

Инструкция по применению медицинского изделия для диагностики in vitro

**Набор реагентов для выявления PD-L1- экспрессирующих клеток
иммуногистохимическим методом
«PD-L1-CAD- тест»
по ТУ 21.20.23-003-45739777-2017**

Для полуавтоматического и ручного иммуногистохимического окрашивания

«PD-L1-тест» рассчитан на 33 теста (36 предметных стекол) для иммуностейнера открытого типа Thermo LabVision 360: 33 предметных стекла с образцами пациентов, 1 контрольное стекло для исследования с раствором «Первичные антитела»; 1 контрольное стекло для исследования с «Отрицательным контролем» 1 стекло с внутрилабораторным тканевым контролем

«PD-L1-тест» рассчитан на 45 тестов (48 предметных стекол) для иммуностейнера открытого типа Dako Link 48: 45 предметных стекол с образцами пациентов, 1 контрольное стекло для исследования с раствором «Первичные антитела»; 1 контрольное стекло для исследования с «Отрицательным контролем» 1 стекло с внутрилабораторным тканевым контролем.

«УТВЕРЖДАЮ»
Руководитель группы
производства и регистрации МИ
ЗАО «БИОКАД»
Вертягина Н.В.
2018 г.



1. Наименование медицинского изделия

1.1. Полное наименование - Набор реагентов для выявления PD-L1- экспрессирующих клеток иммуногистохимическим методом «PD-L1-CAD-тест» по ТУ 21.20.23-003-45739777-2017 (далее по тексту – набор реагентов).

1.2. Сокращенное наименование - «PD-L1-CAD-тест».

2. Информация об исполнении изделия

Набор реагентов «PD-L1-CAD-тест» выпускается для постановки анализа на иммуностейнерах открытого типа или для ручной постановки анализа.

3. Назначение

Набор реагентов предназначен для качественного определения лиганда программируемой смерти клеток 1 (programmed death-ligand (PD-L1)) в клиническом образце методом ферментного иммуногистохимического окрашивания.

4. Область применения

Патологоанатомическая диагностика, онкология, в патологоанатомических бюро/ отделениях.

5. Функциональное назначение теста

Функциональное назначение теста, выполняемого с помощью набора реагентов, заключается в выявлении маркера PD-L1, являющегося лигандом рецептора программируемой смерти - PD1, с целью выделения группы пациентов с наибольшей вероятностью выраженного ответа на иммунотерапию препаратами на основе моноклональных антител к таким мишеням, как PD1 и PD-L1.

6. Популяционные, демографические аспекты применения

Злокачественные онкологические новообразования занимают второе место по показателям заболеваемости и смертности в РФ, уступая первое место сердечно-сосудистым заболеваниям.

Однако по прогнозам специалистов через 6-8 лет злокачественные онкологические новообразования могут обогнать по заболеваемости сердечно-сосудистые. По данным Минздрава, показатель смертности населения от новообразований за 2017 год в РФ составил 194,2 на 100 тыс. человек.

К наиболее распространенным злокачественным новообразованиям относятся рак органов дыхания (трахеи, бронхи, легкое), мочеполовой системы, желудка, молочной железы, кишечника, кожи. Представленность различных видов злокачественных новообразований зависит от половой принадлежности. Так, среди мужского населения РФ наиболее часто встречаются опухоли легких, тогда как среди женщин – рак молочной железы.

Показатель заболеваемости злокачественными новообразованиями за 2016 год в РФ составил 408,6 на 100 тыс. человек. Максимальное число заболеваний приходится на возрастную группу 65-69 года (17,2%): у мужчин – 19,5 %, у женщин 15,2 %. Различия в возрастной структуре заболеваемости мужского и женского населения проявляются отчетливо после 30 лет. Удельный вес злокачественных новообразований в возрасте 30-49 лет в группе заболевших женщин (13,6 %) выше, чем в группе заболевших мужчин (7,8 %).

У всех заболевших в возрасте до 30 лет наиболее часто развиваются гемобластозы (31,1 %), злокачественные опухоли головного мозга и других отделов нервной системы (10,1 %), щитовидной железы (7,9 %), шейки матки (6,3 %), кожи с меланомой (5,6 %), яичника (4,1 %), соединительной и других мягких тканей (3,6 %), костей и суставных хрящей (3,5 %).

В возрастной группе 30-59 лет наибольший удельный вес имеют злокачественные новообразования молочной железы (15,9 %), трахеи, бронхов, легкого (9,1 %), кожи с меланомой (10,0 %), шейки матки (6,1 %), тела матки (5,3 %), кроветворной и лимфатической ткани (5,2 %), желудка (5,0%), почки (4,7 %), ободочной кишки (4,6 %).

В структуре заболеваемости лиц пожилого возраста (60 лет и старше) преобладают опухоли кожи с меланомой (16,4 %), трахеи, бронхов, легкого (10,8 %), молочной железы (9,7 %), ободочной кишки (7,9 %), желудка (6,9 %).

Установлено, что онкологическое заболевание есть результат нарушения работы иммунной системы человека. Опухоль способна уходить из-под контроля иммунной системы, используя механизмы иммуносупрессии, причем механизмы «невидимости» для собственного иммунитета развиваются с самых ранних стадий развития онкологических заболеваний.

Рецептор программируемой клеточной гибели PD-1 и его лиганд PD-L1 участвуют в регуляции клеточного звена иммунитета. Рецептор PD-1 экспрессируется на активированных эффекторных Т-лимфоцитах и в норме служит для защиты собственных клеток от аутоиммунной реакции в условиях инфекции и воспаления в тканях. Связывание лигандов PD-1 (PD-L1 и PD-L2), с рецептором PD-1 ингибирует пролиферацию Т-клеток и выработку цитокинов.

Открытие возможности селективного ингибирования рецептора PD-1 и его лигандов (PD-L1 и PD-L2) дало начало новому классу лекарственных средств – препаратов для иммунотерапии (ингибиторов контрольных точек иммунного ответа). Реакции, в которые вступают клетки опухоли с клетками иммунной системы в микроокружении опухоли, влияют на процесс иммунного ответа при различных локализациях и гистологических типах новообразований, в том числе при НМРЛ и метастатической меланоме.

Уровень экспрессии PD-L1 в опухоли часто коррелирует с неблагоприятным прогнозом при лечении. Данные мета-анализа по исследованиям PD-L1 при НМКРЛ демонстрируют, что экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках коррелирует с общей выживаемостью, при этом значения объединенной величины риска (HR) 1,40 (95 % ДИ: 1,19-1,65, P <0,001), показано снижение общей выживаемости при гиперэкспрессии PD-L1 [12]. Гиперэкспрессия PD-L1 на

иммунных или опухолевых клетках обнаруживается примерно в 35 % случаях при метастатической меланоме, что является значимым прогностическим показателем. В объединенном исследовании 411 пациентов с меланомой, получавших в качестве терапии антитело к PD1 с более чем 6-месячными наблюдениями, показатель объективного ответа на терапию был выявлен у 40 % пациентов [11].

Область применения препаратов для иммунотерапии на основе антител к PD-1 и PD-L1, а также диагностика уровня экспрессии PD-L1 ежегодно расширяется для новых нозологических форм.

7. Показания к применению

Набор реагентов рекомендуется применять при обследовании онкологических больных для определения прогноза течения заболевания и принятия решения о назначении иммунотерапии.

8. Противопоказания к применению

Использование набора реагентов с истекшим сроком годности.

Не соблюдение условий хранения, транспортирования и инструкции по применению.

9. Предназначенный пользователь

Персонал, проводящий исследования с использованием данного набора реагентов, должен владеть 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 PD-L1 статуса.

10. Описание целевого анализа, сведения о его научной обоснованности

Рецептор программируемой клеточной смерти (PD1, CD279) является членом семейства ингибиторных ко-стимулирующих рецепторов CD28. Для данного рецептора идентифицированы два лиганда: PD-L1 (B7-H1, CD274) и PD-L2 (B7-DC, CD273). Взаимодействие PD1 с лигандами обуславливает иммуносупрессию (Рисунок 1). PD1 подавляет эффекторные функции Т-клеток через внутриклеточные и внеклеточные функциональные механизмы. Ингибиторный сигнал через PD1 инициирует статус анергии иммуно-реактивных Т-клеток («истощение» Т-клеток), приводя к тому, что клетки становятся неспособны к клональной экспансии и продукции оптимального уровня эффекторных цитокинов. PD1 может индуцировать апоптоз клеток, уменьшая экспрессию ключевых анти-апоптотических молекул (например, Bcl-xL). Помимо этого, PD1 подавляет образование эффекторных Т-клеток, поддерживая образование Т-регуляторных лимфоцитов (Treg) [1], [2].

Лиганды PD-L1 и PD-L2 различаются по своему уровню экспрессии. Так, PD-L1 в норме экспрессируется на большом количестве различных клеток (Т-, В-клеток, макрофагов, дендритных клеток, эндотелиальных клеток сердца, β -клеток поджелудочной железы, глиальных клеток и др. [4, 8]), тогда как экспрессия PD-L2 носит индуцибельный характер и ограничена меньшим разнообразием клеток (экспрессируется лишь на активированных макрофагах и дендритных клетках [3]).

Экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках характерна для новообразований различных локализаций и гистологических типов, выявляется при меланоме, немелкоклеточном раке легкого [6], опухолях яичников [5], почки [9], мозга [10], пищевода [7] и других. Значение также имеет экспрессия PD-L1 на так называемых TILs (Tumor-infiltrating immune cells, опухоль-инфильтрующие лимфоциты) – иммунокомпетентных клетках, находящихся в опухоли. Уровень экспрессии PD-L1 в опухоли часто коррелирует с неблагоприятным прогнозом при лечении.

Механизмы «невидимости» для собственного иммунитета развиваются с самых ранних стадий развития онкологических заболеваний. Именно это делает PD1 и PD-L1 выгодными мишенями для создания противоопухолевых препаратов для моно- и комбинированной терапии в онкологии, что подтверждается экспериментальными данными. Кроме того, PD-L1-статус опухоли тесно коррелирует с ответом на анти-PD-1 и анти-PD-L1-терапию.

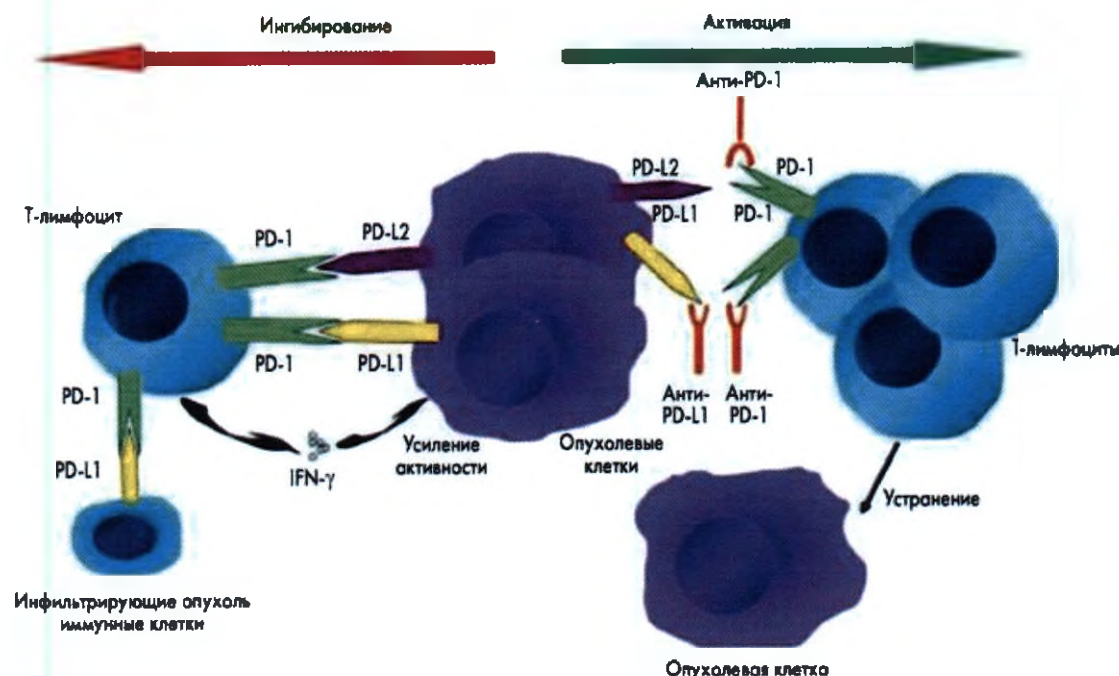


Рисунок 1. Механизм блокирования иммунных контрольных точек ингибиторами PD-1 и PD-L1

В целом, PD-1/PD-L1 взаимодействие ослабляет противоопухолевый Т-клеточный ответ посредством влияния на активность реактивных Т-клонов. Препараты на основе моноклональных антител к PD-1 и PD-L1 позволяют блокировать механизмы, приводящие к нарушению иммунного ответа через PD-1/PD-L1 взаимодействие, а именно:

- Подавлять индукцию апоптоза активированных Т-клеток. Блокада PD-1/PD-L1 пути устраняет подавляющее влияние на экспрессию антиапоптотического гена Bcl-xL, поддерживающего жизнеспособность Т-клетки.
- Блокировать индукцию Т-клеточной анергии. Установлено, что опухолевые процессы характеризуются формированием «истощенных» Т-клеток, особенностями которых является снижение эффекторной активности и высокая экспрессия ингибирующих рецепторов, в том числе и PD-1. Блокирование PD-1/PD-L1 пути восстанавливает способность «истощенных» клеток к пролиферации и секреции цитокинов.
- Предотвращать усиление функции регуляторных Т-клеток. PD-L1 усиливает пролиферацию Treg через подавление mTOR, AKT, S6 и других сигнальных путей, тем самым снижая активность эффекторных Т-клеток. Подавление PD-1/PD-L1 взаимодействия приводит к возрастающей активности CD8⁺ Т-клеток и снижению активности Treg, вследствие чего усиливается противоопухолевый ответ.
- Препятствовать подавлению пролиферации эффекторных Т-клеток. PD-1 блокирует пролиферацию Т-клеток в фазе G1 за счет активации Smad3.
- Предотвращать ограничение активации Т-клеток и продукции IL-2. Воздействие препарата на рецептор PD-1 не только способно «снимать блок» с активации Т-клеток и

продукции IL-2, но и усиливать формирование долгосрочного противоопухолевого иммунитета путем трансформации CD8+ Т-клеток в клетки памяти, что препятствует процессу метастазирования.

Материалом для исследования набором реагентов являются срезы тканей биопсийного материала опухолей, фиксированные в формалине и залитые в парафин.

11. Принцип аналитического метода

Иммуногистохимия (ИГХ) - метод выявления локализации белкового компонента (антигена) с помощью иммунологических и гистохимических реакций; при этом иммунологический анализ срезов тканей проводится в условиях сохранения морфологии клеток.

Иммуногистохимический метод основан на том, что немаркированные первичные антитела, находящиеся в растворе «Первичные антитела», связываются с искомым антигеном (выявляемым веществом). Образовавшийся комплекс антиген-антитело выявляют при помощи вторичных меченых антител (раствор «Система детекции»), при этом первичные антитела служат для вторичных антигенами. Визуализация взаимодействия антигена с антителом может быть осуществлена множественными путями. В большинстве случаев вторичные антитела связаны с ферментом пероксидазы хрена. Активность пероксидазы хрена в присутствии донора электронов сначала приводит к образованию комплекса фермента с субстратом (комплекс ДАБ хромоген-субстрат) 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.

Имеется несколько доноров электронов, которые окрашиваются при окислении и поэтому называются хромогенами. Это свойство в сочетании с тем, что они становятся нерастворимыми при окислении, делает эти вещества полезным для иммуногистохимии. В методике используется хромоген ДАБ. Он образует коричневый конечный продукт, который нерастворим в спирте и других органических растворителях.

Для восстановления аффинности и авидности иммунной реакции после возможной модификации антигенных эпитопов в ходе фиксации формалином необходимо проводить демаскировку антигена («открытие» антигенных детерминант). Демаскировка должна проводиться с использованием тепловой обработки в цитратном буфере (рабочий раствор Д). Метод повышает чувствительность теста и интенсивность окраски.

Результаты окрашивания оценивают визуально с помощью светового микроскопа. Интенсивность окрашивания зависит от рецепторной нагрузки (количества белка на мембране опухолевых клеток, связавшегося с первичным антителом во время проведения ИГХ-окрашивания).

12. Состав и описание набора

Состав набора реагентов «PD-L1-CAD-тест» представлен в Таблице 1.

Таблица 1. Состав набора реагентов (PD-L1-CAD-тест)

Название реагента	Описание реагента	Объем/ кол-во реагента, мл/ шт	Описание фасовки реагента	Кол- во, шт
Раствор «Первичные антитела»	Содержит моноклональные кроличьи антитела к PD-L1. Консервант-азид натрия – 1 г/л. Готов к использованию	15	Флакон-капельница. Крышка красного цвета.	1

Раствор «Отрицательный контроль»	Буфер для разведения антител, не содержащий антитела против белка PD-L1. Консервант-азид натрия – 1 г/л. Готов к использованию.	5	Флакон-капельница. Крышка красного цвета.	1
Раствор «Система детекции»	Антитела козы против первичных антител, конъюгированные с ферментом пероксидазой хрена в буфере, содержащем консервант. Готов к использованию	15	Флакон-капельница, светонепроницаемый. Крышка белого цвета.	1
Раствор «ДАБ-1 (хромоген)»	Концентрированный раствор хромогена ДАБ (3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид) в стабилизирующем растворе.	1,0	Флакон-капельница, светонепроницаемый. Крышка белого цвета.	1
Раствор «ДАБ-2 (субстрат)»	Субстратный буфер, содержащий 0,1 % перекиси водорода и стабилизатор	15	Флакон-капельница. Крышка желтого цвета.	1
Раствор для блокировки «Раствор Б»	Раствор, содержащий 3 % перекись водорода. Готов к использованию.	15	Флакон-капельница. Крышка зеленого цвета.	1
Промывочный раствор «Раствор П 30х»	Концентрированный 30-кратный буфер на основе трис(гидроксиметил)аминометана, содержащий консервант-азид натрия – 0,1 г/л, для промывки образцов.	100	Флакон. Крышка белого цвета	3
Буфер для демаскировки «Раствор Д 20х»	Концентрированный 20-кратный буфер на основе цитрата натрия, для проведения демаскировки антигена».	100	Флакон. Крышка белого цвета	3
Контрольные стекла PD-L1	Стекла с зафиксированной положительной клеточной линией «PD-L1+» и отрицательной клеточной линией «PD-L1-».	по 5 шт. в каждом контейнере	Контейнер из полипропилена с крышками типа «стопка»	4

Комплект поставки: набор реагентов, инструкция, паспорт качества.

Расход компонентов набора при дробных постановках см. Приложение 1.

13. Характеристики набора реагентов

13.1 Показатели функционирования

13.1.1 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность (порог обнаружения рецепторной нагрузки на клетку) составляет не менее 5×10^3 рецепторов на клетку.

На клеточной линии ES-2, содержащей минимальное для выявления методом ИГХ количество рецепторов PD-L1, 5×10^3 рецепторов на клетку, обнаруживается слабое частичное светло-коричневое мембранное окрашивание не менее 50 % клеток при просмотре всего образца.

На положительной клеточной линии PD-L1 (+) NCI-H226, содержащей не менее 7×10^5 рецепторов на клетку, обнаруживается выраженное коричневое мембранное окрашивание более 80 % клеток при просмотре всего образца.

На клинических образцах FFPE-срезов НМКРЛ и меланомы продемонстрировано окрашивание в диапазоне от 0-100 % положительных опухолевых и иммунных клеток (при подсчете согласно п.24.2.1 и п.24.2.2 настоящей инструкции).

13.1.2 Аналитическая специфичность

Первичное моноклональное дАТ, клон BCDdx10.20, специфично к цитоплазматическому домену рецептора PD-L1.

На структурах, достоверно не содержащих на поверхности рецептор PD-L1, или содержащих его в количестве ниже, чем предел обнаружения – окрашивание отсутствует.

Проведенные исследования подтвердили отсутствие окрашивания предлагаемым клоном дАТ к PD-L1, BCDdx10.20, методом ИГХ большинства нормальных тканей (Таблица 2). Положительные тканевые контроли (ПТК), представленные нормальными тканями миндалин

и плаценты, окрашивались в соответствие с п.19.3 настоящей инструкции.

Следует отметить, что в некоторых случаях при окраске клинических образцов FFPE-срезов меланомы может наблюдаться слабое мембранное окрашивание нормальных клеток эпителиального происхождения, что не противоречит литературным данным для ИГХ экспрессии PD-L1 в здоровых тканях (13,14).

Таблица 2. Кросс-реактивность дАТ, клон BCDdx10.20, на панели нормальных тканей.

Тип ткани	«PD-L1-CAD-тест», постановка 2 серий набора
ПТК: плацента	умеренно-сильное мембранное, слабое цитоплазматическое окрашивание клеток трофобласта. Негативная реакция в стромальных клетках и сосудах
ПТК: миндалина	сильно-позитивная реакция эпителия крипт, от слабой до умеренной позитивная реакция в макрофагах герминативных центров. Негативная реакция в эндотелии, фибробластах и поверхностном эпителии
Щитовидная железа	Нет окрашивания
Молочная железа	Нет окрашивания
Желудок	Нет окрашивания
Пищевод	Нет окрашивания
Яичник	Нет окрашивания
Печень	Нет окрашивания
Толстая кишка	Нет окрашивания
Почка	Нет окрашивания
Надпочечник	Нет окрашивания
Семенник	Нет окрашивания
MCF-7 (3 среза)	Нет окрашивания
	Нет окрашивания
	Нет окрашивания

Для «Отрицательного контроля», не содержащего антитела к PD-L1, во время проведения ИГХ-анализа окрашивание PD-L1-позитивной ткани отсутствует, что говорит об отсутствии неспецифических взаимодействий компонентов набора.

13.1.3 Воспроизводимость

Воспроизводимость определяли внутри одного цикла окрашивания и между разными циклами окрашивания с использованием образцов немелкоклеточного рака легкого и меланомы.

Для оценки внутрисерийной воспроизводимости было проведено одновременное окрашивание клинических образцов тремя наборами «PD-L1-CAD-тест» одной серии на одном и том же оборудовании одним и тем же исследователем. Для этого с 47-х парафиновых блоков (27 блоков НМРЛ и 20 блоков меланомы) было изготовлено по три среза. Процент результатов, по которым всеми тремя наборами «PD-L1-CAD-тест» одной серии получились одинаковые значения $44/47 \cdot 100 \% = 94 \%$ случаев.

Для оценки межсерийной воспроизводимости было проведено окрашивание клинических образцов на одном и том же оборудовании одним и тем же исследователем в разные дни набором «PD-L1-CAD-тест» двух разных серий. Процент результатов, по которым двумя различными сериями наборов «PD-L1-CAD-тест» получились одинаковые значения $45/47 \cdot 100 \% = 96 \%$ случаев.

Для оценки воспроизводимости результата между разными исследователями было проведено окрашивание клинических образцов на одном и том же оборудовании в один и тот же день разными исследователями наборов «PD-L1-CAD-тест» одной серии. Процент результатов, по которым у двух исследователей при окрашивании одной серией набора «PD-L1-CAD-тест» получились одинаковые значения, $46/47 \cdot 100 \% = 98 \%$ случаев.

13.2 Показатели контроля качества

13.2.1 Положительный результат ИГХ

Контроль положительного результата ИГХ на контрольных стеклах PD-L1 проводится по положительной клеточной линии PD-L1 «+».

Результаты проверки считают положительными, если выполняются требования таблицы 3.

13.2.2 Отрицательный результат ИГХ

Контроль отрицательного результата ИГХ на контрольных стеклах PD-L1 проводится по клеточной линии PD-L1 «-».

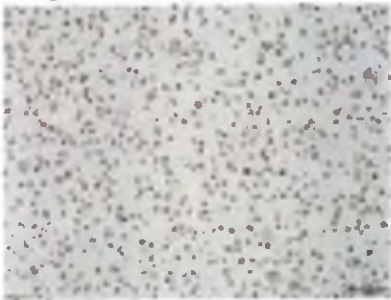
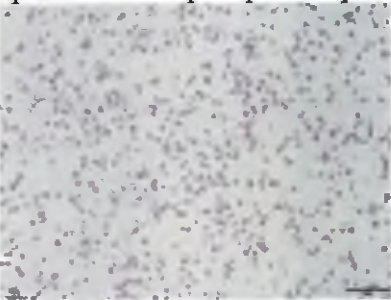
Результаты проверки считают положительными, если выполняются требования таблицы 3.

13.2.3 Отсутствие неспецифического окрашивания реагентами

Оценка отсутствия неспецифического окрашивания реагентами на контрольных стеклах PD-L1 проводится с использованием раствора «Отрицательный контроль».

Результаты проверки считают положительными, если выполняются требования таблицы 3.

Таблица 3

Характеристика	Результат
Положительный результат ИГХ, контрольные стекла PD-L1, клеточная линия «PD-L1 +»	Более 80 % клеток имеют выраженное коричневое мембранное окрашивание при просмотре всего образца.  Примечание: увеличение x200
Отрицательный результат ИГХ, контрольные стекла PD-L1, клеточная линия «PD-L1 -»	Отсутствие цитоплазматического и /или мембранного окрашивания при просмотре всего образца.  Примечание: увеличение x200
Отсутствие неспецифического окрашивания реагентами, контрольные стекла PD-L1 «+» и «-»	Неспецифическое окрашивание отсутствует.  Примечание: увеличение x200

13.3 Диагностические характеристики

13.3.1 Диагностическая чувствительность

90 % (нижняя граница 1-стороннего 90%-ного ДИ) для одной серии и 92 % (нижняя граница 1-стороннего 90%-ного ДИ) для второй серии (при постановке образцов немелкоклеточного рака легкого).

13.3.2 Диагностическая специфичность

94 % (нижняя граница 1-стороннего 90%-ного ДИ) для одной серии и 88 % (нижняя граница 1-стороннего 90%-ного ДИ) для второй серии (при постановке образцов немелкоклеточного рака легкого).

14. Меры предосторожности

Только для профессиональных пользователей.

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

14.2 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».

14.3 Персонал, проводящий исследования с использованием данного набора реагентов, должен владеть навыками проведения фиксации и проводки гистологических срезов, навыками интерпретации результатов полуколичественного иммуногистохимического анализа, навыками работы на вышеперечисленном оборудовании и иметь соответствующее профильное образование (врачи-лаборанты, медицинские техники, медицинские технологи, лаборанты-гистологи). Весь персонал лаборатории должен пройти специальное обучение для тестирования PD-L1 статуса.

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

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

14.6 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 и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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

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

15. Риски применения медицинского изделия, противопоказания, ожидаемые и предсказуемые побочные эффекты, связанные с применением медицинского изделия по назначению

15.1 Набор реагентов «PD-L1-CAD-тест» применяется для диагностики *in vitro*, поэтому прямой контакт с пациентом отсутствует.

15.2 Противопоказания, ожидаемые и предсказуемые побочные эффекты для пациента не обнаружены.

15.3 Раствор «Первичные антитела», «Раствор П 30х» и «Отрицательный контроль» содержат азид натрия в качестве консерванта, который используется в незначительных количествах. Эти компоненты после работы должны сливаться в отдельные емкости для утилизации. В целях обеспечения дополнительной безопасности данные компоненты промаркированы знаком «Внимание!» 

15.4 Раствор «ДАБ-1 (хромоген)» содержит 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид, который обладает канцерогенными свойствами. Этот компонент после работы должен сливаться в отдельные емкости для утилизации. В целях обеспечения дополнительной безопасности данные компоненты промаркированы знаком «Внимание!» 

16. Информация о наличии в медицинском изделии лекарственного средства для медицинского применения, материалов животного и /или человеческого происхождения

16.1 В наборе реагентов «PD-L1-CAD-тест» лекарственные средства отсутствуют.

16.2 Растворы «Первичные антитела» и «Отрицательный контроль» в своем составе содержат бычий сывороточный альбумин (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 

16.3 Контрольные стекла PD-L1 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 PD-L1 как с потенциально опасным материалом и работы проводить с использованием защитных перчаток.

17. Оборудование и материалы, необходимые для работы

17.1 Необходимые, но не предоставляемые реактивы и материалы:

- Высокоадгезивные стекла с покрытием поли-L-лизин или положительно-заряженные стекла, пригодные для проведения ИГХ
- Покровные стёкла;
- Стандартные растворы, используемые в иммуногистохимии (этанол, ксилол/изопропанол и т.п.);
- Дистиллированная или деионизованная вода;
- Гематоксилин Майера;
- Среда для заключения препарата;
- Внутрилабораторный образец ткани миндалины или плаценты – для контроля качества процесса.

17.2 Необходимое, но не предоставляемое оборудование:

- 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, проведенных с отклонениями от инструкции производителя, производитель ответственности не несет.

- Автостейнер 360 / 480 или 720, Thermo Scientific или аналогичный автостейнер открытого типа (например, Dako Link 48 автостейнер);

Внимание! Не рекомендуется использовать иммуностейнеры закрытого типа! За результаты исследований, проведённых с отклонениями от инструкции производителя, производитель ответственности не несет.

- Принтер для печатания этикеток на стекла;
- Флакончики для иммуностейнера;
- Световой микроскоп (увеличение объективов $\times 4-40$);
- Холодильник (температурный режим $+2...8^{\circ}\text{C}$);
- Таймер;
- Контейнеры с держателем для термической обработки материала при проведении демаскировки антигена;
- Индивидуальные защитные материалы.

17.2.1 В случае использования набора для окрашивания вручную (без использования иммуностейнера), необходимо строго соблюдать все пункты инструкции и отслеживать время инкубации таймером! Для окрашивания вручную дополнительно требуется:

- Батарея емкостей для депарафинизации и регидратации (ёмкости для окрашивания);
- Влажная камера для инкубации первичных антител;
- Дозаторы различных объемов с набором наконечников: малого объема 0,5-10 мкл, среднего объема 10-200 мкл, большого объема – до 1000 мкл;
- Стеклопосуда для иммуногистохимических исследований (колбы для буферов, стаканы, цилиндры, ёмкости, бутылки);
- Гидрофобный карандаш для иммуногистохимии;
- Фильтровальная бумага.

18. Анализируемые пробы

Материалом для исследования набором реагентов являются срезы тканей биопсийного или операционного материала опухолей, фиксированные в формалине и залитые в парафин.

18.1 Требования к образцам, используемым для исследования

Некачественный исходный материал и артефакты, связанные с неадекватной подготовкой материала, могут приводить к ошибочной интерпретации результатов. Исследование уровня экспрессии PD-L1 проводится только после рутинного гистологического исследования и подтверждения гистологического типа опухоли. Цитологический материал для определения уровня экспрессии PD-L1 не используется.

Общие требования:

! Анализируется гистологический материал опухоли, не подвергнутый предоперационной лучевой и/или химиотерапии. В случае отсутствия материала первичной опухоли возможна оценка экспрессии PD-L1 в метастазах;

! Для исследования должен использоваться операционный или биопсийный материал;

! Материал должен фиксироваться исключительно в свежем 10 % растворе нейтрального забуференного формалина. Использование других фиксаторов недопустимо!

! Для биопсийного материала минимальное время фиксации составляет 10 ч., для операционного – 20 ч.

! Гистологическая проводка материала должна осуществляться в автоматическом режиме;

! Необходимо избегать длительного выдерживания в расплавленном парафине, поскольку

высокие температуры могут разрушать эпитопы;

! Допускается использование только свежего парафина;

! Толщина срезов ткани должна составлять 3-4 мкм.

18.2 Информация об интерферирующих веществах или ограничениях, связанных с образцами, которые могут повлиять на результат исследования

Критерии исключения образцов из анализа:

- Ткань фиксирована не нейтральным забуференным формалином;
- Неадекватная экспозиция фиксации;
- В образце нет инвазивного рака;
- Яркое неспецифическое окрашивание диаминобензидином нормальных участков ткани.
- Недостаточное для анализа количество опухолевых клеток в образце (менее 100 опухолевых клеток).

18.3 Условия хранения анализируемых образцов

Парафиновые блоки хранятся неопределенно долгое время при комнатной температуре без потери качества материала.

Окрашенные, заключенные в среду, образцы необходимо хранить при комнатной температуре в защищенном от света месте.

Положение о патогистологическом обследовании биопсийного и операционного материала содержится в Приложении к Приказу МИНЗДРАВА РФ № 179-Н ОТ 24.03.2016 Г. О ПРАВИЛАХ ПРОВЕДЕНИЯ ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ 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».

18.4 Биологический референтный интервал применения

На клинических образцах FFPE-срезов НМКРЛ и меланомы продемонстрировано окрашивание в диапазоне от 0-100 % положительных опухолевых и иммунных клеток.

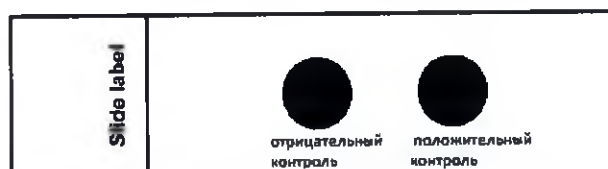
19. Контроли

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.

На каждый запуск стейнера необходимо использовать 2 контрольных стекла (одно стекло для постановки с раствором «Первичные антитела» и одно - для постановки с раствором «Отрицательный контроль») и 1 внутрилаборный (тканевой) контроль ИГХ, нанесенный на каждое стекло с образцами пациентов или идущий в постановке отдельным стеклом!

Оценивать реакцию на экспрессию PD-L1 в исследуемой опухоли можно только при адекватном окрашивании контрольных клеточных образцов на контрольных стеклах.

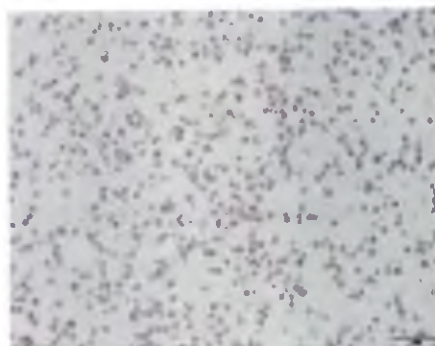
Расположение контрольных клеточных образцов:



19.1 Контрольные стекла PD-L1 (входят в состав набора реагентов):

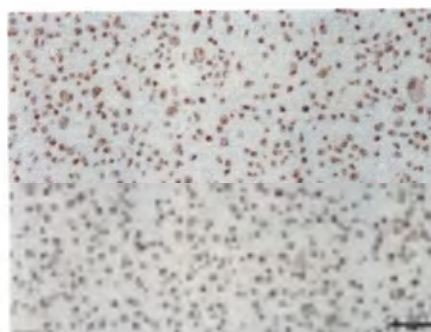
Контрольные стекла PD-L1 представляют собой высокоадгезивные предметные стекла с нанесенными фиксированными в 10 % забуференном формалине и залитыми в парафин культивируемыми клеточными линиями рака молочной железы человека (отрицательная клеточная линия «PD-L1-») и рака легкого (положительная клеточная линия «PD-L1+») с известным, подтвержденным уровнем экспрессии белка PD-L1:

- В качестве **отрицательного контроля** используется клеточная линия без экспрессии PD-L1 (увеличение x200):



Отсутствие цитоплазматического и /или мембранного окрашивания при просмотре всего образца.

- В качестве **положительного контроля** используется клеточная линия с экспрессией PD-L1 (увеличение x200):



Более 80 % клеток имеют выраженное коричневое мембранное окрашивание при просмотре всего образца.

19.1.1 Информация о прослеживаемости значений, заданных для контрольных материалов

Выпуск серии контрольных стекол PD-L1 сопровождается контролем их качества с определением уровня экспрессии PD-L1 методом иммуногистохимии на открытом иммуностейнере.

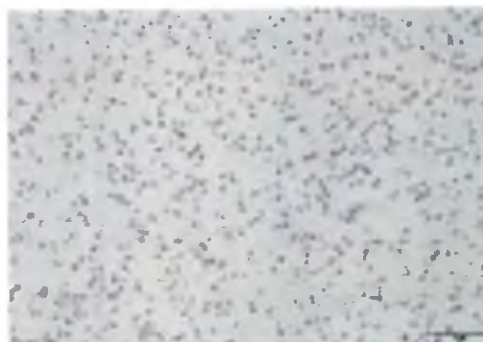
Иммуногистохимическое окрашивание проводится на иммуностейнере открытого типа LabVision 360 (Thermo) в соответствии с валидированной методикой проведения контроля качества контрольных материалов.

19.2 Раствор «Отрицательный контроль» (входит в состав набора реагентов)

Представляет собой буфер для разведения антител, не содержащий антитела против белка PD-L1.

Для постановки «Отрицательного контроля» необходимо использовать контрольное стекло PD-L1 при каждом запуске стейнера (см.п.19).

Контроль необходим для оценки вероятности неспецифического взаимодействия, обусловленного чем-то иным, кроме первичных антител. 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 (увеличение x200):

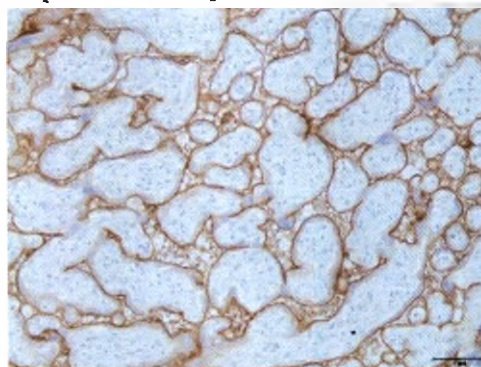


Наличие положительной окраски свидетельствует о неспецифичности реакции.

19.3 Внутрिलाбораторный контроль ИГХ (не предоставляется, рекомендуется использовать при каждой постановке).

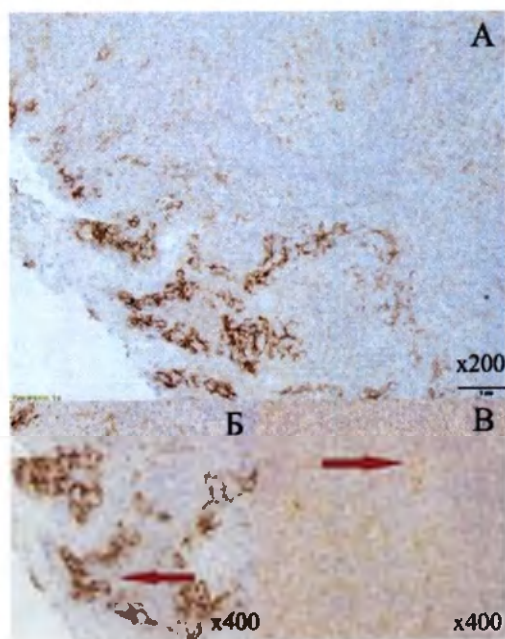
С целью подтверждения качественной пробоподготовки материала в лаборатории на каждый запуск стейнера рекомендуется дополнительно готовить внутрिलाбораторный образец ткани миндалин или плаценты и окрашивать по протоколу Набором реагентов «PD-L1-CAD-тест». Внутрिलाбораторный образец может быть нанесен на стекло с образцом пациента или на отдельное стекло. Интерпретирование исследуемых образцов возможно только при корректной окраске внутрिलाбораторного контроля:

- Для плаценты – умеренно-сильное мембранное, слабое цитоплазматическое окрашивание клеток трофобласта. Негативная реакция в стромальных клетках и сосудах.



Срез плаценты. Увеличение x200.

- Для миндалин - сильно-положительная реакция эпителия крипт, от слабой до умеренной положительная реакция в макрофагах герминативных центров. Негативная реакция в эндотелии, фибробластах и поверхностном эпителии.



А. Срез миндалины. Увеличение x200.

Б. Яркое мембранное окрашивание клеток крипты (красная стрелка). Увеличение x400.

В. Мембранное окрашивание фолликулярных макрофагов герминативных центров (красная стрелка). Увеличение x400.

20. Ограничения по использованию

20.1 Набор реагентов должен применяться согласно инструкции по применению.

20.2 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

20.3 Наборы реагентов с нарушенным температурным режимом хранения и транспортирования применению не подлежат.

20.4 Не использовать совместно реактивы разных партий набора.

20.5 Ложноположительные или ложноотрицательные результаты могут быть при нарушении процедуры окраски или ошибках на преаналитическом этапе (неадекватная фиксация и проводка материала).

21. Подготовка реагентов для анализа

21.1 Промывочный раствор «Раствор П 30х»

Приготовить рабочий раствор «Раствор П» разведением концентрата «Раствор П 30х» в 30 раз дистиллированной или деионизованной водой:

взять 100 мл 30х-го концентрата «Раствор П 30х» и 2900 мл дистиллированной или деионизованной воды, перемешать, залить в емкость для промывочного буфера, поместить в емкость с раствором шланг от иммуностейнера для забора промывочного буфера. В случае окрашивания вручную следует использовать автоматическую промывочную станцию, либо емкость с промывочным раствором.

Подготовленный к работе «Раствор П» можно хранить при +2...8 °С в течение двух недель.

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

21.2 Буфер для демаскировки «Раствор Д 20х»

Приготовить рабочий раствор «Раствор Д» разведением концентрата «Раствор Д 20х» в 20 раз дистиллированной или деионизованной водой:

взять 75 мл «Раствора Д» и 1425 мл дистиллированной или деионизованной воды, перемешать. Залить в резервуар РТ-модуля. В случае использования водяной бани, рассчитать необходимый объем раствора в зависимости от вместимости емкости для демаскировки.

Подготовленный к работе «Раствор Д» можно хранить при $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 7 суток. Готовый «Раствор Д». использовать однократно! Не применять использованный буфер повторно!

21.3 Заполнение флакончиков для иммуностейнера

При работе на иммуностейнере открытого типа заполнение реагентами флакончиков для иммуностейнера желательно провести за полчаса до окрашивания, чтобы температура реагентов достигла комнатной.

- Перелить необходимый объем раствора «**Раствор Б**», исходя из расхода 100-300 мкл (в зависимости от размера образцов) готового раствора на одно исследуемое стекло, во флакончик для иммуностейнера, поместить флакон в прибор, указать расположение флакона в программном обеспечении.
- Перелить необходимый объем раствора «**Первичные антитела**», исходя из расхода 100-300 мкл (в зависимости от размера образцов) готового раствора на одно исследуемое стекло во флакончик для иммуностейнера, поместить флакон в прибор, указать расположение флакона в программном обеспечении.
- Перелить необходимый объем раствора «**Система детекции**», исходя из расхода 100-300 мкл (в зависимости от размера образцов) готового раствора на одно исследуемое стекло во флакончик для иммуностейнера, поместить флакон в прибор, указать расположение флакона в программном обеспечении.

21.4 Растворы «ДАБ-1 (хромоген)» и «ДАБ-2 (субстрат)»

Непосредственно перед постановкой реакции приготовить рабочий раствор хромогена из расчета 30 мкл «ДАБ-1 (хромоген)» на 1000 мкл «ДАБ-2 (субстрат)» с учетом расхода 100-300 мкл (в зависимости от размера образцов) 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. При работе на иммуностейнере открытого типа залить раствор во флакончик для иммуностейнера и установить в прибор.

Готовый раствор хранению не подлежит!

22. Требования к персоналу, участвующему в выполнении исследований

Персонал, проводящий исследования с использованием набора, должен владеть навыками интерпретации результатов полуколичественного иммуногистохимического анализа, навыками работы на вышеперечисленном оборудовании и иметь соответствующее профильное образование. Весь персонал лаборатории должен пройти специальное обучение для тестирования PD-L1 при НМРЛ и меланоме. Интерпретация результатов окрашивания допускается только квалифицированными патологоанатомами.

23. Проведение анализа

! Анализ рекомендовано проводить при комнатной температуре, диапазон от $+18$ до 24°C .

23.1 Подготовка гистологических срезов

- а. Проводка и заливка ткани в парафин осуществляются по общепринятым схемам.

- б. Получение гистологических срезов с парафиновых блоков производится непосредственно перед проведением иммуногистохимического анализа.
- с. Толщина среза должна составлять 3-4 мкм.
- д. Приготовленные на микротоме срезы монтировать на предметные стекла с высокоадгезивным покрытием. Полученный препарат высушить в термостате при температуре 12-24 часов при температуре +37 ° (или 60 °С в течение 60 минут).
- е. Для проведения внутрилабораторного контроля необходимо подготовить образец ткани миндалины или плаценты.

23.2 Предобработка парафиновых срезов

Необходимо депарафинизировать и регидратировать срезы (исследуемые образцы, два контрольных стекла, внутрилабораторный контроль) с использованием ксилола и этанола или изопропанола (как для обычной гистологии), например:

- а. Выдержать препараты в ксилоле 3 минуты;
- б. Перенести в новый раствор ксилола на 3 минуты;
- с. Выдержать препараты в 96 % этиловом спирте или изопропанолем 3 минуты по 4 смены раствора;
- д. Промыть в дистиллированной/ деионизованной воде 2 минуты.

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

23.3 Процедура демаскировки антигена

Для восстановления аффинности и avidности 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 20х». Метод повышает чувствительность антител и интенсивность окраски.

23.3.1 Метод демаскировки антигена с использованием РТ-модуля

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

Протокол:

- а. Подготовить рабочий раствор для демаскировки антигена «Раствор Д» (см. пункт 21.2. настоящей Инструкции);
- б. Налить в резервуар 1,5 л приготовленного раствора для демаскировки антигена;
- с. Накрыть резервуар крышкой. Зафиксировать крышку с помощью наружной предохранительной защелки;
- д. Установить необходимые параметры:

	Температура	Время
Температура преднагрева	+ 85 °С	до достижения + 85 °С
Температура	+ 97 °С	30 минут
Температура охлаждения	+ 65 °С	до звуковой индикации

- е. Нажать кнопку [RUN] на каждом резервуаре (на дисплее появится значение PREHEAT);
- ф. Дождаться, пока раствор нагреется до выбранной температуры;
- г. Открыть РТ-модуль и погрузить штатив с депарафинизированными стеклами в предварительно нагретый раствор для демаскировки антигена;

h. Накрыть резервуар крышкой. Зафиксировать крышку с помощью наружной предохранительной защелки;

i. Нажать кнопку [RUN] на каждом резервуаре для начала нагрева. На дисплее появится значение WARM-UP и крышка будет заблокирована;

j. Затем, после охлаждения, на экране появится значение DONE и крышка будет разблокирована автоматически.

k. Открыть модуль и извлечь штатив со стеклами из резервуара, извлечь стекла из штатива и поместить в дистиллированную/ деионизованную воду на 3-5 минут (либо поместить стекла в дистиллированную/ деионизованную воду в штативе, если есть соответствующая емкость). Перед запуском иммуностейнера стекла в штативе поместить в стейнер.

ВАЖНО: избегать пересыхания срезов.

ВНИМАНИЕ: допустимо использование водяной бани в качестве альтернативы РТ-модулю (См. 21.3.2).

ВНИМАНИЕ: недопустимо пользоваться иными приспособлениями для демаскировки вроде скороварок и микроволновых печей.

23.3.2 Метод демаскировки антигена с использованием водяной бани.

a. Заполнить контейнер достаточным количеством рабочего раствора «Раствор Д» так, чтобы раствор покрывал стекла и установить температуру более +97 °С;

b. 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;

c. Открыть крышку водяной бани и охлаждать контейнеры со стеклами в течение 20 минут при комнатной температуре.

d. После охлаждения извлечь стекла и поместить в дистиллированную/ деионизованную воду на 3-5 минут (либо поместить стекла в дистиллированную/ деионизованную воду в штативе, если есть соответствующая емкость).

ВАЖНО: избегать пересыхания срезов.

23.4 Процедура окрашивания исследуемых и контрольных образцов

Процедура окрашивания исследуемых и контрольных образцов может осуществляться на иммуностейнерах открытого типа и вручную.

23.4.1 Процедура окрашивания исследуемых и контрольных образцов на стейнерах открытого типа

Краткая маршрутная карта постановки набора «PDL1-CAD-тест» на иммуностейнерах открытого типа представлена в Приложении 3 настоящей инструкции.

a) Создать в программном обеспечении иммуностейнера открытого типа протокол окраски:

Тип процедуры	Условия
Промывка с раствором П (промывочный буфер)	1 раз
Инкубация с раствором Б (перекись)	5 минут
Промывка деионизованной/ дистиллированной водой	1 раз
Промывка с раствором П (промывочный буфер)	1 раз
Инкубация с первичным антителом /Отрицательным контролем (для контрольного стекла)	20 минут
Промывка с раствором П (промывочный буфер)	2 раза
Инкубация с Системой детекции	30 минут

Промывка с раствором П (промывочный буфер)	2 раза
Инкубация с ДАБ	5 минут
Промывка деионизированной/ дистиллированной водой	1 раз

б) Указать в программном обеспечении зону нанесения реактивов на стекло: 1, 2 или 3 в зависимости от расположения образца на стекле и занимаемой площади.

Для контрольных стекол указать нанесение на 3 зоны стекла, т.е. по 100 мкл на каждую зону, суммарно не более 300 мкл на стекло.

В случае необходимости (если анализируемый образец ткани занимает большую площадь на стекле) допустимо в качестве зон нанесения реактивов так же указать все три зоны, т.е. суммарно будет наноситься не более 300 мкл каждого раствора на стекло. Объемы нанесения следует учитывать при приготовлении раствора «ДАБ» и отбирании необходимого количества реактивов во флакончики.

с) Подготовить все растворы, необходимые для ИГХ окрашивания согласно п.21.1-21.3 данной Инструкции и загрузить в стейнер.

! Важно: Раствор ДАБ субстрат-хромоген готовится непосредственно перед нанесением и загружается в стейнер согласно пункту 21.4 данной Инструкции.

д) После демаскировки и охлаждения поместить штатив со стеклами из дистиллированной/ деионизированной воды в иммуностейнер, указать расположение стекол в программном обеспечении.

е) Запустить процесс окраски

ф) По окончании окрашивания провести докрасивание ядер гематоксилином согласно инструкции производителя.

г) Провести обезвоживание 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.

h) Заключить все препараты, используя покровное стекло и среду для заключения;

i) Оценить результаты окрашивания.

21.4.2. Процедура окрашивания исследуемых и контрольных образцов вручную

Краткая маршрутная карта ручной постановки набора «PDL1-CAD-тест» представлена в Приложении 4 настоящей инструкции.

а) Подготовить все растворы, необходимые для ИГХ окрашивания согласно п.21.1-21.2 данной Инструкции.

! Важно: раствор ДАБ субстрат-хромоген готовится непосредственно перед нанесением согласно пункту 21.4 данной Инструкции.

б) Остывшие стекла с исследуемыми образцами, контрольными стеклами и внутрилабораторным контролем вытащить из дистиллированной/деионизированной воды.

с) Обвести срез гидрофобным карандашом для иммуногистохимии во избежание растекания реактива по стеклу. Перед обводкой гидрофобным карандашом лишнюю жидкость со стёкол нужно убрать фильтровальной бумагой.

д) Используя флакон-капельницу, нанести на все образцы несколько капель раствора для блокировки «Раствор Б» таким образом, чтобы образец был полностью покрыт раствором.

е) Инкубировать при комнатной температуре 5 минут.

ф) Промыть все образцы в дистиллированной или деионизированной воде, споласкивая не более 10 секунд,

г) Промыть все образцы в промывочном растворе один раз, споласкивая не более 10

секунд.

h) Используя флакон-капельницу, нанести на исследуемые образцы, одно контрольное стекло и на внутрилабораторный контроль несколько капель раствора «Первичные антитела», таким образом, чтобы обведенные участки образцов были полностью покрыты раствором (количество капель зависит от размера обведенного участка/зоны).

i) На второе контрольное стекло PD-L1 для постановки отрицательного контроля антитела вместо раствора «Первичные антитела» нанести раствор «Отрицательный контроль».

j) Инкубировать 20 минут при комнатной температуре во влажной камере.

k) Аккуратно промыть все стекла промывочным раствором два раза, споласкивая не более 10 секунд.

l) Используя флакон-капельницу, нанести на все образцы несколько капель раствора «Система детекции», таким образом, чтобы образец был полностью покрыт раствором (количество капель зависит от размера обведенного участка/зоны).

m) Инкубировать 30 минут при комнатной температуре во влажной камере.

n) Аккуратно промыть все стекла промывочным раствором два раза, споласкивая не более 10 секунд.

o) Подготовить раствор **ДАБ субстрат-хромоген** согласно пункту 21.4 данной Инструкции непосредственно перед нанесением.

p) Используя дозатор, нанести на все срезы **100 мкл готового раствора хромогена**, таким образом, чтобы образец был полностью покрыт раствором (в случае необходимости возможно увеличение объема нанесения).

q) Инкубировать при комнатной температуре 5 минут.

r) Аккуратно промыть все стекла дистиллированной или деионизованной водой **один раз**, споласкивая не более 10 секунд.

s) По окончании окрашивания провести докрасшивание ядер гематоксилином согласно инструкции производителя.

t) Провести обезвоживание 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.

u) ЗаклЮчить все препараты, используя покровное стекло и среду для заклЮчения.

v) Оценить результаты окрашивания.

! Важно: не допускать подсыхания срезов на всех этапах.

! Важно: ИГХ окрашивание допускается проводить при температуре в помещении от +18 до +24 °С.

24. Результаты

Интерпретация результатов окрашивания допускается только квалифицированными врачами-патологоанатомами, прошедшими обучение по PD-L1-тестированию.

Предварительно необходимо с использованием светового микроскопа при увеличении объектива 10х/ 20х оценить результат окрашивания контрольных образцов, и препараты серийных срезов образцов пациентов, окрашенные гематоксилин-эозином.

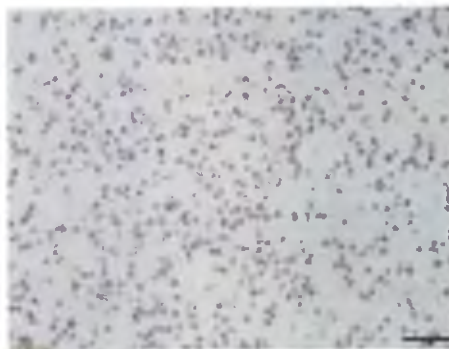
24.1 Оценка контролей

! Каждый из контролей необходимо использовать при каждом запуске стейнера независимо от количества клинических образцов пациентов!

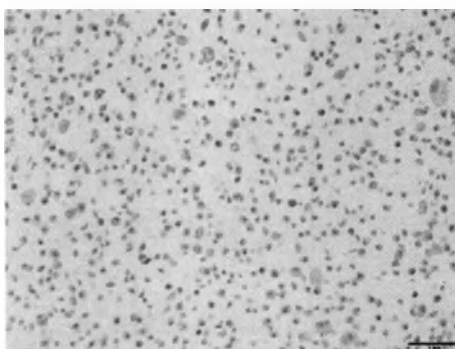
! Если какое-либо окрашивание контролей является неудовлетворительным, все результаты с образцами пациентов должны считаться недействительными!

24.1.1 Контрольное стекло PD-L1, окрашенное первичным антителом к PD-L1

Отсутствие мембранного окрашивания при просмотре всего образца на отрицательном клеточном контроле. Увеличение $\times 200$.

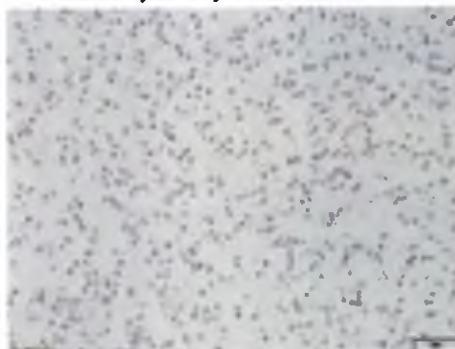


Более 80 % клеток имеют выраженное коричневое мембранное окрашивание на положительном клеточном контроле. Увеличение $\times 200$.



24.1.2 Контрольное стекло PDL1, окрашенное «Отрицательным контролем»

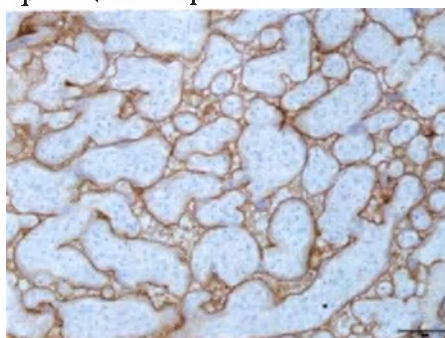
Неспецифическое окрашивание отсутствует. Увеличение $\times 200$.



Наличие положительной окраски свидетельствует о неспецифичности реакции.

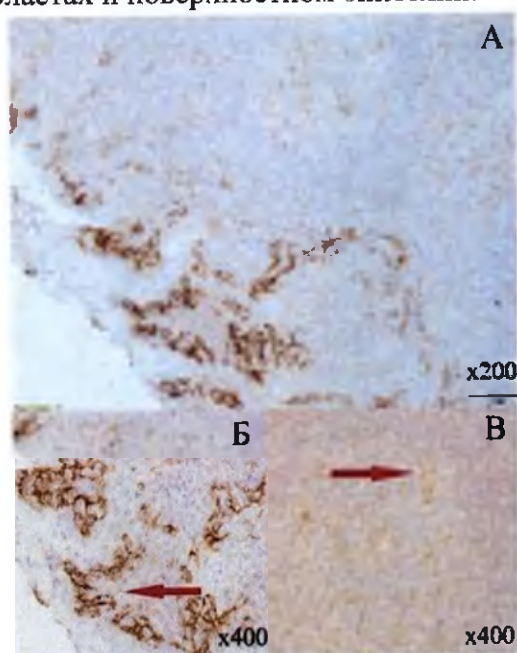
24.1.3 Контрольная ткань плаценты или миндалин

Для плаценты - умеренно-сильное мембранное, слабое цитоплазматическое окрашивание клеток трофобласта. Негативная реакция в стромальных клетках и сосудах.



Срез плаценты. Увеличение $\times 200$.

Для миндалины - сильно-позитивная реакция эпителия крипт, от слабой до умеренной позитивная реакция в макрофагах герминативных центров. Недопустимо наличие чрезмерного неспецифического фоновое окрашивания, скрывающего идентификацию PD-L1. Негативная реакция в эндотелии, фибробластах и поверхностном эпителии.



А. Срез миндалины. Увеличение x200.

Б. Яркое мембранное окрашивание клеток крипты (красная стрелка). Увеличение x400.

В. Мембранное окрашивание фолликулярных макрофагов герминативных центров (красная стрелка). Увеличение x400.

24.1.4 Опухолевая ткань пациентов, окрашенная гематоксилин-эозином

Определяется гистологический тип опухоли, качество исследуемого материала соответствует требуемому, достаточное количество опухолевых клеток (не менее 100 опухолевых клеток).

24.2 Оценка окрашивания клинических образцов

Окрашивание PD-L1 оценивается как в опухолевых, так и в иммунных клетках, непосредственно прилежащих к опухоли (в виде «щита»), либо инфильтрирующих ее.

Отличие опухолевых клеток от нормальных клеток анализируемой ткани и иммунных клеток достигается при помощи анализа морфологической картины на серийном срезе, окрашенном гематоксилином и эозином. Как было указано выше, для исследования на PD-L1, выбирается участок опухоли, содержащий достаточное количество опухолевых клеток (не менее 100 опухолевых клеток).

Иммунные клетки состоят из гранулоцитов (нейтрофилов и, в меньшей степени, эозинофилов), лимфоцитов, плазмочитов, макрофагов (гистиоцитов). Нейтрофилы и лимфоциты не представляют сложности в дифференциальной диагностике с опухолевыми клетками. Нейтрофилы, лимфоциты и плазмочиты могут быть легко идентифицированы даже на препарате, окрашенном иммуногистохимически на PD-L1 без оценки на серийном срезе, окрашенном гематоксилином и эозином. Внутриаальвеолярные макрофаги, которые могут формировать отдельные гнезда, в оценку не включаются.

24.2.1 Оценка позитивных опухолевых клеток

При 4-кратном увеличении объектива необходимо тщательно изучить опухолевые области

всего образца. Для интерпретации окрашивания PD-L1 следует оценить все хорошо сохранившиеся и хорошо окрашенные участки образца.

Окрашивание PD-L1 определяется как полное или частичное окрашивание плазматической мембраны любой интенсивности (от темно-бежевого до темно-коричневого).

Необходимо просмотреть весь образец. Все неразрушенные опухолевые клетки на всем PD-L1 окрашенном препарате должны быть оценены и включены в оценку экспрессии PD-L1. При подсчете позитивных опухолевых клеток необходимо исключить из обсчета иммунные клетки, нормальные клетки и некротические клетки. Для подтверждения типов клеток и оценки окрашивания слабой интенсивности необходимо использовать более высокие увеличения объектива (20х/40х).

После просмотра образца необходимо рассчитать процент окрашенных опухолевых клеток, как отношение количества окрашенных опухолевых клеток ко всем опухолевым клеткам, выраженное в процентах. Рекомендуется повторить процедуру подсчета минимум три раза.

24.2.2 Оценка позитивных иммунных клеток

При 10-кратном увеличении объектива необходимо тщательно изучить иммунные клетки, инфильтрирующие опухоль (клетки микроокружения опухоли). Для интерпретации окрашивания PD-L1 следует оценить все хорошо сохранившиеся и хорошо окрашенные лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки и гранулоциты, локализующиеся во внутриопухолевом и прилежащем околоопухолевом пространстве на увеличении объектива 20х/40х.

Окрашивание PD-L1 определяется как полное или частичное окрашивание плазматической мембраны и/ или цитоплазмы клетки любой интенсивности (от темно-бежевого до темно-коричневого).

После просмотра образца необходимо рассчитать процент окрашенных иммунных клеток, как отношение площади окрашенного иммунного инфильтрата к площади опухолевой ткани в срезе, выраженной в процентах. Рекомендуется повторить процедуру подсчета минимум три раза.

24.2.3 Подсчет комбинированного коэффициента позитивности CPS

Комбинированный коэффициент позитивности, CPS (combined positive score), рассчитывается как отношение количества PD-L1 окрашенных опухолевых и иммунных клеток (лимфоцитов и макрофагов) в штуках ко всем опухолевым клеткам, умноженное на 100, и выражается в относительных баллах¹⁵.

При этом для иммунных клеток окрашивание PD-L1 определяется как полное или частичное окрашивание плазматической мембраны и/ или цитоплазмы клетки любой интенсивности (от темно-бежевого до темно-коричневого), тогда как для опухолевых клеток считается только мембранное PD-L1 окрашивание любой интенсивности (от темно-бежевого до темно-коричневого).

25. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации

25.1 Условия и срок хранения

Набор в упаковке следует хранить на складе в холодильных камерах при температуре $+2...8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Не допускается замораживание набора. Сразу после использования необходимо вернуть в холодильник на $+2...8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Срок годности набора – 6 месяцев.

Растворы «Система детекции» и «ДАБ-1 (хромоген)» хранить защищенными от света.

25.2 Условия и срок транспортирования

Транспортировать изделие следует всеми видами транспорта при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в холодильных камерах или с хладагентами.

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

25.3 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 $+2...8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

25.4 Срок годности рабочих растворов компонентов

- Рабочий «Раствор Д» можно хранить при $+2...8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 7 суток;
- Рабочий «Раствор П» можно хранить при $+2...8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение двух недель;
- Приготовленный раствор хромогена хранению не подлежит! Необходимо готовить непосредственно перед проведением анализа.

26. Утилизация

26.1 При утилизации отходов, наборов с истекшим сроком годности или с нарушенным температурным режимом хранения и транспортирования необходимо руководствоваться требованиями СанПиН 2.1.7.2790 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

26.2 Компоненты набора «Раствор Д 20х», «Раствор Б», раствор «ДАБ-2 (субстрат)», контрольные стекла относятся к отходам класса «А» и утилизируются согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790.

26.3 Растворы «Первичные антитела», «Отрицательный контроль», «Раствор П 30х», содержащие азид натрия, а также раствор «Система детекции» относятся к отходам класса «Г» и утилизируются согласно требованиям СанПиН 2.1.7.2790. Сливать остатки растворов, содержащих азид натрия, только в специально предназначенную емкость, промаркированную «Отходы класса Г» в связи с токсичными и взрывоопасными свойствами реагента.

26.4 Раствор «ДАБ-1 (хромоген)» содержит 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид, который обладает канцерогенными свойствами. Данный компонент и его остатки должны сливаться в отдельную емкость, промаркированную «Отходы класса Г».

26.5 Последующее уничтожение «Отходов класса Г» осуществляется организациями, имеющими соответствующую лицензию, на специально оборудованных площадках, полигонах и в помещениях в соответствии с требованиями, предусмотренными существующими Федеральными законами, и с соблюдением обязательных требований по охране окружающей среды.

26.6 Наконечники могут быть обработаны дезинфицирующим средством. После дезинфекции

расходные материалы могут быть утилизированы как неопасный мусор.

27. Ограничения по применению

27.1 Набор реагентов должен применяться согласно инструкции по применению.

27.2 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

27.3 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

27.4 Наборы реагентов с нарушенным температурным режимом хранения и транспортирования применению не подлежат.

27.5 Не использовать совместно реактивы разных партий набора.

27.6 Растворы «Система детекции» и «ДАБ-1 (хромоген)» хранить без доступа света.

28. Информация по ремонту и техническому обслуживанию

Набор реагентов обслуживанию и ремонту не подлежит.

29. Информация о производителе

По вопросам качества Набора реагентов для выявления PD-L1- экспрессирующих клеток иммуногистохимическим методом «PD-L1-CAD-тест» по ТУ 21.20.23-003-45739777-2017, следует обращаться в Закрытое акционерное общество «БИОКАД» (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

30. Используемые символы и сокращенные названия

Символ/ сокращение	Расшифровка
	Предостережение!! Ознакомиться с сопроводительной документацией!
	Медицинское изделие для in vitro диагностики
	Ознакомление с инструкцией по применению
	Беречь от солнечных лучей
	Биологический риск
ИГХ	Иммуногистохимия
НМРЛ	Немелкоклеточный рак легкого
CPS	(combined positive score) комбинированный коэффициент позитивности

31. Перечень применяемых производителем медицинского изделия для диагностики in vitro национальных стандартов

Набор реагентов для выявления PD-L1- экспрессирующих клеток иммуногистохимическим методом «PD-L1-CAD-тест» по ТУ 21.20.23-003-45739777-2017, соответствует национальным стандартам РФ на продукцию:

ГОСТ Р 15.013-2016 Система разработки и постановки продукции на производство.

Медицинские изделия;

ГОСТ 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики *ин витро*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации;

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *ин витро*. Методы испытаний;

ГОСТ Р ЕН 13612-2010 Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики *in vitro*;

ГОСТ Р ЕН 23640-2015 Исследование стабильности реагентов для диагностики *in vitro*.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования.

ГОСТ ISO 14971 «Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям».

32. Список литературы

Научные статьи:

1. Боголюбова А.В. [и др.]. ИММУНОТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ, ОСНОВАННАЯ НА БЛОКИРОВКЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ КОНТРОЛЬНЫХ «ТОЧЕК» («ЧЕКПОЙНТОВ») // Медицинская иммунология. 2015. № 5 (17). С. 395–406.
2. Румянцев А.А., Тюлядин С.А. EFFICACY OF IMMUNE CHECKPOINTS INHIBITORS IN THE TREATMENT OF SOLID TUMORS 2016.
3. Ishida M. [и др.]. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues // Immunology Letters. 2002. № 1 (84). С. 57–62.
4. Liang S.C. [и др.]. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses // European Journal of Immunology. 2003. № 10 (33). С. 2706–2716.
5. Maine C.J. [и др.]. Programmed death ligand-1 over-expression correlates with malignancy and contributes to immune regulation in ovarian cancer // Cancer immunology, immunotherapy: CII. 2014. № 3 (63). С. 215–224.
6. Mao Y. [и др.]. B7-H1 and B7-H3 are independent predictors of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer // Oncotarget. 2015. № 5 (6). С. 3452–3461.
7. Ohigashi Y. [и др.]. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer // Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research. 2005. № 8 (11). С. 2947–2953.
8. Salama A.D. [и др.]. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis // The Journal of Experimental Medicine. 2003. № 1 (198). С. 71–78.
9. Thompson R.H., Kwon E.D. Significance of B7-H1 overexpression in kidney cancer // Clinical Genitourinary Cancer. 2006. № 3 (5). С. 206–211.
10. Wiendl H. [и др.]. Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies // FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2003. № 13 (17). С. 1892–1894.
11. Miller A.J., Mihm M.C.J. Melanoma // New England Journal of Medicine. 2006. № 1 (355). С. 51–
12. Abbas M. Intratumoral expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) in patients with clear cell renal cell carcinoma. 2016

13. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. // International Immunology. 2007 (19); 7:813.
 14. Brown JA, Dorfman DM, Ma F-R, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, et al. Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. // J Immunology. 2003;170:1257.
 15. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Interpretation Manual – Gastric or Gastroesophageal Junction (GEJ) Adenocarcinoma, Carpinteria, CA: Dako, Agilent Pathology Solutions; 2017
- PD-L1 IHC 22C3 pharmDx manual. Carpinteria, CA: Dako, Agilent Pathology Solutions; 2017

Приложение 1. Расход компонентов набора при дробных постановках на иммуностейнерах открытого типа Thermo LabVision 360

Компонент в наборе	Кол-во, мл/ шт	Расход на стейнере Thermo* на 1 стекло, мл	1 пациент +1 контр. «+» +1 контр. "-" +1 ТК = 4 стекла	3 пациента +1 контр. «+» +1 контр. "-" +1 ТК = 6 стекол	5 пациентов +1 контр. «+» +1 контр. "-" +1 ТК = 8 стекол	10 пациентов +1 контр. «+» +1 контр. "-" +1 ТК = 13 стекол	33 пациента +1 контр. «+» +1 контр. "-" +1 ТК = 36 стекол
«Первичные антитела»	15	0,303	0,909	1,515	2,121	3,636	10,61
«Система детекции»	15	0,33	1,32	1,98	2,64	4,29	11,88
«Раствор Б»	15	0,33	1,32	1,98	2,64	4,29	11,88
«Раствор П 30х»	300	43,3	50,0	56,7	60,0	73,3	134
Рабочий раствор П	9000	1400+100= 1500	1500	1700	1800	2200	4000
«Раствор Д 20х»**	300	1500 мл 1х Раствора Д на 1 запуск РТ-модуля					
Рабочий раствор Д	6000						
«ДАБ-1 (хромоген)»	1	0,01	0,04	0,06	0,08	0,13	0,35
«ДАБ-2 (субстрат)»	15	0,33	1,32	1,98	2,64	4,29	11,9
«Отрицательный контроль»	5	0,303	0,303	0,303	0,303	0,303	1,515
Контрольные стекла PD-L1	20	-	2	2	2	2	2
повторов постановок на стейнере/ макс.число образцов пациентов	.	-	4 повтора 4 пациента	4 повтора 12 пациентов	4 повтора 20 пациентов	3 повтора 30 пациентов	Полная загрузка стейнера, 1 повтор 33 пациента

*Приведен пример расчета расхода компонентов для иммуностейнера открытого типа Thermo LabVision 360

**демаскировка проводится в РТ-модуле или водяной бане, расход буфера зависит от применяемого оборудования. Указан расход на РТ-модуль

1 контр. «+» - постановка 1 контрольного стекла с раствором «Первичные антитела»

1 контр. «-» - постановка 1 контрольного стекла с раствором «Отрицательный контроль»

1 ТК – постановка 1 тканевого (внутрилабораторного) контроля отдельным стеклом.

Количество пациентов = количество стекол с биообразцами пациентов.

Приложение 2. Расход компонентов набора при дробных постановках на иммуностейнерах открытого типа *Dako Link 48*

Компонент в наборе	Кол-во, мл/ шт	Расход на стейнере Dako* на 1 стекло, мл	1 пациент +1 контр. «+» +1 контр. "-" +1 ТК = 4 стекла	3 пациента +1 контр. «+» +1 контр. "-" +1 ТК = 6 стекол	5 пациентов +1 контр. «+» +1 контр. "-" +1 ТК = 8 стекол	10 пациентов +1 контр. «+» +1 контр. "-" +1 ТК = 13 стекол	45 пациентов +1 контр. «+» +1 контр. "-" +1 ТК = 48 стекол
«Первичные антитела»	15	0,30	0,90	1,5	2,1	3,6	14,1
«Система детекции»	15	0,30	1,2	1,8	2,4	3,6	14,4
«Раствор Б»	15	0,30	1,2	1,8	2,4	3,6	14,4
«Раствор П 30х»	300	43,3	50,0	56,7	60,0	73,3	134
Рабочий раствор П	9000	2500+125= 2625	3000	3250	3500	4125	8500
«Раствор Д 20х»	300	1500 мл 1х Раствора Д на 1 запуск РТ-модуля					
Рабочий раствор Д	6000						
«ЛАБ-1 (хромоген)»	1	0,01	0,04	0,06	0,08	0,13	0,48
«ЛАБ-2 (субстрат)»	15	0,33	1,32	1,98	2,64	4,29	15,84
«Отрицательный контроль»	5	0,30	0,30	0,3	0,3	0,3	0,3
Контрольные стекла PD-L1	20	-	2	2	2	2	2
повторов постановок на стейнере/ макс. число образцов пациентов	-	-	3 повтора 3 пациента	2 повтора 6 пациентов	2 повтора 10 пациентов	2 повтора 20 пациентов	Полная загрузка 1 повтор 45 пациентов

Приведен пример расчета расхода компонентов для иммуностейнера открытого типа *Dako Link 48

****демаскировка проводится в РТ-модуле или водяной бане, расход буфера зависит от применяемого оборудования**

1 контр. «+» - постановка 1 контрольного стекла с раствором «Первичные антитела»

1 контр. «-» - постановка 1 контрольного стекла с раствором «Отрицательный контроль»

1 ТК – постановка 1 тканевого (внутрилабораторного) контроля отдельным стеклом.

Количество пациентов = количество стекол с биообразцами пациентов.

Приложение 3. Краткая маршрутная карта постановки набора «PDL1-CAD-тест» на иммуностейнерах открытого типа

Подготовка к проведению ИГХ окрашивания	
1. Депарафинизация и регидратация	Ксилол - 2 раза/3 минуты 96% этанол или изопропанол - 4 раза/3 минуты
2. Промывка деионизованной/ дистиллированной водой	1 раз/2 минуты
3. Приготовление раствора «Д»	П.21.2 инструкции
4. Демаскировка антигена раствором «Д» (РТ-модуль или водяная баня)	pH=6,0, преднагрев 85 °С демаскировка 97 °С/30 минут охлаждение 65 °С
5. Промывка дистиллированной/деионизованной водой перед проведением ИГХ окрашивания	1 раз/3-5 минут
6. Проведение ИГХ окрашивания на иммуностейнере открытого типа	
6.1. Программирование стейнера	П. инструкции 23.4.1 а)
6.2. Приготовление рабочих растворов и загрузка в стейнер	П.21.1-21.3 инструкции
6.3. Загрузка стекол с исследуемыми образцами и контролями	П.23.4.1 б) инструкции
6.4. Внесение информации об образцах и зонах нанесения реагентов	П.23.4.1 d) инструкции
6.5. Промывка с раствором П (промывочный буфер)	1 раз
6.6 Инкубация с раствором Б (перекись)	5 минут
6.7 Промывка деионизованной/ дистиллированной водой	1 раз
6.8. Промывка с раствором П (промывочный буфер)	1 раз
6.9. Инкубация с первичным антителом /Отрицательным контролем	20 минут
6.10 Промывка с раствором П (промывочный буфер)	2 раза
6.11. Инкубация с Системой детекции	30 минут
6.12. Промывка с раствором П (промывочный буфер)	2 раза
6.13. Приготовление раствора ДАБ субстрат-хромоген непосредственно перед нанесением, загрузка в стейнер	П.21.4. инструкции
6.14. Инкубация с ДАБ	5 минут
7. Промывка деионизованной/ дистиллированной водой	1 раз/ не более 10 секунд
8. Подкрашивание гематоксилином	по инструкции производителя

! ИГХ окрашивание допускается проводить при температуре в помещении от +18 до +24 °С.

! Не допускать подсыхания срезов на всех этапах.

Приложение 4. Краткая маршрутная карта ручной постановки набора «PDL1-CAD-тест»

Подготовка к проведению ИГХ окрашивания	
1.Депарафинизация и регидратация	Ксилол - 2 раза/ 3 минуты 96 % этанол или изопропанол - 4 раза/3 минуты
2.Промывка деионизованной/ дистиллированной водой	1 раз/ 2 минуты
3.Приготовление раствора «Д»	П.21.2 инструкции
4.Демаскировка антигена раствором «Д» (РТ-модуль или водяная баня)	pH=6,0, преднагрев 85 °С демаскировка 97 °С/ 30 минут охлаждение 65 °С
5.Промывка деионизованной/ дистиллированной водой перед проведением ИГХ окрашивания	1 раз/3-5 минут
6. Проведение ИГХ окрашивания	
6.1. Приготовление рабочих растворов	П.21.1-21.3 инструкции
6.2. Обведение гидрофобным карандашом участка/зоны нанесения реагентов на охлажденных стеклах с образцами и контролями	П.21.4.2 с) инструкции
6.3. Инкубация с раствором Б (перекись)	5 минут/ +18 до 24 °С/ влажная камера
6.4. Промывка деионизованной/ дистиллированной водой	1 раз / не более 10 секунд
6.5. Промывка с раствором П (промывочный буфер)	1 раз/ не более 10 секунд
6.6. Инкубация с первичным антителом /Отрицательным контролем	20 минут/ +18 до 24 °С/ влажная камера
6.7. Промывка с раствором П (промывочный буфер)	2 раза/ не более 10 секунд
6.8. Инкубация с Системой детекции	30 минут/ +18 до 24 °С/ влажная камера
6.9. Промывка с раствором П (промывочный буфер)	2 раза/ не более 10 секунд
6.10. Приготовление раствора ДАБ субстрат-хромоген непосредственно перед нанесением	П.21.4. инструкции
6.11. Инкубация с ДАБ	5 минут/+18 до 24 °С/влажная камера
7.Промывка деионизованной/ дистиллированной водой	1 раз/ не более 10 секунд
8. Подкрашивание гематоксилином	по инструкции производителя

! ИГХ окрашивание допускается проводить при температуре в помещении от +18 до +24 °С.

! Не допускать подсыхания срезов на всех этапах.

Приложение 5. Краткая маршрутная карта анализа результатов PD-L1 окрашивания при постановке набора «PDL1-CAD-тест»

Анализ результатов PD-L1 окрашивания		
1. Анализ окрашивание контролей	П. 24.1 инструкции	
Стекло с контрольными клеточными линиями PD-L1 «+» и PD-L1 «-», окрашенное раствором «Первичные антитела»	PD-L1 «-» Отсутствие мембранного окрашивания при просмотре всего образца на отрицательном клеточном контроле	PD-L1 «+» Более 80 % клеток имеют выраженное коричневое мембранное окрашивание на положительном клеточном контроле.
Стекло с отрицательным контролем нанесения реагентов	Неспецифическое окрашивание отсутствует	
Стекло с внутрилабораторным тканевым контролем, тканью миндалина/плаценты, окрашенное раствором «Первичные антитела»	Для плаценты - умеренно-сильное мембранное, слабое цитоплазматическое окрашивание клеток трофобласта. Негативная реакция в стромальных клетках и сосудах	Для миндалина - сильно-позитивная реакция эпителия крипт, от слабой до умеренной позитивная реакция в макрофагах герминативных центров. Негативная реакция в эндотелии, фибробластах и поверхностном эпителии.
2. Анализ и интерпретация результатов исследуемых образцов	П. 21.1 инструкции	
Опухолевые клетки	Подсчет ТС, %: отношение количества окрашенных опухолевых клеток ко всем опухолевым клеткам, выраженное в процентах	ТС: полное или частичное окрашивание плазматической мембраны любой интенсивности (от темно-бежевого до темно-коричневого).
Иммунные клетки	Подсчет IC, %: отношение площади окрашенного иммунного инфильтрата к площади опухолевой ткани в срезе, выраженной в процентах.	IC: полное или частичное окрашивание плазматической мембраны и/или цитоплазмы клетки любой интенсивности (от темно-бежевого до темно-коричневого).
Комбинированный коэффициент позитивности (CPS -combined positive score)	Подсчет CPS, баллы: отношение количества PD-L1 окрашенных опухолевых и иммунных клеток (лимфоцитов и макрофагов) в штуках ко всем опухолевым клеткам, умноженное на 100, и выраженное в относительных баллах	IC: полное или частичное окрашивание плазматической мембраны и/или цитоплазмы клетки любой интенсивности (от темно-бежевого до темно-коричневого), ТС: только мембранное PD-L1 окрашивание любой интенсивности (от темно-бежевого до темно-коричневого).

Руководитель группы
производства и регистрации МИ
Вертягина Н.В.



Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью
34 (сорок четыре) листа
ЗАО «БИОКАД»
Репкина Н.В.



Производитель: ЗАО «БИОКАД», Россия, 198515, г. Санкт-Петербург,
Петродворцовый район, п. Стрельна, ул. Связи, д. 34, Лит. А.
www.biocad.ru Тел: +7 (812) 380-49-33, факс: +7 (812) 380-49-34 biocad@biocad.ru

Паспорт качества № 005
Набор реагентов для выявления PD-L1- экспрессирующих клеток
иммуногистохимическим методом «PD-L1-CAD-тест»
по ТУ 21.20.23-003-45739777-2017

Серия № 005

Наборов в серии 10 наборов

Дата изготовления 06.04.2018

№ п/п	Название	Серия	Количество в упаковке
1	Раствор «Первичные антитела»	004	Один флакон, 15 мл
2	Раствор «Система детекции»	004	Один флакон, 15 мл
3	Раствор «ДАБ-1 (хромоген)»	004	Один флакон, 1 мл
4	Раствор «ДАБ-2 (субстрат)»	004	Один флакон, 15 мл
5	Буфер для демаскировки «Раствор Д 20х»	004	Три флакона, по 100 мл
6	Промывочный раствор «Раствор П 30х»	004	Три флакона, по 100 мл
7	Раствор «Отрицательный контроль»	004	Один флакон, 10 мл
8	Раствор для блокировки «Раствор Б»	004	Один флакон, 15 мл
9	Контрольные стекла PD-L1	K-135-INC-003	4 контейнера со стеклами по 5 шт.

Результаты контроля

Пункт ТУ	Наименование параметра	Норма по ТУ	Значение параметра
1.4	Комплектность, состав	Комплект включает набор реагентов, инструкцию по применению и паспорт качества. Состав: «Первичные антитела» (1 фл., 15 мл); «Система детекции» (1 фл., 15 мл); «ДАБ-1 (хромоген)» (1 фл., 1 мл); «ДАБ-2 (субстрат)» (1 фл., 15 мл); «Раствор Б» (1 фл., 15 мл); «Отрицательный контроль» (1 фл., 5 мл); «Раствор П 30х» (3 фл. по 100 мл); «Раствор Д 20х» (3 фл. по 100 мл); контрольные стекла PD-L1 (4 контейнера по 5 штук)	Соответствует Комплект включает набор реагентов, инструкцию по применению и паспорт качества. Состав: «Первичные антитела» (1 фл., 15 мл); «Система детекции» (1 фл., 15 мл); «ДАБ-1 (хромоген)» (1 фл., 1 мл); «ДАБ-2 (субстрат)» (1 фл., 15 мл); «Раствор Б» (1 фл., 15 мл); «Отрицательный контроль» (1 фл., 5 мл); «Раствор П 30х» (3 фл. по 100 мл); «Раствор Д 20х» (3 фл. по 100 мл); контрольные стекла PD-L1 (4 контейнера по 5 штук)
1.5, 1.6	Упаковка, маркировка	полиэтиленовый флакон-капельница светонепроницаемый 15 мл с завинчивающейся светонепроницаемой крышкой; полиэтиленовый флакон-капельница светонепроницаемый 5 мл с завинчивающейся светонепроницаемой крышкой; полиэтиленовый флакон-капельница 15 мл с навинчивающейся крышкой красного, желтого или зеленого цвета; полипропиленовые флаконы 100 мл с завинчивающимися крышками белого цвета; полиэтиленовый флакон-капельница 5 мл с навинчивающейся крышкой красного цвета; транспортные контейнеры из полипропилена с крыш-	Соответствует полиэтиленовый флакон-капельница светонепроницаемый 15 мл с завинчивающейся светонепроницаемой крышкой; полиэтиленовый флакон-капельница светонепроницаемый 5 мл с завинчивающейся светонепроницаемой крышкой; полиэтиленовый флакон-капельница 15 мл с навинчивающейся крышкой красного, желтого или зеленого цвета; полипропиленовые флаконы 100 мл с завинчивающимися крышками белого цвета; полиэтиленовый флакон-капельница 5 мл с навинчивающейся крышкой красного цвета; транспортные контей-

		ками по типу «стопка». Этикетки из бумаги этикеточной.	неры из полипропилена с крыш-ками по типу «стопка». Этикетки из бумаги этикеточной.
1.3.1, табл.1	«Первичные антитела»	Прозрачная жидкость без цвета, без осадка, без запаха.	Соответствует Прозрачная жидкость без цвета, без осадка, без запаха.
	«Система детекции»	Прозрачная жидкость розового цвета без осадка, без запаха	Соответствует Прозрачная жидкость розового цвета без осадка, без запаха
	«ДАБ-1 (хромоген)»	Непрозрачная жидкость коричневого цвета без осадка, без запаха	Соответствует Непрозрачная жидкость коричневого цвета без осадка, без запаха
	«ДАБ-2 (субстрат)»	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка, без запаха	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость без осадка, без запаха
	«Раствор Д 20х»	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка, без запаха	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость без осадка, без запаха
	«Раствор П 30х»	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка, без запаха	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость без осадка, без запаха
	«Отрицательный контроль»	Прозрачная жидкость без цвета, без осадка, без запаха	Соответствует Прозрачная жидкость без цвета, без осадка, без запаха
	«Раствор Б»	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка, без запаха	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость без осадка, без запаха
	Контрольные стекла PD-L1	Предметное стекло с визуально отличимыми нанесенными двумя ровными срезами клеточных линий без дополнительных пятен неизвестной природы	Соответствует Предметное стекло со срезом двух контрольных образцов.
1.3.2	Положительный результат ИГХ, контрольные стекла PD-L1, клеточная линия «+»	Более 80 % клеток имеют выраженное коричневое мембранное окрашивание при просмотре всего образца.	Соответствует Более 80 % клеток имеют выраженное коричневое мембранное окрашивание при просмотре всего образца.
1.3.2	Отрицательный результат ИГХ, контрольные стекла PD-L1, клеточная линия «-»	Отсутствие цитоплазматического и/или мембранного окрашивания при просмотре всего образца	Соответствует Отсутствие цитоплазматического и/или мембранного окрашивания при просмотре всего образца
1.3.2	Оценка неспецифического окрашивания реагентами, контрольные стекла PD-L1, клеточная линия «+», клеточная линия «-»	Неспецифическое окрашивание отсутствует.	Соответствует Неспецифическое окрашивание отсутствует.

Паспорт выдан 11.04.2018

Срок годности набора до 06.10.2018

Условия хранения +2...+8 °C

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

Только для in vitro диагностики

По ТУ 21.20.23-003-45739773-2017

ОКК ОКК - Ожидание

РУ _____



Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

21. два

ЛИСТ а

Руководитель ГПР ЗАО «БИОКАД»

Вертягина Н.В.



[Handwritten signature]

Производитель: ЗАО «БИОКАД», Россия, 198515, г. Санкт-Петербург,
Петродворцовый район, п. Стрельна, ул. Связи, д. 34, Лит. А.
www.biocad.ru Тел: +7 (812) 380-49-33, факс: +7 (812) 380-49-34 biocad@biocad.ru

Паспорт качества № 004
Набор реагентов для выявления PD-L1- экспрессирующих клеток
иммуногистохимическим методом «PD-L1-CAD-тест»
по ТУ 21.20.23-003-45739777-2017

Серия № 004 Наборов в серии 10 наборов Дата изготовления 06.04.2018

№ п/п	Название	Серия	Количество в упаковке
1	Раствор «Первичные антитела»	003	Один флакон, 15 мл
2	Раствор «Система детекции»	004	Один флакон, 15 мл
3	Раствор «ДАБ-1 (хромоген)»	004	Один флакон, 1 мл
4	Раствор «ДАБ-2 (субстрат)»	004	Один флакон, 15 мл
5	Буфер для демаскировки «Раствор Д 20Х»	003	Три флакона, по 100 мл
6	Промывочный раствор «Раствор П 30Х»	003	Три флакона, по 100 мл
7	Раствор «Отрицательный контроль»	001	Один флакон, 10 мл
8	Раствор для блокировки «Раствор Б»	003	Один флакон, 15 мл
9	Контрольные стекла PD-L1	K-135-INC-003	4 контейнера со стеклами по 5 шт.

Результаты контроля

Пункт ТУ	Наименование параметра	Норма по ТУ	Значение параметра
1.4	Комплектность, состав	Комплект включает набор реагентов, инструкцию по применению и паспорт качества. Состав: «Первичные антитела» (1 фл., 15 мл); «Система детекции» (1 фл., 15 мл); «ДАБ-1 (хромоген)» (1 фл., 1 мл); «ДАБ-2 (субстрат)» (1 фл., 15 мл); «Раствор Б» (1 фл., 15 мл); «Отрицательный контроль» (1 фл., 5 мл); «Раствор П 30х» (3 фл. по 100 мл); «Раствор Д 20х» (3 фл. по 100 мл); контрольные стекла PD-L1 (4 контейнера по 5 штук)	Соответствует Комплект включает набор реагентов, инструкцию по применению и паспорт качества. Состав: «Первичные антитела» (1 фл., 15 мл); «Система детекции» (1 фл., 15 мл); «ДАБ-1 (хромоген)» (1 фл., 1 мл); «ДАБ-2 (субстрат)» (1 фл., 15 мл); «Раствор Б» (1 фл., 15 мл); «Отрицательный контроль» (1 фл., 5 мл); «Раствор П 30х» (3 фл. по 100 мл); «Раствор Д 20х» (3 фл. по 100 мл); контрольные стекла PD-L1 (4 контейнера по 5 штук)
1.5, 1.6	Упаковка, маркировка	полиэтиленовый флакон-капельница светонепроницаемый 15 мл с завинчивающейся светонепроницаемой крышкой; полиэтиленовый флакон-капельница светонепроницаемый 5 мл с завинчивающейся светонепроницаемой крышкой; полиэтиленовый флакон-капельница 15 мл с навинчивающейся крышкой красного, желтого или зеленого цвета; полипропиленовые флаконы 100 мл с завинчивающимися крышками белого цвета; полиэтиленовый флакон-капельница 5 мл с навинчивающейся крышкой красного цвета; транспортные контейнеры из полипро-	Соответствует полиэтиленовый флакон-капельница светонепроницаемый 15 мл с завинчивающейся светонепроницаемой крышкой; полиэтиленовый флакон-капельница светонепроницаемый 5 мл с завинчивающейся светонепроницаемой крышкой; полиэтиленовый флакон-капельница 15 мл с навинчивающейся крышкой красного, желтого или зеленого цвета; полипропиленовые флаконы 100 мл с завинчивающимися крышками белого цвета; полиэтиленовый флакон-капельница 5 мл с навинчивающейся крышкой красного цвета; транспортные контейнеры из полипро-

		пилена с крышками по типу «стопка». Экетки из бумаги этикеточной.	пилена с крышками по типу «стопка». Экетки из бумаги этикеточной.
1.3.1, табл.1	«Первичные антитела»	Прозрачная жидкость без цвета, без осадка, без запаха.	Соответствует Прозрачная жидкость без цвета, без осадка, без запаха.
	«Система детекции»	Прозрачная жидкость розового цвета без осадка, без запаха	Соответствует Прозрачная жидкость розового цвета без осадка, без запаха
	«ДАБ-1 (хромоген)»	Непрозрачная жидкость коричневого цвета без осадка, без запаха	Соответствует Непрозрачная жидкость коричневого цвета без осадка, без запаха
	«ДАБ-2 (субстрат)»	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка, без запаха	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость без осадка, без запаха
	«Раствор Д 20х»	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка, без запаха	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость без осадка, без запаха
	«Раствор П 30х»	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка, без запаха	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость без осадка, без запаха
	«Отрицательный контроль»	Прозрачная жидкость без цвета, без осадка, без запаха	Соответствует Прозрачная жидкость без цвета, без осадка, без запаха
	«Раствор Б»	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка, без запаха	Соответствует Прозрачная бесцветная жидкость без осадка, без запаха
	Контрольные стекла PD-L1	Предметное стекло с визуально отличимыми нанесенными двумя ровными срезами клеточных линий без дополнительных пятен неизвестной природы	Соответствует Предметное стекло со срезом двух контрольных образцов.
1.3.2	Положительный результат ИГХ, контрольные стекла PD-L1, клеточная линия «+»	Более 80 % клеток имеют выраженное коричневое мембранное окрашивание при просмотре всего образца.	Соответствует Более 80 % клеток имеют выраженное коричневое мембранное окрашивание при просмотре всего образца.
1.3.2	Отрицательный результат ИГХ, контрольные стекла PD-L1, клеточная линия «-»	Отсутствие цитоплазматического и/или мембранного окрашивания при просмотре всего образца	Соответствует Отсутствие цитоплазматического и/или мембранного окрашивания при просмотре всего образца
1.3.2	Оценка неспецифического окрашивания реагентами, контрольные стекла PD-L1, клеточная линия «+», клеточная линия «-»	Неспецифическое окрашивание отсутствует.	Соответствует Неспецифическое окрашивание отсутствует.

Паспорт выдан 11.04.2018

Срок годности набора до 06.10.2018

Условия хранения +2...8 °C

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

Только для in vitro диагностики

По ТУ 21.20.23-003-45739777-2017

ОКК И.И. Казаков

РУ _____



Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

2 (две) лист

Руководитель ГПР ЗАО «БИОКАД»

Вертягина Н.В. _____



Производитель: ЗАО «БИОКАД», Россия, 198515, г. Санкт-Петербург,
Петродворцовый район, п. Стрельна, ул. Связи, д. 34, Лит. А., www.biocad.ru
Тел: +7 (812) 380-49-33, факс: +7 (812) 380-49-34 biocad@biocad.ru

Паспорт № К-135-ИНС-003
Контрольные стекла PD-L1

Серия № К-135-ИНС-003

Количество 200 стекол

Контрольное стекло представляет собой предметное стекло с фиксированными в формалине и залитыми в парафин культивируемыми клеточными линиями рака молочной железы человека (линия MCF7) и рака легкого (NCI-H226) с известным, подтвержденным уровнем экспрессии белка PD-L1, нанесенных на высокоадгезивное предметное стекло.

ОПИСАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

№ п/п	Клеточная линия	Описание	Экспрессия PD-L1
1.	Клеточная линия «-»	Культура клеток MCF-7 Источник: аденокарцинома человека Банк: ИНИЦ РАН	отсутствует
2.	Клеточная линия «+»	Культура клеток NCI-H226 Источник: плоскоклеточная карцинома человека Банк: АТСС	высокая

Контрольные стекла используются с Набором реагентов для выявления PD-L1- экспрессирующих клеток иммуногистохимическим методом «PD-L1-CAD-тест» для визуального контроля проведения иммуногистохимического исследования; при контроле качества набора реагентов для оценки характеристик по ТУ 21.20.23-003-45739777-2017.

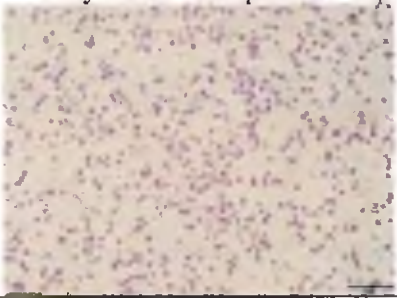
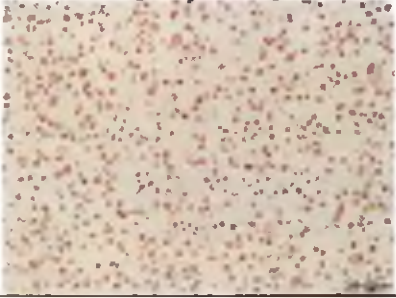
МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ:

С серии контрольных стекол отбирают не менее 6 контрольных стекол и передают в контролируемую лабораторию для подтверждения уровня экспрессии PD-L1 методом иммуногистохимии на открытом иммуноштейнере.

Определение рецепторного статуса методом иммуногистохимии на открытом иммуноштейнере:

Иммуногистохимическое окрашивание проводится с использованием первичного АТ к PD-L1, клон 22C3 (Agilent Technologies, Dako) на иммуноштейнере открытого типа LabVision 360 (Thermo) в соответствии с валидированной методикой проведения контроля качества контрольных материалов.

Интерпретацию результатов проводят визуально с использованием светового микроскопа на увеличении 10х/20х, оценивая процент и интенсивность окрашенных клеток:

№ п/п	Экспрессия PD-L1	Окрашивание
1.	Отсутствует	Отсутствие мембранного окрашивания 
2.	Высокая	Более 80 % клеток имеют выраженное коричневое мембранное окрашивание при просмотре всего образца. 

РЕЗУЛЬТАТЫ КОНТРОЛЯ:

№ п/п	Клеточные линии	Образцы	Метод ИГХ, окрашивание на открытом стейнере	Результат
1	Клеточная линия «-»	Образец 1	Нет окрашивания	соотв
		Образец 2	Нет окрашивания	соотв
		Образец 3	Нет окрашивания	соотв
		Образец 4	Нет окрашивания	соотв
		Образец 5	Нет окрашивания	соотв
		Образец 6	Нет окрашивания	соотв
2	Клеточная линия «+»	Образец 1	Более 80 % клеток имеют выраженное коричневое мембранное окрашивание при просмотре всего образца.	соотв
		Образец 2	Более 80 % клеток имеют выраженное коричневое мембранное окрашивание при просмотре всего образца	соотв
		Образец 3	Более 80 % клеток имеют выраженное коричневое мембранное окрашивание при просмотре всего образца	соотв.
		Образец 4	Более 80 % клеток имеют выраженное коричневое мембранное окрашивание при просмотре всего образца.	соотв
		Образец 5	Более 80 % клеток имеют выраженное коричневое мембранное окрашивание при просмотре всего образца	соотв
		Образец 6	Более 80 % клеток имеют выраженное коричневое мембранное окрашивание при просмотре всего образца	соотв.

Паспорт выдан 23.03.2018
Условия хранения +2...8 °С
Только для in vitro диагностики

Срок годности стекол до 21.03.2020
Условия транспортирования +2...8 °С

ОКК 



Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

2 (два)) лист а

Руководитель ГПР ЗАО «БИОКАД»

Вертягина Н.В. Вертягина Н.В.

