования выполнялись на одном иммуноштейнере автоматическом VENTANA BenchMark GX, на одном иммуноштейнере автоматическом VENTANA BenchMark XT и на двух иммуноштейнерах автоматических VENTANA BenchMark ULTRA, а также с использованием Раствора для гибридизации (HybReady Solution) на втором иммуноштейнере автоматическом VENTANA BenchMark ULTRA для получения результатов, которые демонстрируют фоновое окрашивание, связанное только с набором для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набором для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit без применения зонда.

Уровень первого прохода (первичная обработка) для VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail в 40 образцах тканей молочной железы, зафиксированных в рекомендациях ASCO CAP (10-процентный NBF в течение 6–72 часов), составил 100% (40/40) с 95% ДИ (91,2 – 100) на приборах VENTANA BenchMark ULTRA, 100% (40/40) с 95% ДИ (91,2 – 100) на приборах VENTANA BenchMark XT и 97,5% (39/40) с 95% ДИ (87,1 – 99,6) на приборах VENTANA BenchMark GX, что удовлетворяло критерию приемлемости.



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

Специфичность этих же 40 образцов ткани молочной железы без контроля зонда составила 100% (40/40) с 95% ДИ (91,2 – 100) на приборах VENTANA BenchMark ULTRA, что удовлетворяло критерию приемлемости.

Уровень первого прохода для VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail в 39 образцах тканей желудка, зафиксированных в рекомендациях ASCO CAP (10-процентный NBF в течение 6–72 часов), составил 97,4% (38/39) с 95% ДИ (86,8 – 99,5) на аппаратах VENTANA BenchMark ULTRA, 97,4% (38/39) с 95% ДИ (86,8 – 99,5) на приборах VENTANA BenchMark XT и 100% (39/39) с 95% ДИ (91 – 100) на приборах VENTANA BenchMark GX, что удовлетворяло критерию приемлемости.

### Критерий приемлемости:

- Показатель прохождения первого прохода — не менее 90 % окрашенных образцов тканей желудка и молочной железы должны давать точечное окрашивание в ядерных тельцах. Чтобы случай был признан удовлетворяющим критериям приемлемости, среднее количество сигналов HER2 и Chr 17 от 40 нормальных ядер должно быть  $\geq 0,5$ .
  - Неспецифическое фоновое окрашивание — не менее 90 % окрашенных образцов должны демонстрировать приемлемые уровни неспецифического фонового окрашивания.
  - Сохранение структуры ткани — у не менее 85 % окрашенных образцов должна сохраняться клеточная структура ткани.
  - Фоновое окрашивание (фон детектирования) набора для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit без применения зонда - у не менее 90% окрашенных образцов молочной железы и желудка должны обнаруживаться приемлемые уровни окрашивания фона в «пыль» серебристого оттенка.
  - Фоновое окрашивание (фон детектирования) для набора для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit без применения зонда - у не менее 90% окрашенных образцов молочной железы и желудка должны обнаруживаться приемлемые уровни окрашивания фона в красный цвет.
  - Цели обнаружения набора VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit — у не менее 90 % окрашенных образцов в ядрах клеток тканей желудка и молочной железы должно обнаруживаться наличие целей DNP в виде черного точечного окрашивания.
  - Цели обнаружения набора VENTANA Red ISH DIG Detection Kit — у не менее 90 % окрашенных образцов в ядрах клеток тканей желудка и молочной железы должно обнаруживаться наличие целей DIG в виде красного точечного окрашивания.
  - Ожидаемая картина окрашивания — у не менее 90 % окрашенных образцов должно наблюдаться черное и красное точечное окрашивание в ядрах окрашенных клеток.
  - Ожидаемые элементы окрашивания (SISH) — у не менее 90 % окрашенных образцов должно наблюдаться черное точечное окрашивание (черные точки) в ядрах окрашенных клеток.
  - Ожидаемые элементы окрашивания (Red ISH) — у не менее 90 % окрашенных образцов должно наблюдаться красное точечное окрашивание в ядрах окрашенных клеток.
- Чувствительность и специфичность была также оценена путем окрашивания множества случаев нормальной и опухолевой ткани человека с VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набором для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набором для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit на иммунофлуоресцентном автоматическом VENTANA BenchMark ULTRA для демонстрации того, что VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail не создает артефакты в различных типах тканей или непредвиденное неспецифическое фоновое окрашивание, которые могут повлиять на оценку результатов. Следует отметить, что, поскольку в данном исследовании не оценивался подсчет, то тест не обязательно окрашивает ткань, он скорее не создает артефактов, которые могут помешать оценке результатов. VENTANA Red ISH DIG Detection Kit и VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit продемонстрировали приемлемую морфологию и фоновое окрашивание в 100% случаев нормальных и опухолевых тканей человека.

Неожиданное окрашивание не наблюдали при использовании VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail при окрашивании нормальных и опухолевых тканей.

**Повторяемость и прецизионность (в условиях воспроизводимости) для аппарата серии BenchMark IHC/ISH при карциноме молочной железы (цикловая и межсуточная воспроизводимости) (дополнение)**

Для анализа данных приборов VENTANA BenchMark XT и VENTANA BenchMark GX для случаев с отношениями от 1,5 до 2,5 был определен вес данных по их распространенности.

В исследование были включены четыре случая с соотношением ISH от 1,5 до 2,5.

### Критерий приемлемости:

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов в течение одного цикла.

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов в течение 5 непоследовательных дней.

**Прецизионность (в условиях воспроизводимости) между несколькими аппаратами при карциноме молочной железы (внутриплатформенная воспроизводимости) (дополнение)**

Случаи с соотношением от 1,5 до 2,5 были взвешены по их распространенности.

В исследование были включены четыре случая с соотношением ISH от 1,5 до 2,5.

### Критерий приемлемости:

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов между тремя приборами одной и той же платформы на приборе VENTANA BenchMark ULTRA.

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов между тремя приборами одной и той же платформы на приборе VENTANA BenchMark GX.

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов между тремя приборами одной и той же платформы на приборе VENTANA BenchMark XT.

**Прецизионность (в условиях воспроизводимости) в пределах одного исследователя и между исследователями (внутриисследовательская и межисследовательская воспроизводимости) (дополнение)**

В исследование были включены шесть случаев с соотношением ISH от 1,5 до 2,5.

### Критерий приемлемости:

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов в пределах одного исследователя.



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

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов между исследователями.

### Межплатформенная прецизионность (в условиях воспроизводимости) при карциноме молочной железы (дополнение)

Случаи с соотношением от 1,5 до 2,5 были взвешены по их распространенности.

В исследование были включены четыре случая с соотношением ISH от 1,5 до 2,5.

#### Критерий приемлемости:

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов в трех приборах на одной платформе.

### Повторяемость и прецизионность для аппарата серии BenchMark IHC/ISH при карциноме желудка (цикловая и межсюточная воспроизводимость) (дополнение)

Случаи с соотношением от 1,5 до 2,5 были взвешены по их распространенности.

В исследование были включены два случая с соотношением ISH от 1,5 до 2,5.

#### Критерий приемлемости:

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов в течение одного цикла.

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов в течение 5 непоследовательных дней.

### Прецизионность (в условиях воспроизводимости) между несколькими аппаратами при карциноме желудка (внутриплатформенная воспроизводимость) (дополнение)

Случаи с соотношением от 1,5 до 2,5 были взвешены по их распространенности.

В исследование были включены два случая с соотношением ISH от 1,5 до 2,5.

#### Критерий приемлемости:

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов между тремя приборами одной и той же платформы на приборе VENTANA BenchMark ULTRA.

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов между тремя приборами одной и той же платформы на приборе VENTANA BenchMark GX.

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны

демонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей менее 80% испытуемых образцов между тремя приборами одной и той же платформы на приборе VENTANA BenchMark XT.

### Прецизионность в пределах одного исследователя и между исследователями при карциноме желудка (внутриисследовательская и межисследовательская воспроизводимость) (дополнение)

В исследование были включены два случая с соотношением ISH от 1,5 до 2,5.

#### Критерий приемлемости:

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов в пределах одного исследователя.

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов между исследователями.

### Межплатформенная прецизионность при карциноме желудка (дополнение)

Случаи с соотношением от 1,5 до 2,5 были взвешены по их распространенности.

Исследование были включены два случая с соотношением ISH от 1,5 до 2,5.

#### Критерий приемлемости:

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов в трех приборах на одной платформе.

### Прецизионность от серии к серии при карциноме молочной железы (межлотовая воспроизводимость) (дополнение)

В исследование были включены четыре случая с соотношением ISH от 1,5 до 2,5.

#### Критерий приемлемости:

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов для разных проектных партий.

### Исследование межлабораторной воспроизводимости при карциноме молочной железы и карциноме желудка на аппарате VENTANA BenchMark ULTRA (дополнение)

Случаи с соотношением от 1,5 до 2,5 были взвешены по их распространенности.

Примечание. 95 % ДИ рассчитывали для процентилей методом бутстрап. В случаях, когда результат точечной оценки составлял 100 %, использовали метод Уилсона. В исследование были включены четыре случая с соотношением ISH от 1,5 до 2,5.

#### Критерий приемлемости:

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов в пределах одного лаборатория.

Коктейль зондов VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, набор для обнаружения VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit и набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit должны



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

продемонстрировать результаты окрашивания для положительных и отрицательных согласованностей не менее 80% испытуемых образцов между тремя лабораториями.

**Исследование сравнения методов:** VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail на аппарате VENTANA BenchMark ULTRA в сравнении с анализом, проведенным при помощи набора Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit. (дополнение)

### Первичные результаты

#### Критерии приемлемости:

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail должен продемонстрировать положительную/отрицательную процентную согласованность как минимум у 85% окрашенных образцов.

### Вторичные результаты

#### Критерий приемлемости:

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail должен продемонстрировать частоту первого прохождения при точечной оценке как минимум у 90% окрашенных образцов.

**Исследование сравнения методов:** VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail на аппарате VENTANA BenchMark ULTRA в сравнении с анализом, проведенным при помощи набора Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Kit (дополнение)

Критерии приемлемости для демонстрации эквивалентного выполнения этих двух методов анализа при использовании аппарата VENTANA BenchMark ULTRA и аппарата VP2000 («Эбботт» (Abbott)) должны обеспечивать перечислимые результаты с точечной оценкой показателей PPA и NPA не менее 90 % для статуса амплификации гена HER2.

### Упаковка

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail поставляется в пластиковой дозаторе, упакованном в коробку из мелованной бумаги. Один дозатор содержит достаточное количество реагента для проведения 30 анализов.

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

Первичная упаковка - дозатор.

Материал: полипропилен

Вес: 20,5 гр (± 0,2 гр)

Объем: 34,1 мл (± 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 (± 0,03 мм)

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

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

### Маркировка

Производитель использует следующие символы и знаки:

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

### Маркировка дозатора

Логотип производителя

Наименование изделия

Объем реагента в дозаторе (концентрация специфических антител)

Каталожный номер

Код партии

Срок годности (использовать до)

Глобальный номер предмета торговли

Количество анализов, которое можно сделать

Температурные ограничения

QR-код

Штрих-код

СЕ-маркировка

Предупреждение для диагностики in vitro

Знак «Серьезная опасность для здоровья»

Смотрите инструкцию по применению

Название и адрес производителя

### Маркировка картонной упаковки

Логотип производителя

Наименование изделия

Объем реагента в дозаторе (концентрация специфических антител)

Каталожный номер по реестру компании «Ventana Medical Systems Inc.»

Глобальный номер предмета торговли

Код партии

Дата производства

Срок годности

Количество анализов, которое можно сделать

Температура хранения

Предупреждение для диагностики in vitro

СЕ-маркировка

Штрих-код

QR-код

Производственный код

Каталожный номер по реестру компании «Roche Diagnostics GmbH»

Полное название, адрес, телефон производителя

Ссылка на электронную инструкцию на русском языке

Страна происхождения

Обозначение, что пригоден для вторичной переработки

Знак «Предостережение, обращайтесь к инструкции по применению»

Обозначение «Только по рецепту»

Знак «Опасно!»

Знак «Серьезная опасность для здоровья»



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

### Предупреждения:



H351 Предполагается, что данное вещество вызывает раковые заболевания

H373 Может поражать органы в результате многократного или продолжительного воздействия

H360D Способен оказывать токсическое воздействие на плод.

### Предотвращение:

P201 Перед использованием пройти инструктаж по работе с данной продукцией.

P202 Перед использованием ознакомиться с инструкциями по технике безопасности.

P260 Не вдыхать газ/ пары/ пыль/ аэрозоли/ дым/ туман.

P280 Использовать перчатки/спецодежду/средства защиты глаз/лица.

### Реагирование:

P308 + P313 ПРИ подозрении на возможность воздействия обратиться за медицинской помощью

### Утилизация:

P501 Удалить содержимое/контейнер на утвержденных станциях утилизации отходов.

### Маркировка на русском языке

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

Регистрационное удостоверение № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

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

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



Производитель: «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностика ГмбХ"), Sandhofer Strasse 116, D- 68305 Mannheim, Germany, Германия

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 08314373001 (800-6043)

На макет маркировки на русском языке дополнительно нанесены символы:



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению.

### Условия транспортировки

Перед отправкой с завода продукт проходит контрольные проверки. Международные символы на упаковке и специальные инструкции по обращению указывают транспортировщику, как следует обращаться с этим продуктом. При получении продукта внимательно осмотрите упаковку. При наличии любых следов неправильного обращения или повреждения немедленно обратитесь в отдел обслуживания клиентов компании «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностика ГмбХ") или к региональному поставщику.

Транспортировка осуществляется всеми видами транспорта в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на каждом виде транспорта. Температура при транспортировке 2-8°C.

### Требования к охране окружающей среды

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

### Стерилизация

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

### Утилизация

Во избежание возможного загрязнения окружающей среды 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 с истекшим сроком годности или использованные дозаторы, а также отходы, использованных реагентов, должны утилизироваться в соответствии с местными государственными и/или больничными нормативными требованиями.

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

### Утилизация отходов упаковки.

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

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

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

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

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

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

Не утилизировать совместно с бытовыми отходами.

### Гарантийные обязательства

Производитель (компания «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностика ГмбХ")) гарантирует, что 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 соответствуют спецификациям, заявленным на этикетке. Производитель несет ответственность за работу изделий только в случае их правильного использования в соответствии с инструкцией, а также соблюдения правил хранения и транспортировки.

Производитель гарантирует стабильность VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail 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 HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail по назначению в условиях, предусмотренных производителем.

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

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

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



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

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

**Претензии по качеству (рекламация)**

Порядок предъявления рекламаций и ответов на них регулируется гражданским правом. Рекламация может предъявляться только по таким вопросам, которые не являлись предметом приемки товара, произведенной в соответствии с условиями договора.

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

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

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

**Примечание:**

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail предназначен для использования со следующими иммунопейнерами автоматическими серии VENTANA BenchMark:

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

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

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

1) 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 иммунопейнерах автоматических серии BenchMark.

2) Набор для обнаружения VENTANA Red ISH DIG Detection Kit - 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 иммунопейнерах автоматических серии BenchMark.

3) Раствор для гибридизации (HybReady Solution) в составе: формамидовый буфер для реакции (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011-11166 от 30.12.2011 г.)

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

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

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

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

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

9) EZ Prep Concentrate (10X) (Раствор для проведения депарфинизации, концентрированный) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)

10) ultraVIEW Silver Wash II (Pre-dilute) (Промывочный буфер для гибридизации in situ, разведенный) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)

11) CC1 (Pre-dilute) (TRIS/Борат/ЭДТА буфер (CC1) для демаскировки антигена, разведенный) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)

12) CC2 Pre-dilute (Цитратный буфер для демаскировки антигена, разведенный) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)

13) LCS (Pre-dilute) (Жидкое покровное стекло высокотемпературное, разведенное) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)

14) ULTRA CC1 (TRIS/Борат/ЭДТА буфер (CC1) для демаскировки антигена, разведенный) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)

15) ULTRA CC2 (Цитратный буфер (CC2) для демаскировки антигена, разведенный) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)

16) ULTRA LCS (Жидкое покровное стекло высокотемпературное, разведенное) (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2009-05437 от 09.07.2020 г.)



[Перевод с немецкого и английского языков на русский язык]

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

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

Удостоверение копии

Настоящим удостоверяется соответствие приведенной ниже фотокопии представленному мне оригиналу.

г. Маннхайм, 15 января 2021 г.

/подпись/

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

[Печать:

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

[Далее следует текст документа «Инструкция по применению на медицинское изделие „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“», представленного на русском, английском и немецком языках.]

[На бланке компании «Рош Диагностикс ГмбХ»]

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

[Логотип компании «Рош»]

Вер. 1.0

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

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

Утверждено

«Рош Диагностикс ГмбХ»

(Roche Diagnostics GmbH)

Дата: 14 января 2021 г.

/подпись/

Андреа Вебер (Andrea Weber)

Руководитель проекта по международно-правовому регулированию

Штамп:

[Штамп:

«Рош Диагностикс ГмбХ»

(Roche Diagnostics GmbH)

Сандхофер Штрассе 116

68305 Маннхайм

(Sandhofer Straße 116

68305 Mannheim)]

2021 г.

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

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



1. Гшвинд А., Фишер О.М., Ульрих А. Обнаружение рецепторов тирозинкиназы: цель при терапии рака. Естественнаучные обзоры по раку, 2004 г.; 4: 361–370 (Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:361-370).
2. Мулерис М. и соавт. Присвоение гомолога вирусного онкогена эритробластического лейкоза v-erb-b2 avian (ERBB2) сегменту хромосомы человека 17121.1 методом гибридизации in situ. Цитогенетические и геномные исследования, 1997 г.; 76: 34–35 (Muleris M, et al. Assignment of v-erb-b2 avian erythroblastic leukemic viral oncogene homolog 2 (ERBB2) to human chromosome band 17121.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1997;76:34-5).
3. Куссенс Л., Ян-Фэн Т.Л., Ляо Я.Ц., Чэнь Э., Грей Э., Макграт Дж. и соавт. Рецептор тирозинкиназы с экстенсивной гомологией относительно рецептора ЭФР имеет общее хромосомное расположение с онкогеном neu. Наука, 1985 г.; 230: 1132–1139 (Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*. 1985;230:1132-1139).
4. Слэмон Д.Дж., Годольфин У., Джонс Л.Э. и соавт. Исследования протоонкогена HER-2/neu при раке молочной железы и яичников человека. Наука, 1989 г.; 244: 707–712 (Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244:707-712).
5. Слэмон Д.Дж., Кларк Дж.М., Вон С.Дж. и соавт. Рак молочной железы человека: корреляция между показателями рецидива и выживаемости при амплификации онкогена HER-2/neu. Наука, 1987 г.; 235: 177–182 (Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177-182).
6. Нарита М., Накао К., Огино Н. и соавт. Независимые прогностические факторы у пациентов с раком молочной железы. Американский журнал хирургии, 1998 г.; 175: 73–75 (Narita M, Nakao K, Ogino N, et al. Independent prognostic factors in breast cancer patients. *Am J Surg*. 1998;175:73-75).
7. О'Райли С.М., Барнс Д.М., Кэмпбелл Р.С. и соавт. Отношение между экспрессией c-erbB-2, долей фазы синтеза и прогнозом при раке молочной железы. Британский журнал рака, 1991 г.; 63: 444–446 (O'Reilly SM, Barnes DM, Campjohn RS, et al. The relationship between c-erbB-2 expression, S-phase fraction, and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer*. 1991;63:444-446).
8. Пегрэм М.Д., Финн Р.С., Арзу К. и соавт. Влияние сверхэкспрессии HER-2/neu на чувствительность раковых клеток молочной железы и яичников человека к химиотерапевтическим препаратам. Онкоген, 1997 г.; 15: 537–547 (Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, et al. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene*. 1997;15:537-547).
9. Пресс М.Ф., Пайк М.К., Хазин В.Р. и соавт. Экспрессия HER-2/neu при раке молочной железы с отрицательным статусом узлов: прямой количественный анализ ткани путем анализа компьютерных изображений и связь сверхэкспрессии с повышенным риском рецидива заболевания. Исследования рака, 1993 г.; 53: 4960–4970 (Press MF, Pike MC, Chazin VR, et al. HER-2/neu expression in node-negative breast cancer: Direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res*. 1993;53:4960-4970).
10. Пресс М.Ф., Бернштейн Л., Томас П.А., Мейснер Л.Ф. и соавт. Амплификация гена HER-2/neu, характеризующаяся флюоресцентной гибридизацией in situ: неблагоприятный прогноз при карциноме молочной железы с отрицательным статусом узлов. Журнал клинической онкологии, 1997 г.; 15: 2894–2904 (Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence



- in situ hybridization: Poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol.* 1997;15:2894-2904).
11. Густерсон Б.А., Гелбер Р.Д., Голдхирш А. и соавт. Прогностическая значимость экспрессии c-erbB-2 при раке молочной железы. Журнал клинической онкологии, 1992 г.; 10: 1049–1056 (Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1992;10:1049-1056).
  12. Бианчи С., Пальерани М., Дзампи Дж. и соавт. Прогностическая значимость экспрессии c-erbB-2 при раке молочной железы с отрицательным статусом узлов. Британский журнал рака, 1993 г.; 67: 625–629 (Bianchi S, Paglierani M, Zampi G, et al. Prognostic significance of c-erbB-2 expression in node negative breast cancer. *Br J Cancer.* 1993;67:625-629).
  13. Каллиониemi О.-П., Холли К., Висакорпи Т. и соавт. Связь между экспрессией белка c-erbB-2 и высоким показателем пролиферации клеток, повышенным риском висцеральных метастазов и неблагоприятными показателями выживаемости в долгосрочной перспективе при раке молочной железы. Международный журнал рака, 1991 г.; 49: 650–655 (Kallioniemi O-P, Holli K, Visakorpi T, et al. Association of c-erbB-2 protein expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer.* 1991;49:650-655).
  14. Вогел К.Л., Коблей М.Э., Трипати Д. и соавт. Эффективность и безопасность монотерапии трастузумабом в рамках первоочередного лечения метастатического рака молочной железы со сверхэкспрессией HER2. Журнал клинической онкологии, 2002 г.; 20: 719–726 (Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20:719-726).
  15. Басельга Х., Карбонелл Кс., Кастанеда-Сото Н.Х. и соавт. Исследование фазы II в отношении эффективности, безопасности и фармакокинетики монотерапии трастузумабом в соответствии с 3-недельным графиком лечения. Журнал клинической онкологии, 2005 г.; 23: 2162–2171 (Baselga J, Carbonell X, Castaneda-Soto NJ, et al. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol.* 2005;23:2162-2171).
  16. Слэмон Д.Дж., Лэйланд-Джонс Б., Шак С. и соавт. Параллельное введение моноклональных антител anti-HER2 и проведение первичного курса химиотерапии при метастатическом раке молочной железы со сверхэкспрессией HER2. Многонациональное, рандомизированное контролируемое исследование фазы III. Медицинский журнал Новой Англии, 2001 г.; 344: 783–792 (Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Concurrent administration of anti-HER2 monoclonal antibody and first-line chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. A phase III, multinational, randomized controlled trial. *N Engl J Med.* 2001;344:783-792).
  17. Марти М., Конэтти Ф., Мараниничи Д. и соавт. Рандомизированное исследование фазы II в отношении эффективности и безопасности трастузумаба в сочетании с доцетакселом среди пациентов с метастатическим раком молочной железы с положительным статусом рецептора эпидермального фактора роста 2 при назначении препарата в качестве терапии первой линии: исследовательская группа M77001. Журнал клинической онкологии, 2005 г.; 23: 4265–4274 (Marty M, Cognetti F, Maraninichi D, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatments: The M77001 Study Group. *J Clin Oncol.* 2005;23:4265-4274).
  18. Пиккарт-Геххарт М.Й., Проктер М., Лэйланд-Джонс Б. и соавт. Трастузумаб после адъювантной химиотерапии при раке молочной железы с положительным статусом HER2. Медицинский журнал Новой Англии, 2005 г.; 353: 1659–1672 (Piccart-Gebhart



- MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:1659-1672).
19. Ромонд Э.Г., Перес Э.А., Брайант Дж. и соавт. Трастузумаб и адъювантная химиотерапия при операбельном раке молочной железы с положительным статусом HER2. *Медицинский журнал Новой Англии*, 2005 г.; 353: 1673–1684 (Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:1673-1684).
  20. Билоус М. и соавт. Текущие перспективы исследований HER2: обзор национальных руководств по тестированию. *Современная патология*, 2003 г.: 173–182 (Bilous M et al. Current perspectives on HER2 Testing: A review of national testing guidelines. *Mod Pathol.* 2003:173-182).
  21. Бан Я.Цз., Ван Кутсем Э., Фейерейслова А. и соавт.: исследовательская группа ToGA. Трастузумаб в сочетании с химиотерапией и выполняемая отдельно химиотерапия для лечения распространенной злокачественной опухоли желудка или гастроэзофагеального перехода (ToGA) с положительным статусом HER2: открытое, рандомизированное контролируемое исследование фазы 3. *Ланцет*, 2010 г.; 376: 687-697 (Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al: ToGA Trial Investigators: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376: 687-697).
  22. Карсон Ф., Хладик К. Гистотехнология: источник для самостоятельного изучения, 3-е изд. Гонконг: издательство Американского общества клинической патологии, 2009 г. (Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009).
  23. Миддлтон Л.П. и соавт. Реализация методических рекомендаций в отношении HER2, разработанных американским обществом клинической онкологии / коллегией американских патологов, в учреждении, оказывающем высокоспециализированную медицинскую помощь, увеличивает конкордантность между иммуногистохимическими исследованиями HER2 и флюоресцентной гибридизацией *in situ* и сокращает количество неоднозначных случаев. *Архивы патологии и лабораторной медицины*, 2009 г.; 133: 775–780 (Middleton LP, et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence *in situ* hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133:775-780).
  24. Хоури Т., Саит С., Хван Х., Чандрасекхар Р., Уилдинг Дж., Тан Д., Кулками С. Влияние задержки при реализации фиксации в формалине на биомаркеры молочной железы. *Современная патология*, 2009 г.; 22: 1457–1467 (Khoury T, Sait S, Hwang H, Chandrasekhar R, Wilding G, Tan D, Kulkarni S. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Mod Pathol.* 2009;22:1457-1467).
  25. Программа аккредитации лабораторий коллегии американских патологов, контрольный перечень патологической анатомии, 2007 г. (College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2007.)
  26. Институт клинических и лабораторных стандартов (ранее — национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам). Обеспечение качества при контроле проектирования и выполнении иммуноцитохимических тестов: утвержденное руководство, второе издание. Документ CLSI I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). Институт клинических и лабораторных стандартов (CLSI), 950 Уэст Вэлли Роуд, комплекс помещений 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).

27. Рейнхольц М.М. и соавт. Рак молочной железы и аневзомия 17: значение для онкогенеза и терапевтического ответа. Ланцет: онкология, март 2009 г.; 10: 267–277 (Reinholz MM, et al. Breast cancer and aneusomy 17: Implications for carcinogenesis and therapeutic response. Lancet Oncol. 2009 Mar;10:267-277).
28. Шихан Д.К., Храпчак Б.Б. Теория и практика гистотехнологий, 2-е издание. Сент-Луис: издательство «Зе СиВи Мосби Компани»; 1980 г. (Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980).

[Рельефная печать:

Д-р Штефан Феллмет (Stefan Fellmeth)

Нотариус в г. Маннхайм]



Перевела Громова Александра Дмитриевна



Российская Федерация

Город Москва

Двенадцатого февраля две тысячи двадцать первого года

Я, Король Виктория Алексеевна, нотариус города Москвы, свидетельствую  
подлинность подписи переводчика Громовой Александры Дмитриевны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: №08/82-н/77-2021- 5 - 384

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

ГЕРБОВАЯ ПЕЧАТЬ  
НОТАРИУСА

ПОДПИСЬ

В.А. Король

Прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью 21 лист(-а,-ов)

ПОДПИСЬ

В.А. Король

ГЕРБОВАЯ ПЕЧАТЬ  
НОТАРИУСА

В.А. Король

Российская Федерация  
Город Москва

Двенадцатого февраля две тысячи двадцать первого года

Я, Король Виктория Алексеевна, нотариус города Москвы,  
свидетельствую верность копии с представленного мне  
документа.

Зарегистрировано в реестре: N 08/82-н/77-2021-5-389

Уплачено за совершение нотариального действия: 2040 руб.

В.А. Король



Всего прошнуровано,  
пронумеровано и скреплено  
печатью 34 лист(-а, -ов)

4

