

Инструкция по применению

**Набор реагентов для определения уровня экспрессии онкобелка HER2
иммуногистохимическим методом
(Гертикад-тест),
варианты исполнения «Гертикад-тест», «Гертикад-тест AT 150», «Гертикад –
тест AT 250»**

Для ручного и автоматического иммуногистохимического окрашивания

«Гертикад-тест» рассчитан на 80 тестов (100 предметных стекол): 80 предметных стекол для исследования с первичным антителом к HER2; 10 предметных стекол для исследования с Отрицательным контролем сыворотки; 10 контрольных предметных стекол с клеточными линиями для исследования с первичным антителом к HER2.

«Гертикад-тест АТ 150» рассчитан на 150 тестов;

«Гертикад-тест АТ 250» рассчитан на 250 тестов.

«УТВЕРЖДАЮ»
Вице-президент по разработкам
и исследованиям ЗАО «БИОКАД»
Иванов Р.А.
«24» сентября 2016 г.



1. Назначение и область применения

Для диагностики *in vitro*.

Набор реагентов для определения уровня экспрессии онкобелка HER2 иммуногистохимическим методом (Гертикад-тест) по ТУ 9398-001-45739777-2015 (далее по тексту – набор), варианты исполнения «Гертикад-тест», «Гертикад-тест АТ 150», «Гертикад-тест АТ 250», предназначен для полуколичественного определения онкобелка HER2 в клиническом образце методом иммуногистохимического окрашивания для ручной и автоматической постановки.

Диагностическая роль Набора реагентов (Гертикад-тест) - определение HER2-статуса для выявления пациентов с гиперэкспрессией HER2 при поставленном ранее диагнозе «рак молочной железы», требующих терапии препаратами на основе моноклональных антител к белку HER2.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика, патоморфологическая диагностика, в специализированных лабораториях патологоанатомических отделений.

2. Характеристики медицинского изделия

2.1 Научная обоснованность

Протоонкоген HER2 кодирует трансмембранный белок с молекулярной массой 185 кДа, который структурно подобен другим членам семейства рецепторов эпидермального ростового фактора. Гиперэкспрессия HER2 обнаруживается в ткани первичного рака молочной железы у 25-30% больных.

Опухоль с положительным HER2-статусом плохо реагирует на традиционные линии химиотерапии, поэтому уровень экспрессии HER-2/neu на поверхности опухолевых клетках имеет определяющее значение при решении вопроса о назначении препарата Гертикад®.

2.2 Принцип действия

Непрямой иммуногистохимический метод — основан на том, что немаркированные первичные моноклональные антитела кролика связываются с искомым антигеном на поверхности опухолевых клеток – рецептором эпидермального фактора роста 2 (англ. *epidermal growth factor receptor*, EGFR, ErbB-1, HER2). Образовавшийся комплекс

антиген-антитело выявляется при помощи вторичных меченых ферментом козьих антител, при этом первичные антитела служат для вторичных антигенами. Визуализация взаимодействия антигена с антителом осуществлена в присутствии фермента пероксидазы хрена. Активность фермента пероксидазы хрена, использованного в качестве метки вторичных антител, в присутствии донора электронов сначала приводит к образованию комплекса фермента с субстратом и затем к окислению донора электронов. Донор электронов обеспечивает движущую силу для продолжения катализа H_2O_2 , в то время как его отсутствие эффективно останавливает реакцию. В качестве донора электронов выступает хромоген 3,3'-диаминобензидин, окрашивающийся в коричневый цвет.

Для восстановления аффинности и авидности иммунной реакции после возможной модификации антигенных эпитопов в ходе фиксации формалином, перед процедурой иммуногистохимического окрашивания необходимо провести демаскировку антигена («открытие» антигенных детерминант). Демаскировка должна проводиться с использованием тепловой обработки в цитратном буфере непосредственно перед проведением иммуногистохимической реакции. Метод повышает чувствительность антител и интенсивность окраски.

Поскольку для генерирования хромогенного сигнала используется фермент пероксидаза хрена, который проявляет эндогенную активность в образцах клеток и тканей, такая активность может обусловить появление ложноположительного сигнала, пересекающегося, а в некоторых случаях и перекрывающего сигнал иммуногистохимической реакции, чем обусловлено выраженное фоновое окрашивание. Для снижения активности эндогенных ферментов в клетках и тканях после процедуры демаскировки необходимо использовать 3% раствор перекиси водорода.

Интенсивность окрашивания зависит от рецепторной нагрузки (количества белка HER2 на мембране опухолевых клеток, связавшегося с первичным антителом во время проведения ИГХ-окрашивания).

2.3 Состав и описание набора

2.3.1 «Гертикад-тест»: рассчитан на 80 тестов (100 предметных стекол): 80 предметных стекол для исследования с первичным антителом к HER2; 10 предметных стекол для исследования с Отрицательным контролем сыворотки; 10 контрольных предметных стекол с клеточными линиями для исследования с первичным антителом к HER2.

№ п/п	Название	Описание	Количество в упаковке
1	Раствор «Первичные антитела»	Готовые к использованию первичные моноклональные кроличьи антитела против белка человека HER2 в буфере, содержащем консервант азид натрия.	Два флакона (по 5 мл, во флаконах объемом 5 мл)
2	Раствор «Система детекции»	Антитела козы против первичных антител, конъюгированные с ферментом пероксидазой хрена в буфере, содержащем консервант азид натрия.	Один флакон (15 мл, во флаконе объемом 15 мл)
3	Раствор «ДАБ-1 (хромоген)»	Концентрированный раствор хромогена ДАБ (3,3'-диаминобензидин тетрагидро-хлорид) в стабилизирующем растворе.	Одна пробирка (1 мл, в пробирке объемом 1 мл)

4	Раствор «ДАБ-2 (субстрат)»	Субстратный буфер, содержащий 0,1 % перекиси водорода и стабилизатор.	Один флакон (15 мл, во флаконе объемом 15 мл)
5	Буфер для демаскировки «Раствор Д»	Концентрированный 100-кратный цитратный буфер с детергентом, содержащий консервант, для проведения демаскировки антигена».	Два флакона (по 100 мл, во флаконах объемом 100 мл)
6	Промывочный раствор «Раствор П»	Концентрированный 25-кратный буфер на основе трис(гидроксиметил)аминометана, содержащий консервант, для промывки образцов.	Четыре флакона (по 100 мл, во флаконах объемом 100 мл)
7	Раствор «Отрицательный контроль»	Буфер для разведения антител, не содержащий антитела против белка HER2.	Одна пробирка (1 мл, в пробирке объемом 1 мл)
8	Раствор для блокировки «Раствор Б»	Раствор, содержащий перекись водорода.	Один флакон (15 мл, во флаконе объемом 15 мл)
9	Контрольные стекла HER2	Стекла с зафиксированными клеточными линиями с различным уровнем экспрессии HER2.	2 контейнера со стеклами (по 5 штук в каждом контейнере)

2.3.2 «Гертикад-тест АТ 150»: рассчитан на 150 тестов

№ п/п	Название	Описание	Количество в упаковке
1	Раствор «Первичные антитела»	Готовые к использованию первичные моноклональные кроличьи антитела против белка человека HER2 в буфере, содержащем консервант азид натрия.	один флакон, (15 мл, во флаконе объемом 25 мл)
2	Контрольные стекла HER2	Стекла с зафиксированными клеточными линиями с различным уровнем экспрессии HER2.	от 1 до 20 контейнеров (по 5 штук в каждом контейнере)

2.3.3 «Гертикад-тест АТ 250»: рассчитан на 250 тестов

№ п/п	Название	Описание	Количество в упаковке
1	Раствор «Первичные антитела»	Готовые к использованию первичные моноклональные кроличьи антитела против белка человека HER2 в буфере, содержащем консервант азид натрия.	один флакон, (25 мл, во флаконе объемом 25 мл)
2	Контрольные стекла HER2	Стекла с зафиксированными клеточными линиями с различным уровнем экспрессии HER2.	от 1 до 20 контейнеров (по 5 штук в каждом контейнере)

Комплект поставки: набор реагентов, инструкция, паспорт качества.

3. Характеристики набора

3.1 Аналитические характеристики

3.1.1 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность (порог обнаружения рецепторной нагрузки на клетку) составляет не менее $6,3 \times 10^4$ рецепторов на клетку.

На клеточной линии «1+» контрольных стекол HER2, содержащей минимальное для

выявления методом ИГХ количество рецепторов HER2, обнаруживается слабое частичное коричневое мембранное окрашивание не менее 10% опухолевых клеток при просмотре всего образца. Результаты проверки считают положительными, если выполняются требования таблицы 1.

3.1.2 Аналитическая специфичность

Первичное антитело специфично к экстраклеточному домену рецептора HER2.

На структурах, достоверно не содержащих на поверхности рецептор HER2, или содержащих его в количестве ниже, чем предел обнаружения, – окрашивание отсутствует.

Проведенные исследования подтвердили отсутствие окрашивания большинства нормальных тканей, в том числе тканей молочной железы.

Для Отрицательного контроля реагента, не содержащего антитела к HER2, во время проведения ИГХ-анализа окрашивание HER2-позитивной ткани отсутствует, что говорит об отсутствии неспецифических взаимодействий.

3.2 Показатели контроля качества

3.2.1 Положительный результат ИГХ

Контроль положительного результата ИГХ на контрольных стеклах HER2 проводится по клеточной линии «3+».

Результаты проверки считают положительными, если выполняются требования таблицы 1.

3.2.2 Отрицательный результат ИГХ

Контроль отрицательного результата ИГХ на контрольных стеклах HER2 проводится по клеточной линии «0».

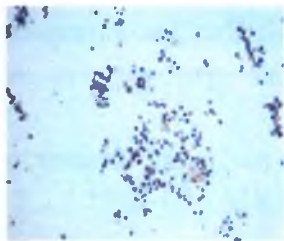
Результаты проверки считают положительными, если выполняются требования таблицы 1.

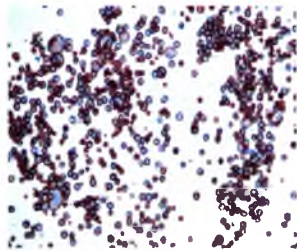
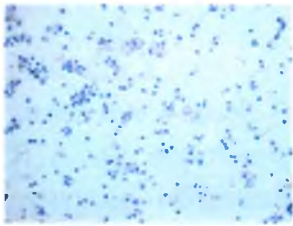
3.2.3 Отсутствие неспецифического окрашивания реагентами

Оценка отсутствия неспецифического окрашивания реагентами на контрольных стеклах HER2 «0», «1+», «3+» проводится с использованием раствора «Отрицательный контроль».

Результаты проверки считают положительными, если выполняются требования таблицы 1.

Таблица 1

Характеристика	Результат
Аналитическая чувствительность, контрольные стекла HER2 «1+», рецепторная нагрузка не менее $6,3 \times 10^4$ рецепторов на клетку	Слабое частичное коричневое мембранное окрашивание не менее 10% опухолевых клеток при просмотре всего образца.  Примечание: увеличение 10х.

Положительный результат ИГХ, контрольные стекла HER2 «3+»	Резко выраженное полное коричневое мембранное окрашивание более 50 % клеток при просмотре всего образца  Примечание: увеличение 10х.
Отрицательный результат ИГХ, контрольные стекла HER2 «0» 	Отсутствие мембранного окрашивания при просмотре всего образца.  Примечание: увеличение 10х.
Отсутствие неспецифического окрашивания реагентами, контрольные стекла HER2 «0», «1+», «3+».	Неспецифическое окрашивание отсутствует.

4. Меры предосторожности

Только для профессиональных пользователей.

4.1 Потенциальный риск применения изделия – класс 2б (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ №4н от 06.06.2012 г.).

4.2 Меры безопасности при работе с набором должны соответствовать требованиям санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

4.3 При работе с набором следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4 Перед началом работы ознакомьтесь с пользовательскими инструкциями на используемое оборудование и комплекты реагентов. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

4.5 Все использованные одноразовые материалы и остатки образцов должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ-287-113.

4.6 При работе с набором использовать защитную одежду: перчатки, халат и шапочку.

4.7 При нарушении целостности упаковки набор должен быть утилизирован согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 287-113.

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

4.9 Недопустимо использование другого нагревательного оборудования (например, скороварки, микроволновки и т.д.) при проведении процесса демаскировки. Необходимо использовать только водяную баню или РТ-модуль!

4.10 Некоторые компоненты набора содержат азид натрия в качестве консерванта, который используется в неопасных концентрациях. Раствор «ДАБ-1 (хромоген)» содержит 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид, который по данным производителя используется в неопасных концентрациях. Отработанные реагенты следует разбавлять большим количеством водопроводной воды, после чего их можно сливать в канализацию.

В целях обеспечения дополнительной безопасности данные компоненты промаркированы знаком «Внимание!» 

4.11 Раствор «Первичные антитела» в своем составе содержит БСА, входящий в состав буфера для разведения. В целях обеспечения дополнительной безопасности раствор «Первичные антитела», раствор «Отрицательный контроль» и сам набор промаркирован знаком биологической опасности 

4.12 Контрольные стекла HER2 содержат культуры клеток, человеческого происхождения. В процессе изготовления стекла проходят стадии обработки, приводящие к инактивации патогенных агентов, в том числе таких патогенных агентов как вирус гепатита С, В и ВИЧ 1,2. Необходимо обращаться с контрольными стеклами HER2 как с потенциально опасным материалом и работы проводить с использованием защитных перчаток.

5. Оборудование и материалы, необходимые для работы

«Гертикад-тест»:

5.1 Необходимые, но не предоставляемые реактивы и материалы:

- Высокоадгезивные стекла с покрытием L-полилизин (кат. J3800AMNZ или аналогичные);
- Покровные стёкла;
- Стандартные растворы, используемые в иммуногистохимии (этанол, ксилол и т.п.);
- Дистиллированная или деионизированная вода;
- Гематоксилин (Гематоксилин Майера, кат. ТА-060-МН или аналогичный);
- Среда для заключения препарата.

5.2 Необходимое, но не предоставляемое оборудование:

- Батарея емкостей для депарафинизации и регидратации (ёмкости для окрашивания);
- Оборудование для термической обработки для проведения процедуры демаскировки: рекомендуется использовать РТ-модуль Thermo Scientific (кат. номер A80400011). Возможно использование лабораторной водяной бани для ИГХ (нагревание до 99 °С, прецизионная);

Внимание! Не рекомендуется использовать микроволновую печь, скороварку или другие не предназначенные для работы в лаборатории приборы! За результаты исследований, проведённых с отклонениями от протокола производителя, производитель ответственности не несет.

- Световой микроскоп (увеличение 4-40х);
- Влажная камера для инкубации первичных антител;
- Холодильник (температурный режим +2...8 °С);
- Таймер;
- Дозаторы различных объемов с набором наконечников: малого объема 0,5-10 мкл, среднего объема 10-200 мкл, большого объема – до 1000 мкл;
- Стеклянная посуда для иммуногистохимических исследований (колбы для буферов, стаканы, цилиндры, ёмкости, бутылки);
- Контейнеры с держателем для термической обработки материала при проведении демаскировки антигена;
- Гидрофобный карандаш для иммуногистохимии;
- Индивидуальные защитные материалы.

Набор реагентов совместим с прибором Автостейнер Lab Vision™ Autostainer 360-2D (кат. номер A80500003), либо 720 – 2D для постановки полуавтоматического анализа. При использовании прибора необходимо пользоваться рекомендациями производителя к прибору.

«Гертикад-тест АТ 150», «Гертикад-тест АТ 250»:

«Гертикад-тест АТ 150», «Гертикад-тест АТ 250» совместим с автоматическим иммуногистостейнером Ventana BenchMark ULTRA и оригинальными реактивами производителя Ventana/Roche для постановки ИГХ-анализа.

Необходимые, но не предоставляемые оборудование, реактивы и материалы для работы на иммуногистостейнере Ventana BenchMark ULTRA:

- Иммуногистостейнер Ventana BenchMark ULTRA;
- Диспенсер для антитела, Ventana/Roche;
- Предметные стекла с адгезивным покрытием (заряженные);
- Индивидуальные защитные материалы;
- Карточка для ввода реагента (магнитный ключ), Ventana/Roche;
- Система визуализации UltraVIEW Universal DAB Detection Kit, Ventana/Roche;
- Гистологический краситель Гематоксилин II <60 %, Ventana/Roche;
- Реагент для придания окраске синего цвета, Bluing Reagent, Ventana/Roche;
- Буфер для демаскировки антигена CC1, Ventana/Roche;
- Реакционный буфер Reaction Buffer Concentrate (10X), Ventana/Roche;
- Раствор для проведения депарафинизации, концентрированный EZ Prep Concentrate (10x) Ventana/Roche;
- Жидкое покровное стекло высокотемпературное, разведенное ULTRA LCS, Ventana/Roche;
- Промывочный цитратный буфер SSC Concentrate (10X), Ventana/Roche;
- Лента с наклейками на стекла, (Label, Blank, Flap, 540), Ventana/Roche;

- Лента чернильная для принтера (Ribbon, EBAR II Printer), Ventana/Roche.

6. Анализируемые пробы

Срезы тканей рака молочной железы, фиксированные в формалине и залитые в парафин.

6.1 Требования к образцам:

Некачественный исходный материал и артефакты, связанные с неадекватной подготовкой материала, могут приводить к ошибочной интерпретации результатов. Исследование HER2-статуса проводится только после рутинного гистологического исследования и подтверждения инвазивного рака. Цитологический материал для определения HER2-статуса не используется.

Общие требования:

- ! Анализируется гистологический материал опухоли, не подвергнутый предоперационной лучевой и/или химиотерапии. В случае отсутствия материала первичной опухоли возможна оценка гиперэкспрессии на метастатических лимфатических узлах, т.к. в метастазах HER2-статус опухоли обычно сохраняется;
- ! Для исследования должен использоваться операционный или биопсийный материал;
- ! Фиксация должна проводиться **не более**, чем через 1 час после получения образца, поскольку в нефиксированном материале происходит ферментативное разрушение клеток. Категорически недопустима фиксация материала на следующий день;
- ! Материал должен фиксироваться исключительно в свежем 10 % растворе нейтрального забуференного формалина;
- ! Длительность фиксации для операционного материала – 24-48 ч (но как минимум 1 час/ 1 мм ткани), биопсийного – 24 часа (как минимум 1 час/1 мм ткани);
- ! Гистологическая проводка материала может осуществляться в ручном или автоматическом режиме;
- ! Необходимо избегать длительного выдерживания в расплавленном парафине, поскольку высокие температуры могут разрушать эпитопы;
- ! Допускается использование только свежего парафина;
- ! Для приготовления надлежащих срезов минимальный размер парафинового блока должен составлять 1 см;
- ! Толщина срезов ткани должна составлять 3-4 мкм;

6.2 Ограничения по использованию анализируемого материала

HER2-статус оценивается только в инвазивном компоненте опухоли. Компонент in situ оценке не подлежит, поскольку подобные структуры часто отличаются резко выраженной положительной реакцией. Оценивается только окрашивание мембраны клеток, цитоплазматическое окрашивание оценке не подлежит.

Критерии исключения образцов из анализа:

- Ткань фиксирована не нейтральным забуференным формалином;
- Неадекватная экспозиция фиксации;
- В образце нет инвазивного рака;
- Яркое окрашивание диаминобензидином нормальных протоков и долек.

6.3 Условия хранения анализируемых образцов

Парафиновые блоки и окрашенные, заключенные в среду образцы хранятся неопределенно долгое время при комнатной температуре без потери качества материала.

Положение о патогистологическом обследовании биопсийного и операционного материала содержится в приложении 5 к Приказу ГМУ Г.МОСКВЫ ОТ 15.04.1994 N 182 (РЕД. ОТ 18.01.2000, от 18.06.2003 г № 372) "О СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ ОРГАНИЗАЦИОННЫХ ПРИНЦИПОВ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ Г. МОСКВЫ" и содержит следующие рекомендации:

«влажный архив биопсийных и операционных материалов, готовые блоки и гистологические препараты хранятся в патологоанатомическом отделении в течение следующих сроков:

- а) доброкачественные и злокачественные опухоли, процессы, подозрительные на опухоли, специфическое воспаление подлежат постоянному хранению;
- б) влажный материал, блоки и гистологические препараты, относящиеся к другим видам патологии, хранятся в патологоанатомическом отделении не менее одного года, после чего могут быть ликвидированы».

7. Контроли

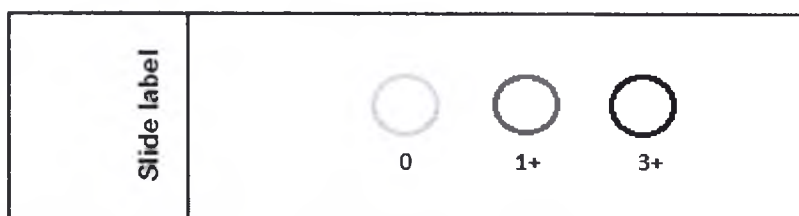
Различия в фиксации, обработке и заливке тканей могут привести к значительным расхождениям результатов, поэтому необходимо использовать несколько контролей для подтверждения специфичности окрашивания и оценки методической процедуры.

Каждый из контролей необходимо использовать с серией из не менее 8-ми образцов.

7.1 Контрольные стекла

Оценивать реакцию на онкобелок HER2 в исследуемой опухоли можно только при адекватном окрашивании контрольных клеточных образцов на контрольных стеклах HER2.

Расположение контрольных клеточных образцов:

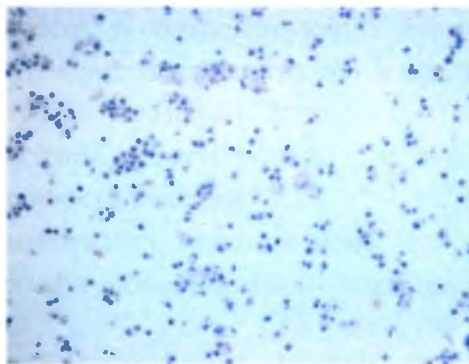


Контрольные стекла HER2 состоят из фиксированных в формалине и залитых в парафин культивируемых клеточных линий рака молочной железы человека с известным, подтвержденным уровнем амплификации гена и экспрессии белка HER2. Клеточные линии отобраны на основе количества копий гена HER2 и уровней белков, и представляют собой весь диапазон копий гена, которые могут встречаться в различных клинических случаях:

- В качестве **отрицательного контроля** используется клеточная линия без амплификации гена HER2.

Уровень экспрессии белка HER2 «0»

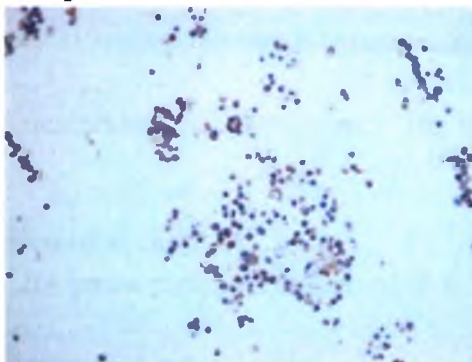
Отсутствие мембранного окрашивания при просмотре всего образца при нормальном прохождении реакции.



- В качестве контроля окрашивания «1+» используется клеточная линия без амплификации гена HER2, но с более высоким содержанием HER2-рецепторов.

Уровень экспрессии белка HER2 «1+»

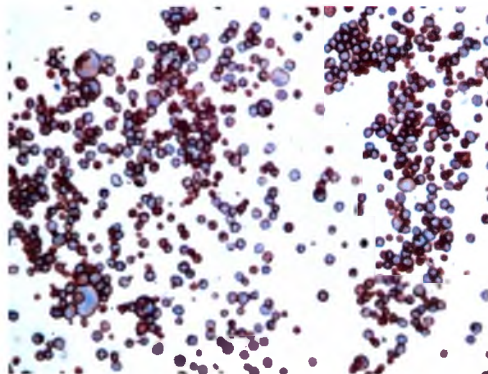
Слабое частичное коричневое мембранное окрашивание не менее 10 % опухолевых клеток при просмотре всего образца



- В качестве **положительного контроля** используется клеточная линия с амплифицированным геном HER2.

Уровень экспрессии белка HER2 «3+»

Резко выраженное полное коричневое мембранное окрашивание более 50 % клеток при просмотре всего образца.



С каждой постановкой не менее чем 8 гистологических образцов для подтверждения адекватности окрашивания необходимо проводить окрашивание одного контрольного стекла согласно п. 10.2, п. 10.3, п.10.4., п. 10.5, п 10.6.

7.2 Оценка неспецифического окрашивания реагентами.

Для постановки данного контроля необходимо использовать контрольные стекла HER2. Вместо первичных антител в соответствующих пунктах протоколов обработки на срез необходимо нанести «Отрицательный контроль» в объеме 100 мкл. Далее проводить обработку аналогично с другими образцами. В таком контроле при окрашивании стекла положительная окраска должна отсутствовать. Наличие положительной окраски свидетельствует о неспецифичности реакции.

Для проведения отрицательного контроля на не менее чем каждые 8 исследуемых образцов в лаборатории должен дополнительно готовиться положительный срез рака молочной железы.

8. Подготовка реагентов для анализа

8.1 «Гертикад-тест»

8.1.1 Промывочный раствор «Раствор П»

Приготовить «Раствор П» разведением концентрата в 25 раз дистиллированной водой. Например, смешать 40 мл концентрата и 960 мл дистиллированной воды. Этого количества достаточно для обработки 10 стёкол (2 контроля + 8 образцов).

Подготовленный к работе «Раствор П» можно хранить при $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение двух суток.

Готовый «Раствор П» использовать однократно! Не применять использованный буфер повторно!

8.1.2 Буфер для демаскировки «Раствор Д».

Приготовить «Раствор Д» разведением концентрата в 100 раз дистиллированной водой.

Например, смешать 15 мл концентрата и 1485 мл дистиллированной воды. Этого количества достаточно для обработки 10 стёкол (2 контроля + 8 образцов).

Подготовленный к работе «Раствор Д» можно хранить при $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение двух суток.

Готовый Раствор Д». использовать однократно! Не применять использованный буфер повторно!

8.1.3 Раствор «ДАБ-1 (хромоген)».

Непосредственно перед постановкой реакции приготовить рабочий раствор хромогена из расчета 30 мкл на 1000 мкл субстрата с учетом расхода 100 мкл на один гистологический срез. Для этого перенести необходимое количество раствора «ДАБ-2 (субстрат)» в чистую пробирку и добавить соответствующий объем концентрированного раствора «ДАБ-1 (хромоген)», перемешать.

Готовый раствор хранению не подлежит!

8.2 «Гертикад-тест АТ 150», «Гертикад-тест АТ 250»

При необходимости для автоматического анализа на иммуногистостейнере *Ventana BenchMark ULTRA* можно перенести раствор «Первичные антитела» из флакона производителя в диспенсер, совместимый с иммуногистостейнером, используя для валидации реактива магнитную карточку для ввода реагентов.

9. Проведение анализа

9.1 Требования к персоналу, участвующему в выполнении исследований

Персонал, проводящий исследования с использованием набора, должен владеть навыками проведения фиксации и проводки гистологических срезов, навыками интерпретации результатов полуколичественного иммуногистохимического анализа, навыками работы на нижеперечисленном оборудовании и иметь соответствующее профильное образование. Весь персонал лаборатории должен пройти специальное обучение для тестирования HER2 при раке молочной железы. Интерпретация результатов окрашивания допускается только квалифицированными патоморфологами.

! Анализ рекомендовано проводить при комнатной температуре (+18...25 °C).

9.2 «Гертикад-тест»

9.2.1 Подготовка гистологических срезов.

Проводка и заливка ткани в парафин осуществляются по общепринятым схемам.

Получение гистологических срезов с парафиновых блоков производится непосредственно перед проведением иммуногистохимического анализа.

Толщина среза должна составлять 4 мкм.

Приготовленные на микротоме срезы монтировать на предметные стекла с высокоадгезивным покрытием (L-полилизин). Полученный препарат высушить в термостате при температуре 60 °C в течение 60 минут (или 12-24 часов при температуре +37 °).

Для проведения «Отрицательного контроля» необходимо подготовить HER2-положительный образец ткани.

9.2.2 Предобработка парафиновых срезов.

Необходимо депарафинизировать и регидратировать срезы (исследуемые образцы, образец для отрицательного контроля антител и контрольное стекло) с использованием ксилола и этанола (как для обычной гистологии), например:

- Выдержать препараты в ксилоле 3 минуты;
- Перенести в новый раствор ксилола на 3 минуты;
- Выдержать препараты в 96 % этиловом спирте 3 минуты по 4 смены раствора;
- Промыть в дистиллированной воде 2 минуты.

Следует вовремя заменять использованные реактивы на свежие, т.к. плохое удаление парафина из среза будет приводить к нарушению окрашивания.

9.2.3 Процедура демаскировки антигена

Для восстановления аффинности и авидности иммунной реакции после возможной модификации антигенных эпитопов в ходе фиксации формалином для всех исследуемых и контрольных срезов необходимо проводить демаскировку антигена («открытие» антигенных детерминант). Демаскировка должна проводиться с использованием тепловой

обработки в «Растворе Д». Метод повышает чувствительность антител и интенсивность окраски.

9.2.3.1 Метод демаскировки антигена с использованием РТ-модуля.

Работать с любыми реагентами, используемыми в РТ-модуле, необходимо в защитных перчатках.

Протокол:

- Подготовить рабочий раствор для демаскировки антигена «Раствор Д» (см. пункт 8.1.2. настоящей Инструкции);
- Налить в резервуар 1,5 л приготовленного раствора для демаскировки антигена;
- Накрыть резервуар крышкой. Зафиксировать крышку с помощью наружной предохранительной защелки;
- Установить необходимые параметры:

– Время	– 30 минут
– Температура	– + 97 °С

- Нажать кнопку [RUN] на каждом резервуаре (на дисплее появится значение PREHEAT);
- Дождаться, пока раствор нагреется до выбранной температуры;
- Открыть РТ-модуль и погрузить кассету с депарафинизированными стеклами в предварительно нагретый раствор для демаскировки антигена;
- Накрыть резервуар крышкой. Зафиксировать крышку с помощью наружной предохранительной защелки;
- Нажать кнопку [RUN] на каждом резервуаре для начала нагрева. На дисплее появится значение WARM-UP и крышка будет заблокирована;
- Затем, после охлаждения, на экране появится значение DONE и крышка будет разблокирована автоматически.
- Открыть модуль и извлечь кассеты со стеклами из резервуаров. Контейнер со стеклами извлечь из РТ-модуля, оставить остывать в течение 15-20 минут.

9.2.3.2 Метод демаскировки антигена с использованием водяной бани.

- Заполнить контейнер достаточным количеством раствора «Раствор Д» так, чтобы раствор покрывал стекла и установить температуру более +95 °С;
- Поместить стекла в кассетах в предварительно нагретый «Раствор Д», накрыть контейнер крышкой и инкубировать стекла в течение 30 минут после того, как раствор достигнет необходимой температуры;
- Извлечь контейнер из бани и охлаждать содержимое при открытой крышке в течение 20 минут при комнатной температуре.

9.2.4 Процедура окрашивания исследуемых и контрольных образцов:

- а) Подготовить рабочее разведение промывочного раствора «Раствор П» согласно п.8.1.1. данной Инструкции;
- б) Остывшие стекла с исследуемыми образцами, положительной тканью для контроля и контрольным стеклом, опустить в дистиллированную воду на 1-2 минуты;

- с) Обвести срез гидрофобным карандашом для иммуногистохимии во избежание растекания реактива по стеклу;
- д) Нанести на все образцы 100 мкл раствора для блокировки «Раствор Б» таким образом, чтобы образец был полностью покрыт раствором;

Инкубировать при комнатной температуре 5 минут.

- е) Промыть все образцы в дистиллированной воде 1-2 минуты, затем в промывочном растворе 3 мин, используя автоматическую промывочную станцию, либо емкость с промывочным раствором.
- ф) Аккуратно с помощью пипетки перемешать антитела 2-3 раза (избегая пенообразования), затем нанести на исследуемые образцы и контрольное стекло по 100 мкл раствора «Первичные антитела», таким образом, чтобы образец был полностью покрыт раствором;

На контрольное стекло HER2 для проведения отрицательного контроля антитела вместо раствора «Первичные антитела» нанести раствор «Отрицательный контроль».

Инкубировать 60 минут при комнатной температуре. Рекомендуется использовать для инкубации влажную камеру.

- г) Аккуратно промыть все стекла промывочным раствором, используя автоматическую промывочную станцию, либо емкость с промывочным раствором три раза по 3 минуты;
- h) Нанести на все образцы 100 мкл раствора «Система детекции», таким образом, чтобы образец был полностью покрыт раствором;

Инкубировать при комнатной температуре 30 минут. Рекомендуется использовать для инкубации влажную камеру

- і) Аккуратно промыть все стекла промывочным раствором три раза по 3 минуты;
- ж) Подготовить раствор ДАБ субстрат-хромоген согласно пункту 8.1.3 данной Инструкции.
- к) Нанести на все срезы 100 мкл готового раствора хромогена, таким образом, чтобы образец был полностью покрыт раствором;

Инкубировать при комнатной температуре 5 минут.

- l) Аккуратно промыть все стекла дистиллированной водой 2-3 минуты.
- м) Поместить все стекла в раствор гематоксилина на 2-5 минут для подкрашивания ядер. Промыть промывочным раствором 2-3 минуты, затем снова дистиллированной водой 2-3 минуты.
- п) Провести обезвреживание каждого препарата путем помещения его последовательно в следующие растворы: 96 % Спирт - 2 минуты по 2 смены, изопропиловый спирт 2 минуты по 2 смены, ксилол 2 минуты по 2 смены;
- о) ЗаклЮчить все препараты, используя покрывное стекло и среду для заклЮчения;
- р) Оценить результаты окрашивания.

Примечание. Не допускать подсыхания срезов на всех этапах до п. «п».

9.3 «Гертикад-тест АТ 150», «Гертикад-тест АТ 250»

9.3.1 Подготовка гистологических срезов

Проводка и заливка ткани в парафин осуществляются по общепринятым схемам.

Получение гистологических срезов с парафиновых блоков производится непосредственно перед проведением иммуногистохимического анализа.

Толщина среза должна составлять 2-4 мкм.

Приготовленные на микротоме срезы монтировать на заряженные предметные стекла. Полученный препарат высушить 12-24 часов при температуре 37 °С.

При использовании набора реагентов для автоматического окрашивания на иммуногистостейнере Ventana BenchMark ULTRA необходимо пользоваться эксплуатационными документами к иммуногистостейнеру, инструкциями по применению ко всем используемым реактивами.

- Необходимо поместить все диспенсеры с реактивами в лоток для реактивов и загрузить в иммуностейнер.

- Проверить наличие растворов в контейнерах под каруселью и заполнение контейнера для отходов.

- При необходимости Раствор «Первичные антитела» из флакона перелить в диспенсер Prep-Kit для использования в приборе Ventana BenchMark ULTRA. В случае если используется диспенсер, необходимо провести считывание штрих-кода и магнитного ключа и загрузить диспенсер в прибор.

- В случае отсутствия диспенсера допустимо наносить реагент вручную на каждый образец. В таком случае прибор остановит процесс окраски на нужном этапе и подаст звуковой сигнал. В этот момент необходимо дозатором аккуратно под жидкое покровное стекло (протыкая его, держа дозатор при нанесении строго вертикально) нанести раствор антител в объеме по 100 мкл.

- Когда все реактивы помещены и загружены предметные стекла, запустить цикл окраски.

Все этапы проведения анализа проводятся в автоматическом режиме и должны быть запрограммированы в программном обеспечении для иммуностейнера:

Тип процедуры	Условия
Депарафинизация	Выбрано
Подготовка клеток (раскрытие антигена)	ULTRA CC1, мягкая 36 минут при +95 °С
Обработка антителом (первичным)	28-36 минут при +37°С
Конъюгирование антител с биотином	Выбрано
Контрастное окрашивание (Hematoxylin)	Hematoxylin II 4 минуты
Дополнительное контрастное окрашивание	Окраска синим красителем Bluing 4 минуты

- По окончании окраски необходимо извлечь предметные стекла из иммуногистостейнера, промыть мягким моющим средством (например, «Fairy») для удаления покровного раствора.

- Затем промыть стекла дистиллированной водой для полного удаления моющего средства.

- Далее проводится дегидратация и просветление препаратов путем помещения его последовательно в следующие растворы: 96% Спирт - 2 минуты по 2 смены, изопропиловый спирт 2 минуты по 2 смены, ксилол 2 минуты по 2 смены;

- Заключение препаратов, используя покровное стекло и среду для заключения;

- Оценить результаты окрашивания.

10. Результаты

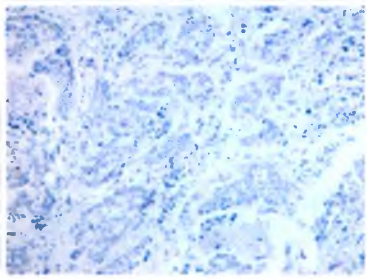
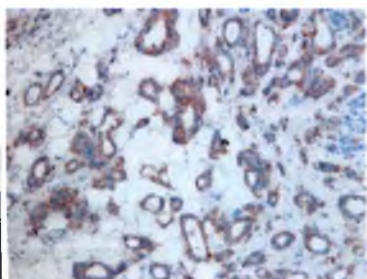
Оценка проводится с использованием светового микроскопа при увеличении объектива

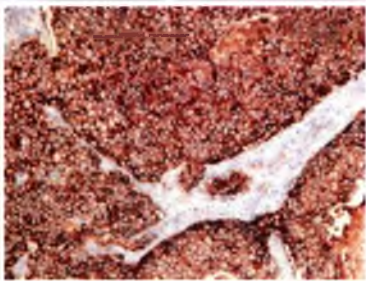
10х и в пограничных случаях 1+/2+ – объектива 20х. В некоторых случаях может понадобиться исследование при большом увеличении микроскопа (объектив 40х и более).

Опухоли после проведенного иммуногистохимического исследования и оцененные как ИГХ 0 или ИГХ 1+ считаются HER2-негативными; опухоли, оцененные как ИГХ 3+ считаются HER2-позитивными. Результат ИГХ 2+ является неопределенным и требует определения наличия амплификации гена HER2 методами *in situ* гибридизации или количественным ПЦР на материале с тех же парафиновых блоков.

Образец, в котором выявляется гиперэкспрессия HER2, должен отвечать пороговым критериям для оценки интенсивности и типа окрашивания мембраны клетки (3+ по шкале от 0 до 3+) и процента позитивных опухолевых клеток. Окрашивание должно быть локализовано на мембране и полностью повторять ее контур. Иммунное окрашивание может быть представлено и в цитоплазме, однако такой вид реакции не учитывается при оценке HER2-статуса опухоли.

Таблица 3

	Шкала	Образец, полученный при операции – характер окрашивания	Образец, полученный при биопсии – характер окрашивания	Клиническая оценка экспрессии HER2
Карцинома молочной железы				
	0	Отсутствие окрашивания или наличие слабого неполного мембранного окрашивания менее 10 % клеток инвазивного рака		Результат отрицательный
	1+	Слабое частичное (неполное) мембранное окрашивание более 10 % клеток инвазивного рака		Результат отрицательный
	2+	Слабое /умеренное полное более 10 % клеток инвазивного рака, или неполное яркое мембранное окрашивание менее 10 % клеток инвазивного рака		Результат сомнительный (требуется подтверждение ISH)

	Шкала	Образец, полученный при операции – характер окрашивания	Образец, полученный при биопсии – характер окрашивания	Клиническая оценка экспрессии HER2
	3+	Интенсивное полное окрашивание мембран более 10 % клеток инвазивного рака		Результат положительный

11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации

11.1. Условия и срок хранения

Набор в упаковке следует хранить на складе в холодильных камерах при температуре +2...8 °С. Не допускается замораживание набора. Сразу после использования необходимо вернуть в холодильник на +2...8 °С.

Срок годности набора – 6 месяцев.

Растворы «ДАБ-2 (субстрат)» и «ДАБ-1 (хромоген)» хранить защищенными от света.

11.2. Условия и срок транспортирования

Транспортировать изделие следует всеми видами транспорта при температуре + 2...+ 8 °С в холодильных камерах или с хладагентами.

Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

11.3. Условия и срок хранения после вскрытия первичной упаковки

Все реагенты набора после вскрытия первичной упаковки могут храниться в упаковке в течение всего срока годности при +2...8 °С.

11.4. Срок годности рабочих растворов компонентов

- Подготовленный к работе «Раствор Д» можно хранить при +2...8 °С в течение двух суток;

- Подготовленный к работе «Раствор Д» можно хранить при +2...8 °С в течение двух суток;

- Приготовленный раствор хромогена хранению не подлежит! Необходимо готовить непосредственно перед проведением анализа.

12. Утилизация

12.1. При утилизации отходов, наборов с истекшим сроком годности необходимо руководствоваться требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» и «МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

12.2. Жидкие реагенты уничтожаются раздавливанием внутренней упаковки с последующим разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

13.2 Наконечники могут быть обработаны дезинфицирующим средством. После дезинфекции расходные материалы могут быть утилизированы как неопасный мусор.

13. Указания по применению

13.1. Набор должен применяться согласно инструкции по применению.

13.2. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

13.3. Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

13.4. Растворы «ДАБ-2 (субстрат)» и ДАБ-1 (хромоген)» хранить от света.

13.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных серий наборов, за исключением контрольных стекол.

14. Информация о производителе

По вопросам качества Набора реагентов для определения уровня экспрессии онкобелка HER2 иммуногистохимическим методом (Гертикад-тест) следует обращаться в ЗАО «БИОКАД», Россия, 198515, г. Санкт-Петербург, Петродворцовый район, п. Стрельна, ул. Связи, д. 34, Лит. А.
www.biocad.ru

В случае серьезного повреждения упаковки, или в случае некорректных результатов на контрольных образцах обратитесь, пожалуйста, к нашим специалистам:

Москва

Тел: +7 (495) 992 66 28; факс: +7 (495) 992 82 98

Санкт-Петербург

Тел: +7 (812) 380-49-33, факс: +7 (812) 380-49-34

biocad@biocad.ru

Вице-президент по разработкам
и исследованиям ЗАО «БИОКАД»
Иванов Р.А.



Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

19 (декабря) лист 06

Вице-президент ЗАО «БИОКАД»

Иванов Р.А.

Образцы маркировки для медицинского изделия
Набор реагентов для определения уровня экспрессии онкобелка HER2
иммуногистохимическим методом (Гертикад-тест)
по ТУ 9398-001-45739777-2015,
варианты исполнения «Гертикад-тест», «Гертикад-тест АТ 150»,
«Гертикад-тест АТ 250»,
производства ЗАО «БИОКАД»

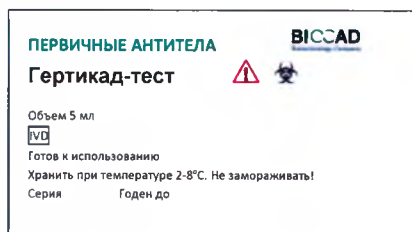
Содержание:

Маркировка первичной упаковки «Первичные антитела»	Стр 2
Маркировка первичной упаковки «Система детекции»	Стр 2
Маркировка первичной упаковки «ДАБ-1 (хромоген)»	Стр 2
Маркировка первичной упаковки «ДАБ-2 (субстрат)»	Стр 2
Маркировка первичной упаковки «Раствор Д»	Стр 3
Маркировка первичной упаковки «Раствор П»	Стр 3
Маркировка первичной упаковки «Отрицательный контроль»	Стр 3
Маркировка первичной упаковки «Раствор Б»	Стр 3
Маркировка контейнера с контрольными стеклами	Стр 3
Маркировка вторичной упаковки (коробка с реагентами)	Стр 4
Маркировка транспортной тары	Стр.6

*Вице-президент
по разработке
и исследованию
ЗАО «БИОКАД»
Иванов Р.А.*



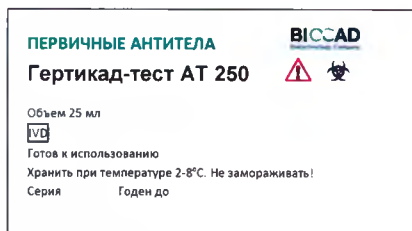
- Маркировка первичной упаковки «Первичные антитела» для «Гертикад-тест»



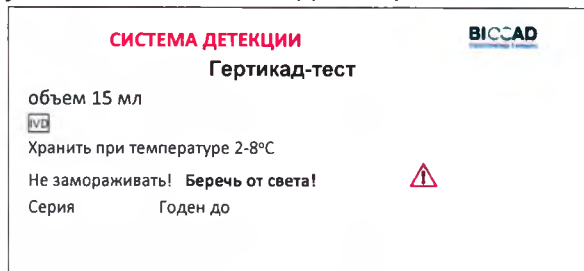
- Маркировка первичной упаковки «Первичные антитела» для «Гертикад-тест АТ 150»



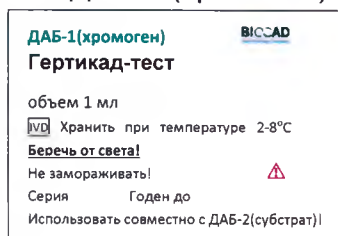
- Маркировка первичной упаковки «Первичные антитела» для «Гертикад-тест АТ 250»



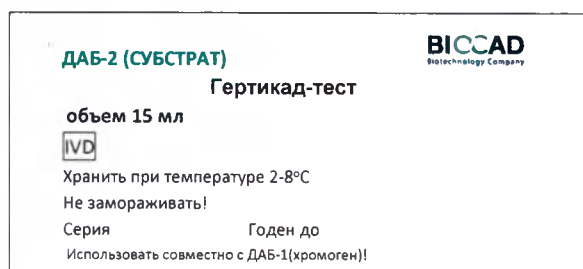
- Маркировка первичной упаковки «Система детекции»



- Маркировка первичной упаковки «ДАБ-1 (хромоген)»



- Маркировка первичной упаковки «ДАБ-2 (субстрат)»



7. Маркировка первичной упаковки «Раствор Д»

РАСТВОР Д

100X Концентрированный раствор
Гертикад-тест

объем 100 мл
IVD

Хранить при температуре +2-8°C
Серия Годен до
+ 9900 мл дистиллированной воды
Приготовленный «Раствор Д» можно хранить 2 суток при -2-8°C





8. Маркировка первичной упаковки «Раствор П»

РАСТВОР П

25X Концентрированный раствор
Гертикад-тест

Объем 100 мл
IVD

Хранить при температуре 2-8°C
Серия Годен до
+ 2400 мл дистиллированной воды
Приготовленный «Раствор П» можно хранить 2 суток при -2-8°C





9. Маркировка первичной упаковки «Отрицательный контроль»

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ

Гертикад-тест

Объем 1 мл
IVD

Хранить при температуре 2-8°C
НЕ замораживать!
Серия Годен до
Готов к использованию





10. Маркировка первичной упаковки «Раствор Б»

РАСТВОР Б

Гертикад-тест

Объем 15 мл
IVD

Хранить при температуре 2-8°C
Не замораживать!
Серия Годен до
Готов к использованию





11. Маркировка контейнера с контрольными стеклами

Контрольные стекла HER2

Гертикад-тест

5 шт

IVD

Хранить при температуре от 2 до 8°C
Серия Годен до



12. Маркировка вторичной упаковки (набор реагентов), «Гертикад-тест»

**Набор реагентов для определения уровня
экспрессии онкобелка HER2
иммуногистохимическим методом
(Гертикад-тест)
по ТУ9398-001-45739777-2015
«Гертикад-тест»
Только для *in vitro* диагностики **IVD**
80 тестов**

Серия _____

Дата изготовления _____

Годен до _____

**Регистрационный
удостоверение**

Состав набора:
 Первичные антитела, 2х 5 мл
 Система детекции, 15 мл
 ДАБ-1 (хромоген), 1 мл
 ДАБ-2 (субстрат), 15 мл,
 Раствор Д 100х, 2х100 мл
 Раствор П, 25х, 4х100 мл
 Отрицательный контроль, 1 мл
 Раствор Б, 15 мл
 Контрольные стекла HER2, 2 контейнера по 5 шт.

Хранить при температуре от 2 до 8 °C
в защищенном от света месте. Не замораживать
 ПРОИЗВЕДЕНО:
 ЗАО «БИОКАД».

Россия, 198515, г. Санкт-Петербург,
 Петродворцовый р-н, п. Стрельна, ул. Связи, д. 34, лит. А
 Тел.: +7 (495) 992 66 28
 Факс: +7 (495) 992 82 98

BIOCAD
Biotechnology Company

13. Маркировка вторичной упаковки (набор реагентов), «Гертикад-тест АТ 150»

Набор реагентов для определения уровня экспрессии онкобелка HER2 иммуногистохимическим методом (Гертикад-тест) по ТУ9398-001-45739777-2015 «Гертикад-тест АТ 150»

Только для *in vitro* диагностики  На 150 исследований

Регистрационное удостоверение _____

Серия _____

Дата изготовления _____

Состав:
«Первичные антитела», 15 мл
Контрольные стекла HER2, _____ контейнера по 5 шт.

Способ применения и меры предосторожности – см.инструкцию по применению
Хранить при температуре + 2...+8 °С в защищенном от света месте.
Не замораживать!

ПРОИЗВЕДЕНО:
ЗАО «БИОКАД»,
Россия, 198515, г. Санкт-Петербург,
Петродворцовый р-н,
п. Стрельна, ул. Связи, д. 34, лит. А

Тел.: +7 (495) 992 66 28
Факс: +7 (495) 992 82

BIOCAD
Биотехнологическая Компания

14. Маркировка вторичной упаковки (набор реагентов), «Гертикад-тест АТ 250»

Набор реагентов для определения уровня экспрессии онкобелка HER2 иммуногистохимическим методом (Гертикад-тест) по ТУ9398-001-45739777-2015 «Гертикад-тест АТ 250»

Только для *in vitro* диагностики  На 250 исследований

Регистрационное удостоверение _____

Серия _____

Дата изготовления _____

Состав:
«Первичные антитела», 25 мл
Контрольные стекла HER2, _____ контейнера по 5 шт.

Способ применения и меры предосторожности – см.инструкцию по применению
Хранить при температуре + 2...+8 °С в защищенном от света месте.
Не замораживать!

ПРОИЗВЕДЕНО:
ЗАО «БИОКАД»,
Россия, 198515, г. Санкт-Петербург,
Петродворцовый р-н,
п. Стрельна, ул. Связи, д. 34, лит. А

Тел.: +7 (495) 992 66 28
Факс: +7 (495) 992 82

BIOCAD
Биотехнологическая Компания

15. Маркировка транспортной тары

**Набор реагентов для определения уровня
экспрессии онкобелка HER2
иммуногистохимическим методом
(Гертикад-тест)**

Вариант исполнения _____
Только для *in vitro* диагностики IVD

Серия _____
Дата изготовления _____
Годен до _____

Количество наборов _____
Масса нетто групп.упаковки _____
Масса брутто групп.упаковки _____
Масса нетто набора _____

Хранить и транспортировать при температуре от 2 до 8 °С
в защищенном от света месте. Не замораживать!

ПРОИЗВЕДENO:

ЗАО «БИОКАД».

Россия, 198515, г. Санкт-Петербург,
Петродворцовый р-н, п. Стрельна, ул. Связи, д. 34, лит. А

Тел.: +7 (495) 992 66 28
Факс: +7 (495) 992 82 98

BIOCAD
Biotechnology Company

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

6 (шесть) листов

Вице-президент ЗАО «БИОКАД»

Иванов Р.А.

