

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор «Pan Tum Detect» предназначен для определения содержания онкомаркеров Apo10 и TKTL1 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 анализов.

2. СОСТАВ

В комплект набора входит:

Компонент	Количество/Объем
Моноклональные антитела к клеточной поверхности (в растворе, содержащем 1% BSA и 0,1% NaN ₃):	
CD14-PerCP	1 шт (1 мл)
CD16-APC	1 шт (1 мл)
Моноклональные антитела к опухолевым антигенам Apo10 и TKTL1 (в растворе, содержащем 1% BSA и 0,1% NaN ₃):	
Apo10-FITC	1 шт (1 мл)
TKTL1-PE	1 шт (1 мл)
Реагенты и растворы:	
Реагент для фиксации (Раствор 1)	1 шт (11 мл)
Реагент для пермеабиллизации и лизиса клеток (Раствор 2)	1 шт (11 мл)
Инструкция	1 шт
Паспорт	1 шт

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Только для диагностики *in vitro*.

При работе с химреактивами необходимо пользоваться средствами индивидуальной защиты (халатами, перчатками, защитными марлевыми повязками, шапочками), обеспечивающими устранение опасности негативного воздействия реагентов.

При работе с реагентами, биологическими материалами необходимо пользоваться только полуавтоматическими дозаторами. Категорически запрещается пипетировать материалы и реагенты ртом.

В лаборатории категорически запрещается курение и прием пищи.

При случайном попадании реагентов на кожу или в глаза следует немедленно промыть пораженные участки большим количеством теплой проточной воды, при необходимости обратиться к врачу.

Конъюгаты антител и реагент для пермеабиллизации 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.

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°C в течение не менее часа.

Набор следует применять строго по назначению, согласно данной инструкции.

Не использовать набор по истечению срока годности.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО

4.1 Проточный цитометр BD FACSLyric (BD Bioscience, США) с программным обеспечением FACSuite не ниже версии 1.5 или проточный цитометр BD FACS Canto II (BD Bioscience) с программным обеспечением не ниже Diva 8.

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

4.3 Раствор проточный для технического обслуживания проточного цитометра BD FACSType Sheath Fluid (BD Bioscience).

4.4 Раствор очищающий для технического обслуживания проточного цитометра BD FACSClean Solution (BD Bioscience).

4.5 Раствор очищающий для технического обслуживания проточного цитометра BD FACS Shutdown Solution (BD Bioscience).

4.6 Частицы для калибровки проточного цитофлуориметра BD CS&T Beads.

4.7 Установочные частицы для настройки проточного цитофлуориметра BD OneFlow Setup Beads.

4.8 Набор частиц для пятицветной настройки компенсации проточного цитофлуориметра BD FC Beads 5-Color Kit.

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

4.10 Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема 1-20 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл и 1000-5000 мкл (любой марки).

4.11 Набор 8-канальных электронных дозаторов переменного объема 5-50 мкл и 100-1200 мкл.

4.12 Одноразовые наконечники для 8-канальных электронных дозаторов переменного объема 250 мкл и 1000 мкл.

4.13 8-12-секционные и односекционные ванночки для многоканальных дозаторов.

4.14 Одноразовые полистироловые пробирки Falcon® (Corning, REF 352052, 5 мл, 12 x 75 мм).

4.15 Пробирки для взятия венозной крови Sarstedt Monovette 2,7 мл (или 2,6 мл) с ЭДТА (Sarstedt, REF 05.1167, 2,7 ml КЗЕ).

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

4.17 Штативы для наконечников, микропробирок (любой марки).

4.18 Ёмкость для сброса наконечников.

4.19 Холодильник на 2 – 8°C (любой марки).

4.20 Ручной дозатор шагового типа степер (например, Brand).

4.21 Станция для пробоподготовки Freedom EVO с программным обеспечением Gemini (Tecan Group Ltd.).

4.22 Орбитальный шейкер с платформой, позволяющей фиксировать центрифужные держатели для пробирок Falcon, с наличием таймера и обеспечивающий скорость вращения 600 об/мин (4 шт.).

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.

В настоящее время набор Pan Tum Detect предназначен для использования с BD FACSLytic™ (с 2 или 3 лазерами), при необходимости измерения можно выполнять на BD FACSCanto II (с 2 или 3 лазерами).

Частицы, необходимые для настройки для корректного проведения анализа:

- Частицы для калибровки проточного цитофлуориметра BD CS&T Beads (ежедневно);
- Установочные частицы для настройки проточного цитофлуориметра BD OneFlow Setup Beads (еженедельно);
- Набор частиц для пятицветной настройки компенсации проточного цитофлуориметра BD FC Beads 5-Color Kit (ежемесячно).

Необходимое обслуживание для корректного проведения анализа:

- BD CS&T Beads Performance QC (ежедневно);
- BD OneFlow: диапазон TMFI +/-15% (1 раз в неделю);
- BD OneFlow: диапазон TMFI +/-2% (1 раз в месяц);
- Настройки компенсации BD FC Beads 5-Color Kit (ежемесячно).

Для проведения анализа на BD FACSLytic™ используются следующие настройки:

1. Время измерения: 90 с, скорость потока: высокая.
2. Программное обеспечение: FACSuite v. 1.5 или выше.
3. Версия анализа: Pan Tum V1_0 – 30 мин.
4. Порог FSC установлен на 20.000 по оси x.

Для проведения анализа Pan Tum Detect на BD FACSCanto II используются следующие настройки:

1. Время измерения: 180 с, скорость потока: средняя.
2. Программное обеспечение: Diva v. 8 или выше.
3. Пороговое значение для FSC: 20 000
4. Гейт остановки записи: 10 000 клеток CD16.

Важно! Перед выполнением анализа Pan Tum Detect необходимо убедиться, что промывка цитометра проведена достаточно тщательно и проточная система не содержит клеточного материала способного исказить результаты анализа. Для этого необходимо после настройки прибора с использованием BD CS&T Beads, провести измерение раствора CellWASH. Если на полученной диаграмме отсутствуют остатки клеточного материала, то процедура промывки цитометра проведена корректно, в противном случае, при наличии «грязи», промывку цитометра необходимо провести повторно.

6. ПРОЦЕДУРА СБОРА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Забор крови осуществляют, по крайней мере, через 90-120 мин после последнего приема пищи. Перед забором крови, обследуемому следует избегать сильной физической нагрузки.

Любое лечение или воздействие, влияющие на иммунные клетки, должно рассматриваться как критерий исключения. К ним относятся стероидная, химио- или лучевая терапия, иммунная модуляция (например, с помощью кортикостероидов), ГМ-КСФ, противовоспалительные препараты, метотрексат, амгдалин, куркумин, контрастные вещества, а также операции и вакцинация. Кроме того, любое острое заболевание, которое может повлиять на иммунную систему, например, бактериальные или вирусные инфекции, является критерием исключения. При наличии одного из упомянутых здесь противопоказаний исследование проводится после периода ожидания не менее 8 недель (4 недели для вакцинации и однократной дозы кортизона). После успешного онкологического лечения период ожидания должен составлять 5 лет.

Для забора крови следует использовать S-Monovette® K3 EDTA (Sarstedt, 05.1167) с S-Monovette-Needle, 21G x 1½", Nr.2 (Sarstedt, SAR 85.1162).

S-Monovette предназначен для объема 2,7 мл, достоверный результат испытания может быть получен только при заборе по крайней мере ¾ объема (2 мл) пробирки. Образцы с меньшим объемом материала не подходят для тестирования.

Для проведения теста необходимы неповрежденные макрофаги, поэтому сбор образцов требует особой тщательности:

1. Поршень пробирки для сбора крови должен двигаться медленно и останавливаться только в конце процедуры.

2. Образец должен быть тщательно перемешан без сильного встряхивания.

Транспортировка, хранение и стабильность образца

Образец должен храниться и транспортироваться при комнатной температуре (от +18°C до +25°C) в горизонтальном положении. Окрашивание и измерение должны проводиться в течение 36 часов после забора крови.

Хранение и стабильность обработанного образца

После завершения процесса окрашивания обработанные образцы стабильны для измерения в течение 4 часов при комнатной температуре.

7. ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ

Перед использованием раствор 1 и раствор 2 необходимо довести до комнатной температуры (15-25°C). Антитела необходимо использовать в охлажденном виде и защищать от прямого света, сразу после использования остатки антител необходимо сразу поместить обратно в холодильник.

Перед использованием обязательно перемешайте пробирки с антителами на вортексе, а затем проведите мягкое центрифугирование пробирок с антителами, чтобы собрать растворы антител внизу пробирок.

Образцы крови нельзя подвергать интенсивному перемешиванию на вортексе. Образцы крови необходимо аккуратно перемешать, медленно переворачивая пробирку с кровью.

Испытания должны проводиться при комнатной температуре (15-25 °C). 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!

Для достижения наилучших результатов необходимо строго следовать протоколу выполнения теста (см. главу 7). Протокол должен быть выполнен за один раз и без перерывов. Необходимо использовать таймер и строго соблюдать указанное время инкубации.

7.1 Окрашивание образцов

7.1.1 Прообработка в ручном режиме

а. *Маркировка пробирок.* Для каждого образца используйте отдельную пробирку (12x75 мм), нанесите на пробирку маркировку с идентификационным номером образца. Кроме того, подготовьте пробирку для контрольного неокрашенного образца (FMO-контроль). При работе с контрольным образцом действуйте согласно инструкции, за исключением добавления антител. Контроль служит для определения оптимальных условий для измерения и дифференцировки моноцитов по размеру и гранулярности. Контроль позволяет добиться оптимального разрешения на точечной диаграмме размер/гранулярность.

б. *Добавление поверхностных антител (CD14 PerCP/CD16 APC).* Смешайте в отдельной пробирке антитела CD14-PerCP и антитела CD16-APC в соотношении 1:1, учитывая, что на один анализ необходимо 20 мкл смеси.

Добавьте 20 мкл смеси антител CD14-PerCP и CD16-APC на дно каждой пробирки (за исключением контрольной).

Готовая смесь поверхностных антител (CD14 PerCP/CD16 APC) остается стабильной в течение 45 дней с момента приготовления.

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 перемешивать кровь на вортексе!

Встряхните штатив с пробирками с образцом следующим образом: несколькими интенсивными движениями примерно 10 см вперед-назад в течение 3 с, затем несколько раз примерно 10 см влево и вправо в течение 5 с (5 раз). Переверните штатив на 180 и повторите процедуру встряхивания.

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

д. *Фиксация.* Отмерить пипеткой или степпером 100 мкл раствора 1 (реагент для фиксации) в каждую пробирку.

Встряхните пробирку с образцом следующим образом: несколькими движениями, по интенсивности меньше, чем в прошлом встряхивании, примерно 10 см вперед-назад в течение 3 с, затем несколько раз примерно 10 см влево и вправо в течение 3 с.

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

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

Встряхните пробирку с образцом следующим образом: несколькими очень интенсивными движениями примерно 10 см вперед-назад в течение 3 с, затем несколько раз примерно 10 см влево и вправо в течение 3 с.

з. *Третья инкубация.* Инкубировать в течение 2,5 мин при комнатной температуре (18-25 °C) в темноте. По окончании инкубации встряхните пробирку с образцом

следующим образом: несколькими очень интенсивными движениями примерно 10 см вперед-назад в течение 3 с, затем несколько раз примерно 10 см влево и вправо в течение 3 с, 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 250 мкл. Во время ресуспендирования важно, чтобы остаточная жидкость полностью засасывалась в пипетку, для определения наличия или отсутствия любого клеточного остатка. На данном этапе следует избегать любого вспенивания!

к. *Пермеабиллизация и лизис*. Отмерить пипеткой или степпером 100 мкл раствора 2 (реагент для пермеабиллизации и лизиса) в каждую пробирку.

Встряхните пробирку с образцом следующим образом: несколькими плавными движениями примерно 10 см вперед-назад в течение 3 с, затем несколько раз примерно 10 см влево и вправо в течение 3 с.

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

м. *Добавление внутриклеточных антител (Apo10 FITC/TKTL1-PE)*.

Смешайте в отдельной пробирке антитела Apo10 FITC и антитела TKTL1-PE в соотношении 1:1, учитывая, что на один анализ необходимо 20 мкл смеси.

Осторожно добавьте 20 мкл смеси антител Apo10 FITC и TKTL1-PE на дно пробирки (за исключением контрольной), для каждого образца использовать новый наконечник микропипетки. Запустить таймер (20 мин) при пипетировании смеси антител в первую пробирку.

Осторожно встряхнуть образцы: несколькими плавными движениями примерно 10 см вперед-назад в течение 5 с (5 раз), затем несколько раз примерно 10 см влево и вправо в течение 3 с.

Готовая смесь внутриклеточных антител (Apo10 FITC/TKTL1-PE) остается стабильной в течение 45 дней с момента приготовления

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 и центрифугирование (1)*. Добавить 3,5 мл CellWASH 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). Немедленно после центрифугирования слейте надосадочную жидкость до последней капли в подходящий контейнер для отходов, содержащий дезинфектант, 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 и центрифугирование (2)*. Добавить 3,5 мл CellWASH 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). Немедленно после центрифугирования осторожно слейте надосадочную жидкость в подходящий контейнер для отходов, содержащий дезинфектант, убедитесь, что клеточный осадок окружен как можно меньшим количеством остаточной жидкости (около 150 мкл) и что уровень жидкости во всех пробирках примерно одинаков.

р. *Ресуспендирование и инкубация*. Встряхните все образцы 3 раза, чтобы растворить клеточный осадок, например, проведя пробиркой по поверхности штатива. Немедленно добавить 120-170 мкл CellWASH к клеточному осадку (после добавления CellWASH общий

объем жидкости в пробирке должен быть в диапазоне 250-300 мкл). Инкубировать в течение 30 мин при комнатной температуре (18-25 °С) в темноте.

Настройте прибор для проточной цитометрии для тестирования. Непосредственно перед измерением слегка перемешайте пробирку с образцом.

7.1.2 Пробоподготовка в автоматическом режиме

а) *Маркировка пробирок.* Для каждого образца используется отдельная пробирка (12 x 75 мм), на пробирку наносится маркировка с идентификационным номером образца. Дополнительно необходимо подготовить 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 гранулярность. Отрицательный контроль позволяет добиться оптимального разрешения на точечной диаграмме размер/гранулярность.

б) *Добавление образцов крови.* Внимание: кровь не должна быть агглютинированной, не перемешивать кровь на вортексе. Плотно обхватив оба штатива для пробирок Falcon двумя руками, осторожно перемешивают пробирки с образцами попеременными движениями на 180°С от себя/к себе 6 раз. Перед началом внесения крови в пробирки Falcon включают таймер №1 с отчетом времени от 00 мин 00 сек. Для каждой пробирки с образцом используется новый наконечник пипетки, осторожно добавляется 130 мкл хорошо перемешанной цельной крови на дно каждой пробирки.

в) *Добавление поверхностных антител (CD14-PerCP/CD16-APC).* Приготавливают смесь антител CD14-PerCP и CD16-APC в расчете (количество проб x 20 мкл смеси антител) и тщательно перемешивают с использованием вортекса. Дозатором переменного объема 10-100 мкл добавляют в каждую лунку 8-секционной ванночки необходимый объем смеси антител CD14-PerCP и CD16-APC. Переносят пробирки с образцами в специальные адаптеры для центрифуги, закрепив их на шейкере. При помощи 8-канального электронного дозатора набирают необходимое количество смеси антител, проверяют наконечники на наличие пузырей и одинаковый уровень жидкости. Добавляют смесь антител в пробирки с образцами, незамедлительно включив при добавлении в первый ряд два таймера: таймер №1 с отчетом от 00 мин 00 сек и таймер №2 с отчетом от 15 мин 30 сек. Необходимо соблюдать 30-секундный интервал между внесением антител в каждый ряд пробирок с образцами. Перед сбросом наконечников в емкость с дезраствором визуально проверяются наконечники на наличие перемешивания. После добавления антител во все ряды пробирок включается шейкер №1 (40 сек, 600 об/мин).

Готовая смесь поверхностных антител (CD14 PerCP/CD16 APC) остается стабильной в течение 45 дней с момента приготовления.

г) *Первая инкубация.* Инкубировать в течение 15 мин 30 сек при комнатной температуре (18-25°С) в темноте.

д) *Фиксация.* До окончания первой инкубации добавляется необходимое количество раствора 1 (реагент для фиксации) в односекционный контейнер. При помощи 8-канального электронного дозатора набирают необходимое количество раствора 1, проверяют наконечники на наличие пузырей и одинаковый уровень жидкости. По завершении первой инкубации незамедлительно добавляется в каждую пробирку по 100 мкл раствора 1. При внесении раствора 1 в пробирки первого ряда параллельно включается таймер №3 с отчетом времени от 15 мин 00 сек. Необходимо соблюдать 30-секундный интервал между внесением антител в каждый ряд пробирок с образцами. Перед сбросом наконечников в емкость с дезраствором визуально проверяются наконечники на наличие перемешивания.

После добавления антител во все ряды пробирок включается шейкер №1 (40 сек, 600 об/мин).

е) *Вторая инкубация.* Образцы инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре (18-25 °С) в темноте. За две минуты до окончания инкубации образцы переносят на станцию для пробоподготовки EVO. Положение адаптеров на платформе EVO должно соответствовать их маркировке.

ж) *Добавление CellWASH и центрифугирование.* Проверяется уровень раствора CellWASH в соответствующем контейнере на станции EVO, при необходимости доливается жидкость до нужного уровня. По истечении времени инкубации запускают программу «Station 2», предварительно указывают нужное количество рядов и далее следуют всплывающим окнам инструкции на экране. После добавления CellWASH образцы центрифугируются в течение 5 минут при 350 g. После центрифугирования адаптеры на платформе возвращают в станцию пробоподготовки EVO. После удаления надосадочной жидкости адаптеры с пробирками переносят на шейкер №2, образцы перемешиваются в течение 5 мин при 600 об/мин. Необходимо всегда соблюдать 30-секундный интервал при транспортировке адаптеров с образцами (EVO – центрифуга, центрифуга – EVO, EVO – шейкер).

з) *Пермеабиллизация и лизис.* До окончания первой инкубации добавляется необходимое количество раствора 2 (реагент для пермеабиллизации и лизиса) в односекционный контейнер. При помощи 8-канального электронного дозатора набирают необходимое количество раствора 2, проверяют наконечники на наличие пузырей и одинаковый уровень жидкости. По завершении перемешивания образцов на шейкере №2 адаптеры с пробирками переносят на шейкер №3. Время переноса не превышает 30 сек. Далее по истечению 30 сек незамедлительно добавляют в каждую пробирку по 100 мкл раствора 2. При внесении раствора 2 в пробирки первого ряда параллельно включают таймер №5 с отсчетом времени от 5 мин 30 сек. Необходимо соблюдать 30-секундный интервал между внесением антител в каждый ряд пробирок с образцами. Перед сбросом наконечников в емкость с дезинфицирующим раствором визуально проверяются наконечники на наличие перемешивания. После добавления антител во все ряды пробирок включают шейкер №3 (40 сек, 600 об/мин).

и) *Третья инкубация.* Образцы инкубируются в течение 5 мин 30 сек при комнатной температуре (18-25°С) в темноте.

к) *Добавление внутриклеточных антител (Apo10-FITC/TKTL1-PE).* Приготавливают смесь антител Apo10-FITC и TKTL1-PE в расчете (количество проб x 20 мкл смеси антител) и тщательно перемешивают с использованием вортекса. Дозатором переменного объема 10-100 мкл добавляют в каждую лунку 8-секционной ванночки необходимый объем смеси антител Apo10-FITC и TKTL1-PE. При помощи 8-канального электронного дозатора набирают необходимое количество смеси антител, проверяют наконечники на наличие пузырей и одинаковый уровень жидкости. Добавляют смесь антител в пробирки с образцами, незамедлительно включив при добавлении в первый ряд таймер №6 с отсчетом времени от 20 мин 00 сек. Необходимо соблюдать 30-секундный интервал между внесением антител в каждый ряд пробирок с образцами. Перед сбросом наконечников в емкость с дезраствором визуально проверяются наконечники на наличие перемешивания. После добавления антител во все ряды пробирок включают шейкер №3 (40 сек, 600 об/мин).

Готовая смесь внутриклеточных антител (Apo10 FITC/TKTL1-PE) остается стабильной в течение 45 дней с момента приготовления

л) *Пятая инкубация.* Образцы инкубируют в течение 20 мин при комнатной температуре (18-25°C) в темноте.

м) *Добавление CellWASH и центрифугирование (1, 2).* По истечении времени инкубации запускают программу «Station 4», предварительно указывают нужное количество рядов и далее следуют всплывающим окнам инструкции на экране. После добавления CellWASH образцы центрифугируются в течение 5 минут при 350 g. После центрифугирования адаптеры на платформе возвращают в станцию пробоподготовки EVO. После удаления надосадочной жидкости и второго добавления CellWASH образцы центрифугируются в течение 5 минут при 350 g. После центрифугирования адаптеры с пробирками на платформе возвращают в станцию пробоподготовки EVO. После отбора надосадочной жидкости и добавления CellWASH адаптеры с пробирками переносят на шейкер №4 (40 сек, 600 об/мин). Необходимо всегда соблюдать 30-секундный интервал при транспортировке адаптеров с образцами (EVO – центрифуга, центрифуга – EVO, EVO – шейкер). По окончании перемешивания на шейкере образцы визуально проверяются на наличие осадка эритроцитов. Далее пробирки с образцами помещают в штатив и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре (18-25°C) в темноте.

7.2 Измерение образцов

Измерение должно быть завершено не позднее, чем через 4 часа после начала процесса окрашивания. Измерение необходимо проводить на BD FACSLyric или BD FACSCanto II (BD Bioscience). Перед измерением необходимо проверить состояние устройства, настройки лазера и детектора, элементы управления в соответствии со спецификациями путем использования стандартных подтверждающих измерений, предусмотренных производителем. Неокрашенный контроль служит для определения оптимальных напряжений FSC и SSC. Популяция моноцитов должна быть хорошо различима в центре на точечной схеме FSC/SSC.

7.3 Контроль выполнения испытаний

Принцип проведения теста требует, чтобы 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 Aro10/TKTL1. Для проведения теста необходимо, чтобы количество положительных макрофагов CD16⁺ было не менее 600, это служит дополнительным контролем качества во всех тестах. Меньшее количество CD16⁺ клеток может препятствовать анализу Aro10-FITC и TKTL1-PE.

На рис. 1 (A, B, D) показан типичный хорошо окрашенный образец, который можно использовать для дальнейшего анализа Aro10-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.

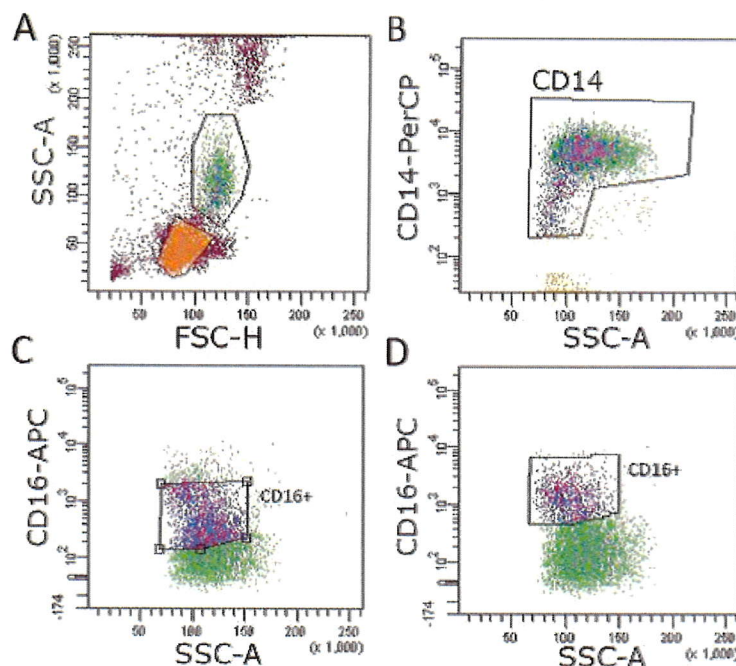


Рисунок 1.

На рис. 2 (А, В) 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 С 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 удастся добиться необходимого результата, обратитесь к производителю или местному дистрибьютору. Не используйте набор, который плохо окрашивает образцы.

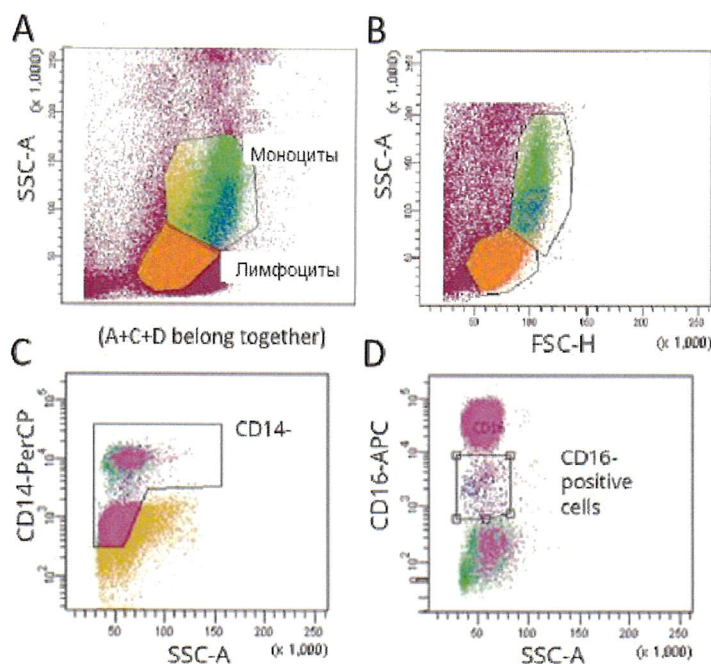


Рисунок 2.

8. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

С помощью Pan Tum Detect определяют число макрофагов, содержащий высокий уровень TKTL1 и Apo10 из расчета на тысячу активированных макрофагов (p.p.t. – particles per thousand / частиц на тысячу). Оценку результатов проводят на специальном программном обеспечении. Алгоритм программы определяет содержание TKTL1-позитивных (p.p.t.) и Apo10-позитивных макрофагов (p.p.t.) в данном образце и, на основании полученных значений, рассчитывает общий балл, характеризующий вероятность наличия опухолевых процессов в организме. Полученные результаты валидируются и интерпретируются врачом лабораторной диагностики.

Интерпретация результатов.

Если суммарный балл теста ниже значения 257 p.p.t., то тест считают отрицательным (зеленый бланк отчета).

Если значение суммарного балла находится в диапазоне от 257 до 262 p.p.t. включительно и значение показателя Apo10 равно 140 p.p.t. и более, то результат теста следует признать сомнительным (серый бланк отчета). В этом случае рекомендуется повторить тест через 5-6 месяцев. Если, при повторном исследовании, значение общего балла ниже 257 p.p.t., то результат считается отрицательным. Если общий балл при повторном исследовании равен или выше 263 p.p.t. баллов, то результат считается положительным.

В случае превышения порогового значения Apo10, равного 140 p.p.t. и более, и суммарного результата Pan Tum, равного 263 p.p.t. и более, тест считают положительным (желтый бланк отчета), так как вышеуказанные значения показывают нарушение клеточного метаболизма, свидетельствующий о возможных развивающихся или существующих опухолях.

Выдача результатов.

В качестве результата исследования пациенту выдается один из четырех типов бланков проведения анализа Pan Tum Detect. Бланк результата исследования представляет

собой лабораторный отчет, несущий в себе следующую информацию: дата взятия биоматериала, дата проведения исследования, номер анализа, номер клиента, пол, ФИО, дата рождения клиента; метод проводимого исследования, материал для анализа, место проведения анализа; результат исследования с рекомендациями к действию; ФИО эксперта лабораторной диагностики, проводившего исследование, и/или ФИО врача лабораторной диагностики, подпись и дата.

А) Зеленый бланк отчета – отрицательный результат с рекомендацией повторить тест Pan Tum Detect через 12 месяцев для постоянно системного контроля за возможным образованием потенциально опасных опухолей.

Б) Желтый бланк отчета – положительный результат с рекомендацией провести детальную диагностику вместе с врачом-онкологом.

В) Серый бланк отчета – сомнительный результат с рекомендацией повторить анализ Pan Tum Detect через 5-6 месяцев, так как один из индикаторов метаболических процессов Apo10 превышает допустимое значение, при этом суммарный результат Pan Tum Detect в норме. Необходимо взять на контроль динамику изменения данного индикатора.

Г) Синий бланк отчета – тест отклонен: результат не может быть корректно проанализирован из-за индивидуальных особенностей организма в данный момент. Рекомендация к действию: повторить Pan Tum Detect через 2 месяца.

При интерпретации полученных данных следует учитывать, что результаты теста Pan Tum Detect не являются основанием для постановки диагноза. Положительный результат требует дополнительной диагностической верификации, полученные результаты всегда следует интерпретировать вместе с клинической картиной. Диагноз ставит лечащий врач на основании комплекса анализов и других исследований.

Отрицательный результат не исключает наличие злокачественной опухоли.

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 $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$.

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 от 2 до 8°C 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, 220114, г. Минск, ул. Филимонова, 25Г, офис 1000 или на электронную почту info@pantum-oncotest.ru.

Разработчик:
Зав. лабораторией
ОДО «КомПродСервис»



Драгун Ю. А.