СОГЛАСОВАНО
Заместитель Министра
здравоохранения
Республики Беларусь

_____ Б.Н. Андросюк
«30» 11 2021 г.

УТВЕРЖДАЮ
Управляющий
ОДО «КомПродСервис»

_____ Д.Ч. Кучинский
«17» 06 2021 г.

Набор реагентов для определения онкомаркеров Apo 10 и TKTL 1 в крови человека «Pan Tum Detect», производства ОДО «КомПродСервис»
инструкция по применению

СОГЛАСОВАНО
Заместитель директора
УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»

_____ М.Г. Злотникова
«29» 11 2021 г.

СОГЛАСОВАНО
Директор РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова

_____ С.Л. Поляков
«__» _____ 2021 г.

СОГЛАСОВАНО
Директор ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

_____ Ф.Н. Карпенко
«02» 12 2021 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач УЗ «Витебский областной клинический онкологический диспансер»

_____ А.В. Томчина
«__» _____ 2021 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор «Pan Tum Detect» предназначен для определения содержания онкомаркеров Apo 10 и TKTL 1 в макрофагах крови человека, методом проточной цитометрии, при проведении диагностических и скрининговых исследований. Материалом для проведения исследований служит венозная кровь человека.

Набор рассчитан на проведение 100 определений.

2. СОСТАВ

Набор «PanTum Detect» выпускается в двух комплектациях.

В комплект 1 набора входит:

Компонент	Количество/Объем
Моноклональные антитела к клеточной поверхности (в растворе содержащем 1% BSA и 0,1% NaN_3):	
CD14-PerCP	1 мл
CD16-APC	1 мл
Моноклональные антитела к опухолевым антигенам Apo10 и TKTL1 (в растворе содержащем 1% BSA и 0,1% NaN_3):	
Apo10-FITC	1 мл
TKTL1-PE	1 мл
Реагенты и растворы:	
Реагент для фиксации (Раствор 1)	11 мл
Реагент для пермеабилизации и лизиса клеток (раствор 2)	11 мл
Инструкция	1 шт
Паспорт	1 шт
Примечание. В комплект 2 набора дополнительно входит раствор для пробоподготовки, 20-й концентрат	50 мл

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Только для диагностики in vitro.

Необходимо соблюдать рекомендации по работе в медицинской лаборатории. Работа проводится только в одноразовых перчатках, с использованием одноразовых наконечников для автоматических пипеток. Обеззараживание и утилизация отходов, образовавшихся в ходе работы с набором, осуществляется в соответствии с Санитарными правилами и нормами 2.1.7.14-20-2005 «Правила обращения с медицинскими отходами». Поверхности столов, а также другие поверхности на которых, проводятся работы с клиническим материалом, должны обязательно до начала и после окончания работ подвергаться обработке средствами дезинфекции в соответствии с законодательством Республики Беларусь и с учетом рекомендаций производителей. Все реагенты и материалы, которые контактировали с потенциально инфекционными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при температуре 121°С в течение не менее часа.

Образцы или реагенты не следует пипетировать ртом. Следует избегать контакта реагентов с поврежденной кожей или слизистыми. В зонах, где проводится работа с образцами, запрещено курить, принимать пищу и питье.

Конъюгаты антител и реагент для пермеабилизации и лизиса содержат азид натрия в качестве консерванта. Следует избегать контакта этих реагентов с кожей и слизистыми оболочками.

Фиксирующий реагент содержит формальдегид. Следует избегать контакта этого реагента с кожей или слизистой оболочкой.

Набор следует применять строго по назначению, согласно данной инструкции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Не использовать набор по истечению срока годности.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО

4.1 Проточный цитометр BD FACS Canto II (BD Bioscience) с программным обеспечением Diva 8, проточный цитометр Quantum-8P «Illuminizer» (ImmunoTools GmbH) или аналогичный по характеристикам, в частности, имеющем сходные параметры для каналов FSC, SSC, FITC, PE, PerCP и APC.

4.2 Раствор для технического обслуживания проточного цитометра BD CellWASH (BD Bioscience, 349524).

4.3 Набор автоматических дозаторов переменного объема 1-20 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл и 1000-5000 мкл (Ленпипет, Socorex либо любой другой марки).

4.4 Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема 1-20 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл и 1000-5000 мкл.

4.5 Одноразовые полистироловые пробирки Falcon, 12 х 75 мм.

4.6 Пробирки для взятия венозной крови Sarstedt Monovette 2,7 (или 2,6 мл) с ЭДТА.

4.7 Низкоскоростная центрифуга (минимальная скорость 200 g) с бакет-ротором и держателями для пробирок размером 12 х 75 мм.

4.8 Штативы для наконечников, микропробирок (любой марки).

4.9 Ёмкость для сброса наконечников.

4.10 Холодильник на 2 – 8 ^{0}C (любой марки).

5. ПОДГОТОВКА ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Проточный цитометр на котором проводятся измерения должен проходить регулярное техническое обслуживание и контроль работоспособности согласно инструкции по применению прибора и рекомендациям производителя.

Проточный цитометр BD FACS Canto II (BD Bioscience) должен проходить следующие этапы контроля работоспособности:

- Измерение бидс BD CST (ежедневно);
- Измерение бидс BD One Flow (1 раз в неделю);
- Измерение бидс BD One Flow (1 раз в месяц);
- Настройка компенсации (ежемесячно);
- Базовый отчет (раз в два года).

Контрольные установки прибора BD FACS Canto II (BD Bioscience) должны соответствовать следующим значениям:

• остановка гейта: 5 000 клеток CD 16, время остановки: 180 с;

• максимальный поток: средний;

• настройки каналов приведены в таблице:

Канал флуорофора	Напряжение, В	Log	A (площадь)	H (высота)	W (ширина)
FSC	328	Нет	Да	Да	Нет
SSC	380	Нет	Да	Да	Нет
FITC	325	Да	Да	Нет	Нет
PE	463	Да	Да	Нет	Нет
PerCP-Cy5-5	549	Да	Да	Нет	Нет
APC	469	Да	Да	Нет	Нет
APC-Cy7	699	Да	Да	Нет	Нет

6. ПРОЦЕДУРА СБОРА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Необходимо собрать, по крайней мере, 2 мл цельной крови с ЭДТА с помощью венозной пункции. При заборе крови предпочтительно использовать системы забора,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

которые работают вручную, например, Sarstedt Monovette, не рекомендуется использовать системы забора крови с вакуумом (например, BD Vacutainer).

Забор крови осуществляют, по крайней мере, через 60-90 мин после последнего приема пищи. Перед забором крови, обследуемому следует избегать сильной физической нагрузки. Обследование невозможно во время прохождения обследуемым химио- или радиотерапии или после операции. Также не желательно что бы у обследуемого наблюдали острое воспаление или травму. Обследование не допускается во время стероидной, химио- или радиотерапии, иммуномодуляции (например, кортикоидов), антиревматических средств, метотрексата, амигдалина, куркумина, контрастных веществ или хирургии. В таких случаях должен быть промежуток не менее 8 недель до обследования. Пробы крови не могут использоваться для проведения исследований при длительном (более 36 часов) или ненадлежащем хранении (воздействие прямых солнечных лучей, интенсивное встряхивание пробы и пр.).

Образец крови должен храниться в горизонтальном положении, только при комнатной температуре (18-25 °С), во время хранения необходимо аккуратно перемешивать образцы, осторожно передвигая пробирку с кровью по поверхности стола. Следует предохранять образцы от воздействия прямых солнечных лучей, интенсивного встряхивания и других физических факторов.

Окрашивание и измерение осуществляют в течение 36 часов после забора крови. После добавления красителя готовые к измерению образцы остаются стабильными еще в течение 4 часов при температуре 15-25 °С.

7. ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ

Приготовление раствора для пробоподготовки. Необходимое количество концентрата раствора разводят в 20 раз деионизированной водой. Например, к 10 мл концентрата добавляют 190 мл дистиллированной воды. Разбавленный раствор для пробоподготовки пропускают через фильтр 0,22 мкм и хранят не более 5 дней при температуре (4-8)°С.

Перед использованием раствор 1 и раствор 2, а также разбавленный раствор для пробоподготовки необходимо довести до комнатной температуры (15-25 °С). Антитела необходимо использовать в охлажденном виде и защищать от прямого света, после использования остатки антител необходимо сразу поместить обратно в холодильник. Образцы крови нельзя подвергать интенсивному перемешиванию на вортексе.

Испытания должны проводиться при комнатной температуре (15-25 °С). Последовательность действий при работе с окрашенным образцом должна соблюдаться на всех этапах процесса тестирования. Процедура окрашивания не должна прерываться. Необходимо соблюдать указанное время и последовательность окрашивания и инкубации!

7.1 Окрашивание образцов

а. *Маркировка пробирок.* Для каждого образца используйте отдельную пробирку (12х75 мм), нанесите на пробирку маркировку с идентификационным номером образца. Кроме того, подготовьте пробирку для контрольного образца (FMO-контроль). При работе с контрольным образцом действуйте согласно инструкции, за исключением добавления антител. Отрицательный контроль служит для определения оптимальных условий для измерения и дифференцировки моноцитов по размеру и гранулярности. Отрицательный контроль позволяет добиться оптимального разрешения на точечной диаграмме размер/гранулярность.

б. *Добавление поверхностных антител (CD14 PerCP / CD16 APC).* Добавьте 10 мкл антител CD14-PerCP и 10 мкл антител CD16-APC на дно каждой пробирки (за исключением контрольной).

в. *Добавление образцов крови.* Для каждой пробирки с образцом используйте новый наконечник микропипетки, осторожно добавьте 130 мкл хорошо перемешанной цельной крови на дно каждой пробирки. Внимание: кровь не должна быть агглютинированной, не

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

перемешивать кровь на вортексе! Осторожно встряхните пробирку с образцом.

г. *Первая инкубация.* Инкубировать в течение 15 мин при комнатной температуре (18-25 °С) в темноте.

д. *Фиксация.* Отмерить пипеткой 100 мкл раствора 1 (реагент для фиксации) в каждую пробирку. Тщательно, но недолго (примерно 10 раз, в течение нескольких секунд) встряхните образцы.

е. *Вторая инкубация.* Инкубировать в течение 15 мин при комнатной температуре (15-25 °С) в темноте.

ж. *Добавление CellWASH (или разбавленного раствора для пробоподготовки) и центрифугирование.* Добавить 3,5 мл CellWASH (или разбавленного раствора для пробоподготовки) в каждую пробирку, быстро поставить образцы в центрифужные стаканы и центрифугировать при 350 g в течение 5 мин при комнатной температуре (18-25 °С). Сразу после центрифугирования осторожно слейте надосадочную жидкость в подходящий контейнер для отходов, содержащий дизинфектант, убедитесь, что клеточный осадок окружен как можно меньшим количеством остаточной жидкости (около 150 мкл) и что уровень жидкости во всех пробирках примерно одинаков. Аккуратно, но тщательно, встряхните образцы.

з. *Третья инкубация.* Инкубировать в течение 2,5 мин при комнатной температуре (18-25 °С) в темноте. Образцы тщательно встряхнуть, затем инкубировать еще 2,5 мин при комнатной температуре (15-25 °С) в темноте.

и. *Ресуспендирование.* Осторожно ресуспендировать клеточный осадок пипеткой на 1000 мкл, настроенной на отбор 200 мкл. Во время ресуспендирования важно, что бы остаточная жидкость полностью засасывалась в пипетку, для определения наличия или отсутствия любого клеточного остатка. На данном этапе следует избегать любого вспенивания!

к. *Пермеабилизация и лизис.* Отмерить 100 мкл раствора 2 (реагент для пермеабилизации и лизиса) в каждую пробирку. Осторожно встряхивать образцы в течение короткого времени.

л. *Четвертая инкубация.* Инкубировать образцы ровно 5 мин при комнатной температуре (15-20 °С) в темноте.

м. *Добавление внутриклеточных антител (Apo10 FITC/TKTL1-PE).* Осторожно добавить 10 мкл антител Apo10 FITC и 10 мкл антител TKTL1-PE на дно пробирки (за исключением контрольной), для каждого образца использовать новый наконечник микропипетки. Запустить таймер (20 мин) при пипетировании антител в первую пробирку. Тщательно, но осторожно встряхивайте образцы.

н. *Пятая инкубация.* Инкубировать ровно 20 мин при комнатной температуре (18-25 °С) в темноте. Время инкубации отсчитывать от момента запуска таймера во время предыдущего этапа.

о. *Добавление CellWASH (или разбавленного раствора для пробоподготовки) и центрифугирование (1).* Добавить 3,5 мл CellWASH (или разбавленный раствор для пробоподготовки) в каждую пробирку, быстро поставить образцы в центрифужные стаканы и центрифугировать их при 350 g в течение 5 мин при комнатной температуре (18-25 °С). Сразу после центрифугирования осторожно слейте надосадочную жидкость в подходящий контейнер для отходов, содержащий дизинфектант, убедитесь, что клеточный осадок окружен как можно меньшим количеством остаточной жидкости (около 150 мкл) и что уровень жидкости во всех пробирках примерно одинаков.

п. *Добавление CellWASH (или разбавленного раствора для пробоподготовки) и центрифугирование (2).* Добавить 3,5 мл CellWASH (или разбавленный раствор для пробоподготовки) в каждую пробирку, быстро поставить образцы в центрифужные стаканы и центрифугировать их при 350 g в течение 5 мин при комнатной температуре (18-25 °С). Сразу после центрифугирования осторожно слейте надосадочную жидкость в подходящий контейнер для отходов, содержащий дизинфектант, убедитесь, что клеточный осадок

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

окружен как можно меньшим количеством остаточной жидкости (около 150 мкл) и что уровень жидкости во всех пробирках примерно одинаков.

р. Ресуспендирование и инкубация. Осторожно встряхнуть все образцы 3 раза, чтобы растворить клеточный осадок. Немедленно добавить 200 мкл CellWASH (или разбавленного раствора для пробоподготовки) к клеточному осадку (красный краситель больше не должен проявляться) [Необязательный шаг: если для цитометра требуется другая пробирка, перенесите в нее образец на данном этапе]. Инкубировать в течение 30 мин при комнатной температуре (18-25 °C) в темноте.

Настройте прибор для проточной цитометрии для тестирования. [Необязательный шаг: если для измерения на данном цитометре требуется больший объем образца, добавьте необходимое количество (до 200 мкл) CellWASH]. Непосредственно перед измерением слегка перемешайте пробирку с образцом.

7.2 Измерение образцов

Измерение должно быть завершено не позднее, чем через 4 часа после начала процесса окрашивания. Измерение необходимо проводить на BD FACS Canto II (BD Bioscience) или Illuminizer (ImmunoTools GmbH). Перед измерением необходимо проверить состояние устройства, настройки лазера и детектора, элементы управления в соответствии со спецификациями путем использования стандартных подтверждающих измерений, предусмотренных производителем.

7.3 Контроль выполнения испытаний

Принцип проведения теста требует, что бы гейт CD16+ всегда оценивался относительно моноцитов CD14+ путем визуальной проверки для определения корректности проведения процедуры анализа. В противном случае количество CD16+ может быть занижено программным обеспечением. Это может привести к нарушению оценки Apo10/TKTL1. Для проведения теста необходимо, что бы количество положительных макрофагов CD16 + было не менее 500, это служит дополнительным контролем качества во всех тестах. Меньшее количество CD16+ клеток может препятствовать анализу Apo10-FITC и TKTL1-PE.

На рис. 1 (A, B, D) показан типичный хорошо окрашенный образец, который можно использовать для дальнейшего анализа Apo10-FITC и TKTL1-PE. На рисунке 1A моноциты правильно гейтированы с использованием детекторов FSC и SSC. Далее, на рисунке 1B, CD14+ клетки правильно гейтированы от исходной популяции моноцитов (и SSC-A). Тем не менее, на рисунке 1 C (с использованием исходной популяции CD14), гейт для CD16 установлен слишком низко, фактически, этот гейт CD16 должен быть установлен выше, как показано на рисунке 1 D.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

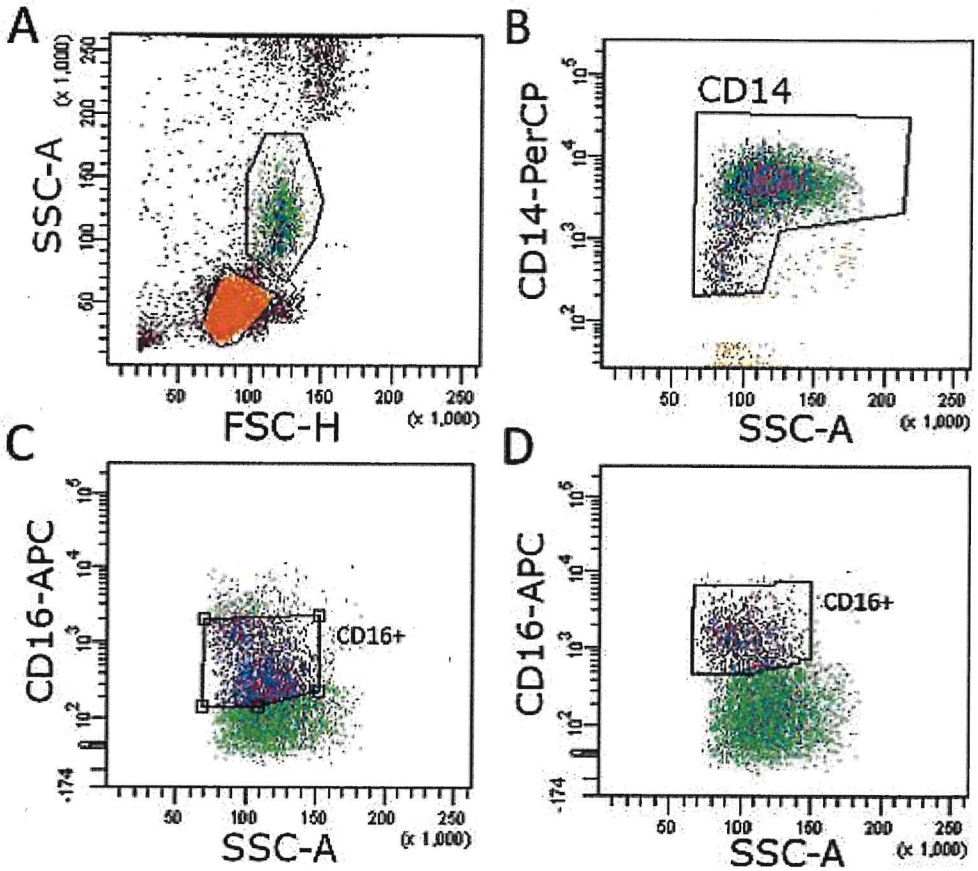


Рисунок 1.

На рис. 2 (A, B) приведены примеры плохо окрашенных образцов, в следствии, например, плохого лизиса эритроцитов (например, из-за неадекватной ресуспензии), что привело к плохому разделению (частичному перекрыванию) популяций по осям детекторов FSC и SSC. На рис. 2 C популяция CD14+ плохо отделена от остальных клеток (выделено коричневым цветом).

В случае несоответствия полученного распределения клеток, ожидаемому результату (рис. 2), перед повторным измерением, следует проверить следующее:

- срок годности реагентов и правильность хранения набора;
- функциональные возможности и исправность используемых устройств;
- правильное выполнение теста, соблюдение временного регламента;
- провести визуальную проверку образцов крови, компонентов набора на наличие загрязнений или утечек.

Если при повторном испытании не удается добиться необходимого результата, обратитесь к производителю или местному дистрибьютору. Не используйте набор, который плохо окрашивает образцы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

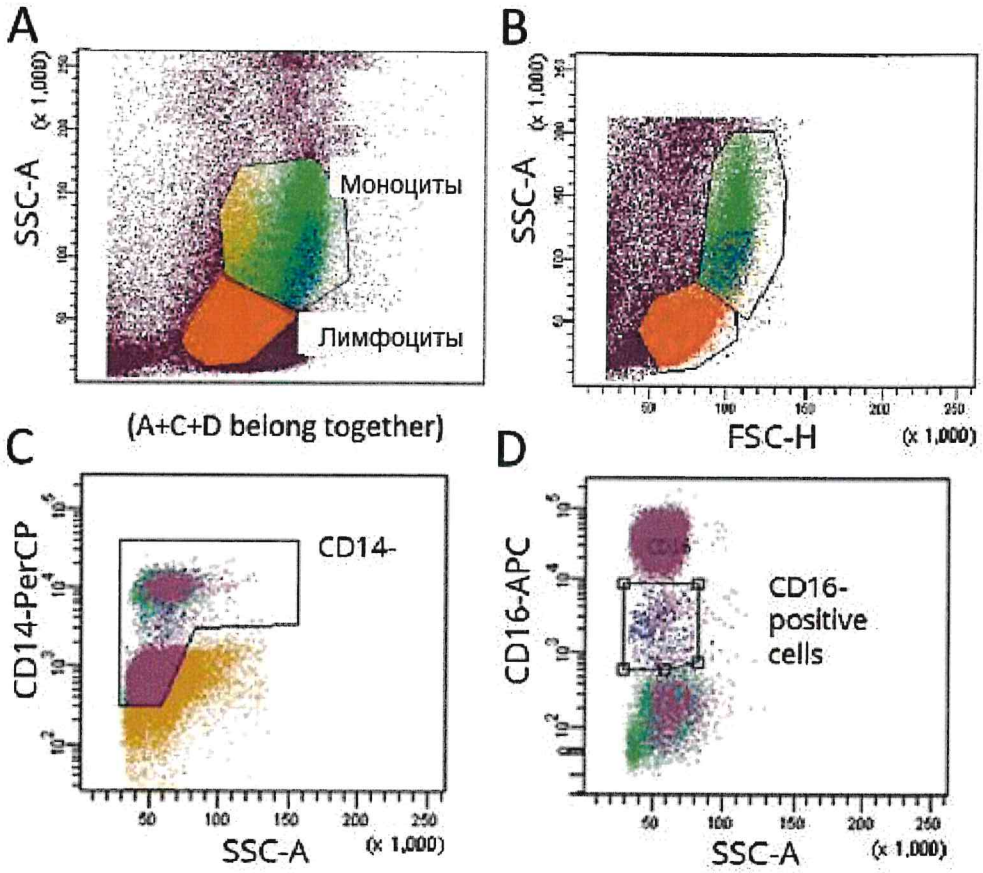


Рисунок 2.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

С помощью PanTum Detect определяют процент макрофагов, содержащих высокий уровень TKTL1 и Apo10. Оценку результатов проводят на специальном программном обеспечении фирмы Zyagnum AG (Германия). Алгоритм программы определяет содержание TKTL1/Apo10 в данном образце и, на основании полученных значений, рассчитывает общий балл, характеризующий вероятность наличия злокачественных новообразований.

Если общий балл превышает 260, то тест считают положительным. Если значение общего балла находится в диапазоне от 245 до 260, то результат теста следует признать сомнительным (серая зона). В этом случае рекомендуется повторить тест через 3 месяца. Если, при повторном исследовании, значение общего балла ниже 245, то результат считается отрицательным. Если общий балл при повторном исследовании снова равен или выше 245 баллов, то результат считается положительным. Результат больше чем 260 баллов всегда считается положительным, в данном случае нет необходимости проводить повторные измерения.

При интерпретации, полученных данных следует учитывать, что результаты теста PanTum Detect не являются основанием для постановки диагноза. Положительный результат требует дополнительной диагностической верификации, полученные результаты всегда следует интерпретировать вместе с клинической картиной, а не в одиночку. Диагноз ставит лечащий врач на основании комплекса анализов и других исследований. Отрицательный результат не исключает наличие злокачественной опухоли.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. ФОРМА ВЫПУСКА

Набор «Pan Tum Detect» выпускается в виде упакованного комплекта реагентов. Один набор рассчитан на проведение 100 анализов.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

10.1 Транспортирование набора должно производиться при температуре плюс $(5\pm3)^0$С.

10.2 Срок годности набора – 12 месяцев с даты изготовления. Датой изготовления считают дату приемки ОБК изготовителя.

10.3 Хранение набора должно производиться при температуре плюс $(5\pm3)^0$С на протяжении всего срока годности набора.

11. УКАЗАНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

Набор должен использоваться согласно Инструкции по применению, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

12. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие набора заявленным параметрам при соблюдении потребителем условий транспортирования и хранения, установленных ТУ. Претензии по поводу ненадлежащего качества направлять изготовителю по адресу: Республика Беларусь, г. Минск, ул. Филимонова, 25Г, офис 1000.

Разработчик:

Зав. лабораторией
ОДО «КомПродСервис» С.В. Ткачев

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru