

ОКПД2 21.20.23

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор

ООО «РУССЭЛЛ»

_____/С. В. Зиновьев/

«04 » марта 2022 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Тест-система для иммуноцитохимического исследования белков тканей
человека SER-1 по ТУ 21.20.23–003–25717294–2021**

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Тест-система для иммуноцитохимического исследования белков тканей человека SER-1 по ТУ 21.20.23–003–25717294–2021 предназначена для качественного выявления экспрессии онкомаркера (EpCAM/BerEp4) в цитологических препаратах в качестве вспомогательного средства в диагностике опухолей (далее по тексту – тест-система). Используется для проведения исследований *ин витро* в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических и учебных учреждений, а также в научно-исследовательской практике. Анализируемым биологическим материалом являются клетки, полученные из выпотов в брюшную и плевральную полость.

1.2. Показания к применению

Уточняющая диагностика наличия клеток эпителиальных опухолей в выпотных жидкостях из серозных полостей.

1.3. Противопоказания

Определение клеток мезенхимального происхождения в выпотных жидкостях из серозных полостей.

1.4. ОПИСАНИЕ ЦЕЛЕВЫХ АНАЛИТОВ

Эпителиальный антиген (EpCAM/BerEp4) состоит из двух гликопротеинов, 34 кДа и 39 кДа, иногда обозначаемый как эпителиальный антиген, эпителиальный специфический антиген или эпителиальный гликопротеин. Гликопротеины расположены на поверхности клеточной мембраны и в цитоплазме практически всех эпителиальных клеток за исключением самых плоских эпителиев, гепатоцитов, почечных проксимальных трубчатых клеток, желудочных париетальных клеток и миоэпителиальных клеток. Иммунореактивность с антителом к EpCAM/BerEp4 наблюдалась в большинстве эпителиальных новообразований, тогда как большинство неэпителиальных новообразований не демонстрируют экспрессию EpCAM/BerEp4.² EpCAM/BerEp4 не экспрессируется в мезотелиальных клетках, гепатоцитах и лимфоцитах.^{1,2} EpCAM/BerEp4 может использоваться для диагностики новообразований эпителиального происхождения, например, дифференциальной диагностики между аденокарциномой и мезотелиомой.²⁻⁴

Ссылки:

1. Schnell U, et al. EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1828:1989-2001.

2. Latza U, et al. Ber-Ep4: New monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelia. *J Clin Pathol*. 1990; 43:213-19.

3. Ordóñez NG. Value of the Ber-Ep4 antibody in differentiating epithelial pleural mesothelioma from adenocarcinoma: the M.D. Anderson experience and a critical review of the literature. *Am J Clin Pathol*. 1998; 109:85-9.

4.Ordóñez NG. The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma: a comparative study of epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. Am J Surg Pathol. 2003; 27:1031-51.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ

Настоящая тест-система может применяться в клинической практике для качественного выявления экспрессии онкомаркера ЕрСАМ/ВегЕр4 в цитологических препаратах в качестве вспомогательного средства в дифференциальной диагностике опухолей эпителиальной и мезотелиальной природы в асцитической и плевральной жидкости.

Данная тест-система используется с учетом истории болезни пациента и прочих анализов, оценка которых проводится квалифицированным врачом.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ.

2.1. СОСТАВ:

1. Тест-система для иммуноцитохимического исследования белков тканей человека SER-1 - 1 шт.
2. Пробирка объемом 1,5 мл, содержащая 100 мкл реагента № 1 «Первичное антитело к ЕрСАМ/ВегЕр4» - 1 шт.
3. Пробирка объемом 1,5 мл, содержащая 100 мкл реагента № 2 «Вторичное антитело» - 1 шт.
4. Пробирка объемом 1,5 мл, содержащая 15 мкл реагента № 3 «Диаминобензидин» - 1 шт.
5. Пробирка объемом 1,5 мл, содержащая 100 мкл реагента № 4 «Буферный раствор для Диаминобензидина» - 1 шт.
6. Пробирка объемом 1,5 мл, содержащая 100 мкл реагента № 5 «Гематоксилин Майера» - 1 шт.

2.1.1 Тест-система представляет собой комплекс миниатюрных химических реакционных зон, расположенных в определенном порядке. Состоит из крышки (1), прокладки (2), стекла (3), основания (4) и фиксатора (5) (рисунок 1). Размеры тест-системы в формате длина × ширина составляют 43,0 × 85,0 мм (± 0,5 мм), толщина 10 мм.

Поверхность разделена на две части. Часть № 1 считается рабочей поверхностью, и предназначена для внесения и фиксации исследуемого биоматериала (ячейка номер 3). Часть № 2 включает в себя две ячейки: ячейка номер 1 содержит положительный контрольный материал, характеризующийся позитивной экспрессией маркера ЕрСАМ/ВегЕр4, а ячейка номер 2 содержит отрицательный контрольный материал, характеризующейся негативной экспрессией маркера ЕрСАМ/ВегЕр4. На обратной стороне части № 2 расположено поле для записи, носящее информационный характер. Информация, закрепленная в поле для записи, представляет собой сведения о названии тест-системы и производителе. Кроме того, поле для записи может использоваться для внесения дополнительной информации.

2.1.2 Каждая ячейка тест-системы имеет порядковый номер (рисунок 1). В инструкции (стр.3. пп 2.1.1.) и в технических условиях (стр. 5-6, пп. 2.1.2.) прописано расположение контролей в ячейках части № 2. Каждая ячейка содержит либо положительный, либо отрицательный контрольный материал.

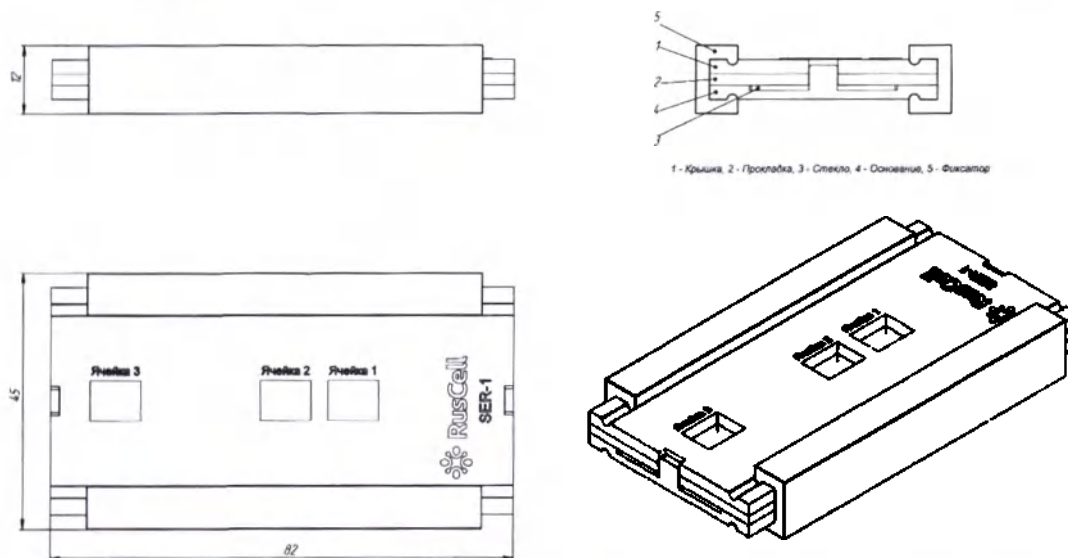


Рис.1 Внешний вид типовой тест-системы (вид сверху, ориентация по надписи на части № 2).

2.1.3 Масса тест-системы не должна превышать 100 г.

2.1.4 Время достижения устойчивых показателей теста – 110 минут.

2.1.5 Пробирка объемом 1,5 мл, содержащая 100 мкл реагента № 1 «Первичное антитело к ЕрСАМ/ВегЕр4». Микропробирка градуированная, объемом 1,5 мл типа «Эппендорф». Диаметр 8 мм, высота 32 мм, цена деления 0,5 мл. Имеет защелкивающуюся крышку. Пробирка изготовлена из полипропилена, что обеспечивает возможность автоклавирования в стандартном режиме. Имеет матовое окошко для записи информации. Антитело, содержащееся в данной микропробирке, является иммуноглобулином класса G, связывается со специфическими структурами внутри или вне клетки, экспрессирующими исследуемый анализ (антиген, маркер). Иммуноцитохимическое окрашивание позволяет визуализировать антигены путем последовательной обработки клеток первичным антителом, вторичным (связующим) антителом против первичного антитела, комплексом ферментов и хромогенным субстратом, с промежуточными этапами промывки. Ферментная активация хромогена приводит к видимому окрашиванию продуктов реакции на участках с наличием антигена. Затем препарат окрашивают контрастным красителем (входит в состав набора). Результаты окрашивания интерпретируются с использованием светового микроскопа.

2.1.6. Пробирка объемом 1,5 мл, содержащая 100 мкл реагента № 2 «Вторичное антитело». Микропробирка градуированная, объемом 1,5 мл типа «Эппендорф». Диаметр 8 мм, высота 32 мм, цена деления 0,5 мл. Имеет защелкивающуюся крышку. Пробирка изготовлена из полипропилена, что обеспечивает возможность автоклавирования в стандартном режиме. Имеет

матовое окошко для записи информации. Вторичное антитело способно связываться с первичным мышинным или кроличьим антителом. После связывания первичного антитела с антигеном в ячейку вносится вторичное антитело, конъюгат пероксидазы корня хрена (HRP) на полимере, взаимодействующий с вторичным антителом, и хромоген (диаминобензидин), что приводит к образованию ярко окрашенного преципитата в месте локализации комплекса антигена с антителами. Реагент № 2 представляет собой безбиотиновую систему, представленную коктейлем вторичных анти-мышинных и анти-кроличьих антител, конъюгат полимера и пероксидазы корня хрена.

2.1.7. Пробирка объемом 1,5 мл, содержащая 15 мкл реагента № 3 «Диаминобензидин». Микропробирка градуированная, объемом 1,5 мл типа «Эппендорф». Диаметр 8 мм, высота 32 мм, цена деления 0,5 мл. Имеет защелкивающуюся крышку. Пробирка изготовлена из полипропилена, что обеспечивает возможность автоклавирования в стандартном режиме. Имеет матовое окошко для записи информации. Диаминобензидин (ДАБ) – органическое соединение, являющееся производным бензидина. Водорастворимый тетрагидрохлорид диаминобензидина используют при иммуноцитохимическом окрашивании белков. ДАБ является субстратом пероксидазы корня хрена, вступает с ней в специфическую реакцию, результатом которой является темно-коричневое окрашивание. ДАБ готовится непосредственно перед применением и сохраняет свою активность (стабильность) в течение четырех часов.

2.1.8. Пробирка объемом 1,5 мл, содержащая 100 мкл реагента № 4 «Буферный раствор для Диаминобензидина». Микропробирка градуированная, объемом 1,5 мл типа «Эппендорф». Диаметр 8 мм, высота 32 мм, цена деления 0,5 мл. Имеет защелкивающуюся крышку. Пробирка изготовлена из полипропилена, что обеспечивает возможность автоклавирования в стандартном режиме. Имеет матовое окошко для записи информации. В процессе иммуноцитохимического окрашивания связь между антителом и соответствующим эпитопом антигена ограничена слабыми взаимодействиями (Ван дер Ваальсовыми, электростатическими и гидрофобными). Изменение pH или ионной силы раствора может нарушить данные связи, ослабив прочность связи антиген-антитело, и ухудшив результаты окрашивания. Использование разбавителя антител позволяет устранить вышеописанные потенциальные проблемы, и создать оптимальные условия для реализации качественных характеристик используемых антител. Разбавитель антител способствует стабилизации разведённых антител при 2-8 °С. Также данный раствор используется для разбавления диаминобензидина.

2.1.9. Пробирка объемом 1,5 мл, содержащая 100 мкл реагента №5 «Гематоксилин Майера». Микропробирка градуированная, объемом 1,5 мл типа «Эппендорф». Диаметр 8 мм, высота 32 мм, цена деления 0,5 мл. Имеет защелкивающуюся крышку. Пробирка изготовлена из полипропилена, что обеспечивает возможность автоклавирования в стандартном режиме. Имеет матовое окошко для записи информации. Гематоксилин – краситель, получаемый из эфирного экстракта кампешевого дерева (*Haematoxylon campechianum*). Применяется в виде различных

растворов для окрашивания гистологических препаратов. При окраске гематоксилином клеточные ядра приобретают тёмно-синий цвет.

2.1.10. В качестве положительных и отрицательных контрольных материалов, расположенных в ячейках номер 1 (положительный контроль) и номер 2 (отрицательный контроль) части № 2 тест-системы, выступают клетки клеточной линии и лимфоциты человека, характеризующиеся положительной и отрицательной экспрессией белка EpCAM/BerEp4 соответственно.

2.2. ФОРМА ВЫПУСКА:

2.2.1 Антитела входящие в состав тест-системы представлены в таблице 1.

Таблица 1

Наименование тест-системы/ условное обозначение Тест-системы	Панель антител
1	2
Тест-система для иммуноцитохимического исследования белков тканей человека SER-1 (определение белка EpCAM/BerEp4/BerEp4, («Тест-система SER-1»))	EpCAM/BerEp4

2.3 ЧИСЛО АНАЛИЗИРУЕМЫХ ПРОБ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Для проведения анализа требуется один исследуемый образец.

Одна тест-система предназначена для одного исследования.

2.4 ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод прямого качественного иммуноцитохимического анализа (ИЦХ) является универсальным, сочетающим в себе морфологический анализ и высокую специфичность иммунологических тестов. Включает в себя оценку параметров клеток в суспензии, культурах клеток и тканей. Принцип метода основан на взаимодействии антител, расположенных в ячейках тест-системы, с антигенами клеток, являющихся материалом для исследования, с последующей оценкой наличия окрашенных структур клеток в зависимости от экспрессии целевых белков. Антитела, используемые для тест-системы, это иммуноглобулины класса G. Антитела связываются со специфическими структурами внутри или вне клетки, экспрессирующими исследуемый аналит (антиген, маркер). Иммуноцитохимическое окрашивание, позволяет детектировать антигены путем последовательной обработки клеток первичным антителом против соответствующего антигена, вторичным (связующим) антителом против первичного антитела, комплексом ферментов и хромогенным субстратом, с промежуточными этапами промывки. Ферментативная активация хромогена приводит к видимому окрашиванию продуктов реакции на участках, характеризующихся наличием антигена. Затем препарат окрашивают контрастным красителем (входит в состав изделия). Результаты окрашивания интерпретируются с помощью светового микроскопа.

2.5 РЕФЕРЕНТНЫЕ МЕТОДИКИ АНАЛИЗА

Референтной методикой анализа служит иммуноцитохимия (Антитела фирмы «Дако Денмарк А/С» РУ № ФСЗ 2007/00216). Иммуноцитохимический метод позволяют локализовать и идентифицировать клеточные и тканевые компоненты (антигены), основываясь на их связывании с антителами. Место связывания определяют при помощи меченых антител или методом вторичного мечения. Использование такого подхода для выявления патологии на клеточном уровне позволяет детально исследовать функции и химический состав клеток и сопоставлять полученные результаты с известными морфологическими данными, что дает возможность глубже проникнуть в суть патологического процесса.

Использование антител лежит в основе исследований самых разных молекулярных образований: структурных компонентов клетки, клеточных продуктов (гормонов, ферментов, иммуноглобулинов), рецепторов на клеточной поверхности и т.д.

3 ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность. Моноклональные антитела обладают чрезвычайно высокой (100%) специфичностью по отношению к определяемому ими антигену. Каждое антитело узнает только свой антиген, точнее, одну его детерминантную группу. Детерминантная группа состоит из нескольких аминокислот (обычно из 6–8), образующих пространственную структуру, характерную для данного белка. Для получения моноклональных антител используется метод гибридомной технологии. В основе этого метода лежит процесс получения гибридом, продуцирующих определенные антитела. После получения клеточной линии гибридомы происходит клонирование и отбор нужных клонов, узнающих уникальную, характерную только для данного белка антигенную детерминанту. Клетки рассеивают методом предельных разведений в количестве 1 клетка на лунку планшета. После нескольких дней культивирования содержимое каждой лунки проверяют на присутствие антител нужной специфичности. Для этого использовали различные методы выявления антител к соответствующему антигену (ИФА, ИГХ). Клетки из лунок, содержащих нужные антитела, клонировали повторно, то есть повторно рассевали по таким же лункам, но из расчета 1 клетка на лунку, вновь культивировали и проверяли на присутствие нужных антител. Процедуру повторяли 1–2 раза. Таким образом, отбирали клоны, продуцирующие антитела только одной нужной специфичности, то есть моноклональные антитела. Эти антитела не содержат посторонних антител и настолько однородны физико-химически, что могут рассматриваться как чистые химические реактивы.

Таким образом, при введении специфического антигена (в данном случае рецептора ЕрСАМ/VerЕр4) были получены моноклональные антитела к одной уникальной детерминанте данного белка обладающие 100% специфичностью по отношению к нему. Также необходимо отметить, что данные моноклональные антитела, обладающие максимальной специфичностью, не обладают перекрестной реактивностью при соблюдении протокола окрашивания. Таким

образом, гибридная технология и методика отбора клонов обеспечивают 100% аналитическую специфичность получаемых моноклональных антител в распознавании данного антигена при соблюдении протокола окрашивания.

Список литературы:

Кеннет Р. Г., Мак-Керн Т. Дж., Бехтол К. Б. Моноклональные антитела: Гибридомы: новый уровень биологического анализа. М.: Медицина, 1983.

Ройт А. Основы иммунологии. М.: Мир, 1991.

Абелев Г. И. Моноклональные антитела // Соросовский Образовательный журнал. 1998, № 1. С. 1–6.

Ярилин, А. А. Иммунология / Ярилин А. А. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 752 с. - ISBN 978-5-9704-1319-7.

Иммуногистохимические методы: Руководство / Ed. by George L. Kumar, Lars Rudbeck: DAKO / Пер. с англ. под ред. Г.А.Франка и П.Г.Малькова. – М., 2011. – 224 с.

Также для подтверждения аналитической специфичности проводилось окрашивание контрольных образцов (клеточные линии с экспрессией или отсутствием экспрессии ЕрСАМ/ВегЕр4), что подтверждается актом квалификационных испытаний

3.2 Интерферирующая величина, интерферент (interfering quantity, interferent): Величина, которая не является мезюрандом, но оказывает влияние на результат измерения.

Иммуноцитохимический анализ — это многоступенчатый диагностический процесс, который требует специальной подготовки в выборе необходимых реактивов и тканей, фиксации, обработке и подготовке цитологических препаратов, а также интерпретации результатов окрашивания.

Только для лабораторий.

Для in vitro диагностики.

На результаты окрашивания влияет методика отбора, хранения и подготовки пробы. Ненадлежащее выполнение фиксации, высушивания, а также загрязнение пробы другими тканями и жидкостями может привести к появлению артефактов, неспецифическому связыванию антител или получению ложноотрицательных результатов.

Противоречивые результаты могут быть следствием естественной внутренней неоднородности образца.

Избыточное или неполное фоновое окрашивание может отрицательно сказаться на правильности интерпретации результатов.

Клиническая интерпретация любого положительного окрашивания либо его отсутствия должна проводиться с учетом истории болезни, морфологических данных, цитопатологических критериев и результатов прочих анализов. Квалифицированный специалист должен быть знаком с характеристиками антител, реактивов, диагностических панелей и методов, применяемых при

изготовлении окрашенного препарата. Окрашивание должно проводиться в сертифицированной и лицензированной лаборатории под контролем профильного специалиста, который несет ответственность за просмотр окрашенных препаратов.

При окрашивании данной тест-системой образцов, которые ранее не анализировались, могут возникнуть непредвиденные реакции. В связи с биологической вариабельностью экспрессии антигенов в опухолевых образованиях и при иных патологиях тканей, а так же влиянием проводимой терапии нельзя полностью исключить возможность непредусмотренной реактивности даже для тех тканей, на которых данные реагенты уже тестировались. При документированных случаях непредусмотренной реактивности свяжитесь с ближайшим представительством компании ООО «РУССЭЛЛ»

Ткани пациентов, инфицированных вирусом гепатита В, содержащие поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), могут показывать неспецифическое окрашивание при обработке пероксидазой корня хрена.

Ложноположительные результаты могут возникать вследствие неиммунологического связывания белков или продуктов реакции в субстрате. Они также могут вызываться псевдопероксидазной активностью, обусловленной эритроцитами, эндогенной пероксидазной активностью, вызванной цитохром С.

Интерференция определяется как влияние вещества, способного изменять истинное значение аналита в биологическом материале пациента. Интерференция может быть вызвана наличием в пробе биоматериала как эндогенного, так и экзогенного происхождения. По классификации, предложенной Ward G. и соавторами, причины интерференции в иммунном анализе можно разделить на аналит-независимые и аналит-зависимые. В случае иммуногистохимии к аналит-независимым интерферентам теоретически можно отнести все вещества, участвующие в пробоподготовке, а именно формалин, спирты и парафин. Однако согласно методике проведения исследования (см. Приложение В Порядок проведения исследований посредством изделий) все эти вещества элиминируются из образца при правильной подготовке и к моменту работы с изделием аналит-независимые интерференты в образце отсутствуют. Это также подтверждается литературными данными.

К основным эндогенным интерферирующим факторам относят следующие: метаболиты, образующиеся при патологических состояниях, таких как сахарный диабет; множественная миелома; холестатический гепатит; гемолиз, т.е. разрушение эритроцитов с выходом в жидкую часть крови ряда внутриклеточных компонентов (гемоглобина, ЛДГ, калия, магния и др.), что изменяет истинные результаты определения концентрации/активности таких компонентов крови, как билирубин, липаза; липемия, которая изменяет результаты ряда колориметрических и нефелометрических методов исследования (особенно при исследовании фосфора, общего билирубина, мочевой кислоты, общего белка, электролитов).

Отличительной особенностью ИЦХ метода является то, что материалом для исследования служит не кровь, а эпителиальные клетки. Некоторые литературные источники рассматривают эндогенную пероксидазу как потенциальный интерферент реакции. Она содержится в некоторых типах сильно васкуляризированной ткани и в эритроцитах. Однако в процессе пробоподготовки образца он подвергается процедуре ингибирования эндогенной пероксидазы с помощью раствора для ингибированной пероксидазы (3% перекись водорода). Это является неотъемлемой частью рутинной методики ИЦХ. Таким образом, к моменту использования изделия все потенциальные аналит-зависимые интерференты также отсутствуют. Существуют литературные данные описывающие устойчивость иммунохимических методов в целом к воздействию интерферентов в случае высокой специфичности применяемых антител, что и наблюдаем в отношении данного изделия.

Список литературы:

Мошкин А.В. Обнаружение интерференции как составляющая валидации результата лабораторного исследования. Лабораторная служба. 2018;7(4):3-4.

Ward G., Simpsonb A. et al. The investigation of interferences in immunoassay. Clinical Biochemistry 2017; 50: 1306–1311.

Caruso B, Bovo C, Guidi GC. Causes of preanalytical interferences on laboratory immunoassays – a critical review. The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2020; 31 (1): 70-84.

Interference Testing in Clinical Chemistry, 3rd Edition — EP07 Paperback – 2018, by NCCLS.

Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—Second Edition. NCCLS document EP9-A2 (ISBN 1-56238-472-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.

Analytical Interference More than Just a Laboratory Problem. Steven C. Kazmierczak, PhD, and Paul G. Catrou, MD, 2000 Jan;113 (1):9-11.

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.

3.2 Повторяемость составляет 100%. Значение получено путем сопоставления результатов использования тест-систем, выполненных повторно одними и теми же средствами, одним и тем же методом в одинаковых условиях и с одинаковой тщательностью.

3.3 Воспроизводимость в отношении заявляемой тест-системы составляет 100% (Набор должен давать одинаковые результаты при тестировании).

3.4 Клиническая (диагностическая) эффективность.

Клиническая (диагностическая) чувствительность составляет 92%.

Клиническая (диагностическая) специфичность для двух или более параллельных положительных результатов составляет более 91%.

Данные предоставлены на основе исследований ГБУЗ НО Городская больница №35, г.Н.Новгорода

Биологический референтный интервал применения медицинского изделия составляет 95%.

*Контрольными материалами являются клетки клеточной линии и лимфоциты человека с положительной и отрицательной экспрессией белка *ErCAM/VerEr4* соответственно, расположенные в ячейках части 2.*

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 При работе с тест-системой следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.

Контроль биозагрязнений в лаборатории – по ГОСТ ИСО 14698-1.

4.2 При операциях с тест-системой следует пользоваться резиновыми перчатками по ГОСТ 20010 и специальной лабораторной одеждой, так как образцы биологических материалов следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любого другого возбудителя вирусной инфекции.

4.3 Надлежит избегать контакта тест-системы с кожей, глазами и слизистыми, а также его разливания или случайного заглатывания при пипетировании.

4.4 Химическая посуда и оборудование, используемые при работе с тест-системой, должны быть

соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.5 Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с препаратом.

4.6 При выпуске тест-системы производственные штаммы микроорганизмов не используются.

4.7 Тест-системы не горючи, взрывобезопасны согласно ГОСТ 12.1.044.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 Оборудование:

- центрифуга лабораторная с режимом центрифугирования до 2000 g (центрифуга лабораторная СМ-6М, РУ № РЗН 2016/4617 от 26.08.2016, SIA «ELMI», Латвия; адаптер ротора: количество адаптеров в роторе 4 шт., тах размеры -применяемых пробирок, 30 x 135, тах объем применяемых пробирок 50 мл);
- микроскоп световой
- дозаторы полуавтоматические, позволяющие отбирать объемы жидкости 1-50 мкл; 10-100 мкл. 100-1000 мкл

5.2 Лабораторная посуда и прочие материалы:

- пробирки центрифужные вместимостью от 10 до 12 мл, градуированные (ГОСТ 1770);
- резиновые перчатки (ГОСТ 20010-93)
- наконечники пластиковые одноразовые к полуавтоматическим дозаторам
- контейнеры для промывочных растворов

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия

- Вода дистиллированная;
- Перекись водорода 3%
- Буфер фосфатный (pH 7,2-7,4)
- Раствор 95% этанола

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

6.1. Вид анализируемого биологического материала:

Анализируемым биологическим материалом являются клетки, полученные из выпотов в брюшную и плевральную полость.

6.2 Процедура получения анализируемого биологического материала.

6.2.1 Методика получения концентрированной взвеси клеток из выпотов серозных полостей.

6.2.1.1 Исследуемую жидкость центрифугировать в течение 5 мин. при 2000 об.:

Прозрачную серозную жидкость центрифугируют в полном объеме (по 8-10) центрифужных пробирок емкостью 10 мл; после центрифугирования надосадочную жидкость слить, осадки перемешать и объединить в одной пробирке. Если собранная взвесь клеток превышает объем более 1 мл, то необходимо повторить центрифугирование с последующим удалением надосадочной жидкости, доводя объем до 1 мл

Серозную мутную жидкость с осадком центрифугируют в полном объеме (по 8-10) центрифужных пробирок емкостью 10 мл; после центрифугирования надосадочную жидкость слить, осадки перемешать и объединить в одной пробирке. Если собранная взвесь клеток

превышает объем более 1 мл, то необходимо повторить центрифугирование с последующим удалением надосадочной жидкости, доводя объем до 1 мл

Геморрагическую жидкость центрифугируют в объеме не более 20 мл с последующим удалением надосадочной жидкости, доводя до объема 1 мл. Ресуспензировать с лизирующим раствором. Время инкубации 5 минут при комнатной температуре, после чего центрифугируют 5 минут при 2000 об и удаляют полностью надосадочную жидкость. К полученному осадку добавить 10 мл раствора 5% глюкозы и центрифугировать 5 минут при 2000 об, после удалить полностью надосадочную жидкость, а оставшийся клеточный осадок довести до объема 1 мл раствором 5% глюкозы.

6.2.1.2 Полученную клеточную взвесь тщательно перемешать на шейкере («вортексе») и пипеткой внести в ячейки тест-системы.

6.2.1.3 Провести анализ согласно п.8

6.3 Сбор биологического материала производится в сухой нестерильный пластиковый контейнер.

6.4 Предварительная обработка анализируемых проб биологического материала не производится.

7 ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

7.1 ПОДГОТОВКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ К РАБОТЕ.

За 20 минут до начала постановки реакции набор необходимо достать из непрозрачного контейнера. Следует избегать попадания прямых солнечных лучей на изделие вне контейнера.

8 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

8.1 РАСХОД КАЖДОГО КОМПОНЕНТА

Взвесь клеток в объеме 20 мкл

8.2 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Подготовленную взвесь клеток внести в ячейку №3 тест-системы и высушить при комнатной температуре.
2. Высушенный материал фиксировать раствором 95% этанола, внеся в ячейку №3 с исследуемым образцом по 50 мкл раствора 95% этанола. Время экспозиции 3 минуты, после чего остаточный раствор следует удалить с помощью автоматического дозатора.
3. В ячейки тест-системы №№ 1,2,3 (в каждую отдельно) внести по 50 мкл раствора 3% перекиси водорода на 10 минут.
4. Промыть тест-систему в двух порциях буферного раствора (по 2 минуты в каждом).

Важно! С этого этапа нельзя допустить высыхания поверхности ячеек до окончания реакции. При необходимости нахождение в буфере возможно дольше указанного времени

5. В ячейки тест-системы №№ 1,2,3 (в каждую отдельно) внести по 30 мкл раствора первичных антител (реагент 1). Время инкубации 30 минут при комнатной температуре.

6. Промыть тест-систему в двух порциях буферного раствора (по 2 минуты в каждом).
7. В ячейки тест-системы №№ 1,2,3 индивидуальным наконечником внести по 30 мкл вторично-меченных антител (реагент 2). Время инкубации 20 минут при комнатной температуре.
8. Промыть тест-систему в двух порциях буферного раствора (по 2 минуты в каждом).
9. Подготовить рабочий раствор диаминобензидина (ДАБ), разведя диаминобензидин (реагент 3) буферным раствором (реагент 4) в соотношении 1:20 (рабочий раствор ДАБ стабилен в течение 4 часов).
10. Внести в ячейки тест-системы №№ 1,2,3 по 30 мкл рабочего раствора ДАБ на 3-5 минут.
11. Промыть тест-систему в трех порциях воды (по 2 минуты в двух порциях и 10 минут в третьей порции).
12. Внести в ячейки тест-системы №№ 1,2,3 по 30 мкл раствора гематоксилина Майера (реагент 5) на 1 минуту.
13. Промыть тест-систему в воде и высушить на воздухе.
14. После высыхания аккуратно удалить фиксаторы, крышку и прокладку, чтобы извлечь предметное стекло.
15. Микроскопировать при увеличении $\times 100$ - $\times 1000$ на светооптическом уровне.

Время достижения устойчивых показателей теста 110 минут.

Тест-систему хранить как цитологический препарат.

Повторное использование изделия невозможно.

8.3 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.3.1 Оценку результатов проводит квалифицированный цитолог, имеющий опыт в проведении иммуноцитохимического анализа.

8.3.2 Положительное окрашивание с антителами – коричневый цвет

8.3.3 При отрицательном окрашивании – ядра клеток имеют сине-фиолетовый цвет, а цитоплазма от бледно-голубого до полного отсутствия окрашивания.

9 ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ ПО ВНУТРЕННЕМУ КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА

9.1 Изготовленные составные части и детали проверяются по результатам технического контроля на наличие приемки их ОТК изготовителя.

9.2 Внешний вид, форму тест-системы, соответствие рабочим чертежам, а также наличие дефектов проверяют визуально при освещении не ниже 200 лк путем сравнения с контрольным образцом, утвержденным производителем в установленном порядке.

При необходимости применяют лупу по ГОСТ 25706.

9.3 Контроль комплектности, маркировки и качества упаковки осуществляют визуально с расстояния не более 0,3 м.

9.4 Контроль размеров тест-системы проводят штангенциркулем по ГОСТ 166, линейкой по ГОСТ 427 или иным универсальным инструментом, обеспечивающим точность измерения в соответствии с чертежом на конкретное изделие.

9.5 Контроль массы тест-системы производится путем их взвешивания на весах по ГОСТ Р 53228 ценой деления не более 0,1 г.

Допустимое отклонение массы от номинального значения не должно превышать $\pm 3 \%$.

9.6 Испытания на допустимые внешние механические, температурные и климатические воздействия осуществляют по ГОСТ Р 50444.

9.7 Герметичность ячеек проверяют путём поочерёдного заполнения водой.

9.8 Количество допустимых анализов проверяется путём сличения нанесённой маркировки с информацией, указанной в инструкции изготовителя.

9.10 Качественные показатели проводимых исследований и их метрологическую прослеживаемость проверяют с помощью иммуноцитохимического исследования.

9.11 Для положительного и отрицательного контроля используются клеточные линии и лимфоциты человека с заведомо положительной и отрицательной экспрессией антигена, выявленной с помощью иммуноцитохимического исследования.

9.12 Исследуемые образцы должны тестироваться одновременно с положительным и отрицательным контрольными материалами и подвергаться идентичной процедуре пробоподготовки.

Если в какой-либо партии тест-систем не наблюдается положительного окрашивания заведомо положительных структур тканей, результаты использования данной партии считаются недостоверными.

9.13 В случае получения необъяснимых расхождений в результатах окрашивания контролей следует немедленно обратиться в представительство ООО «РУССЭЛЛ» по адресу, указанному в инструкции. Если результаты контроля качества не соответствуют установленным производителем нормативам, результаты исследования следует считать недостоверными.

10 УНИЧТОЖЕНИЕ

10.1 Тест-система, пришедшая в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежит уничтожению.

10.2 Изготовитель, поставщики, импортеры могут осуществлять уничтожение тест-системы, потерявшей свои потребительские свойства или с истекшим сроком годности, при использовании методов, согласованных с территориальными органами, ответственными за санитарно-эпидемиологическое благополучие населения.

10.3 Уничтожение тест-системы не требует специальных мер безопасности, и уничтожается как производственный или бытовой мусор, в соответствии с ГОСТ Р 51088, СП 2.1.7.1386 и СанПиН

2.1.7.2790 (класс Б); указания к работам по дезинфекции оборудования и помещений – по ГОСТ 42-21-2 и МУ 287-113.

11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВКИ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

11.1 Общие требования к транспортированию и хранению – по ГОСТ Р 51088.

Транспортирование тест-системы осуществляется при температуре от 4° С до 8 °С и относительной влажности 80 % в автомобилях-рефрижераторах или автомобилях с изотермическим кузовом, либо воздушным транспортом в контейнерах с использованием хладагентов в соответствии с правилами перевозки специальных грузов, действующими на данном виде транспорта, в условиях, исключающих действие агрессивных сред, прямых солнечных лучей и влаги.

11.2 При транспортировании, осуществлении погрузки и выгрузки тест-системы должны быть приняты меры, предохраняющие тару от механических повреждений, воздействия атмосферных осадков, горючих материалов и кислот.

При погрузочно-разгрузочных работах должны выполняться нормы ГОСТ 12.3.009.

Допускаются механические воздействия в течение 5 суток: вибрационные нагрузки в диапазоне частот 10 – 55 Гц, амплитуда перемещения 0,35 мм; ударные нагрузки – пиковое ударное ускорение ms^{-2} (g) 100 (10), длительность действия ударного ускорения 16 мс.

11.3 Формирование пакетов тарно-штучных грузов осуществляется по ГОСТ 24597, ГОСТ 26663, на поддонах по ГОСТ 9570.

11.4 Хранение тест-системы в течение всего срока годности должно осуществляться в упаковке предприятия-изготовителя в холодильных камерах и холодильниках при температуре от 4° С до 8 °С и относительной влажности 80% в условиях, исключающих действие агрессивных сред, влаги, в темном месте для исключения выцветания хромогена.

11.5 Тест-система, хранившаяся с нарушением регламентированного режима, использованию не подлежит.

11.6 Гарантийный срок хранения в упаковке – *12 месяцев* со дня изготовления

По истечении срока годности тест-система применению не подлежит.

12 ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА И ВЛИЯНИЕ ИЗВЕСТНЫХ ИНТЕРФЕРЕНТОВ

Информацию по интерферентам см. в разделе 3. «Технические характеристики»

Специфические ограничения

- Пользователи, которые отклоняются от рекомендованной процедуры пробоподготовки и проведения иммуноцитохимического окрашивания, принимают на себя всю ответственность за интерпретацию и валидацию результатов диагностики.

13. ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ.

13.1 Если полученное окрашивание положительного контрольного образца слабее ожидаемого, следует проверить положительные контроли других тест-систем, окрашенные во время того же исследования (при наличии), чтобы определить, является ли причиной первичное антитело и/или один из вторичных реагентов.

13.2 Если положительный контроль показал отрицательный результат, следует проверить положительные контроли других тест-систем, окрашенные во время того же исследования (при наличии), чтобы определить, является ли причиной первичное антитело и/или один из вторичных реагентов. Причиной может быть неправильная фиксация пробы. При фиксации проб следует придерживаться рекомендованной производителем процедуры.

14 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

13.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие качества тест-системы требованиям Технических условий при соблюдении правил использования, транспортирования и хранения.

13.2 Гарантийный срок хранения в упаковке – 12 месяцев со дня изготовления.

По истечении срока годности тест-системы применению не подлежат.

13.3 По вопросам, касающимся качества «Тест-система для иммуноцитохимического исследования белков тканей человека SER-1» по ТУ 21.20.23-003-25717294-2021 следует обращаться в компанию ООО «РУССЭЛЛ», по адресу: 603000, Нижегородская область, город Нижний Новгород, улица Минина, 5,13; тел. +7 (831) 4391658, e-mail: info@ruscell.ru

Характеристики и требования к контрольным образцам

**«Тест-система для иммуноцитохимического исследования белков тканей человека SER-1»
по ТУ 21.20.23-003-25717294-2021**

в исполнении:

**«Тест-система для иммуноцитохимического исследования белков тканей человека SER-1»
(определение белка EpCAM/BerEp4, («Тест-система SER-1»)**

Отрицательный контрольный материал:

Материал: Лимфоциты.

Срок хранения: 12 месяцев.

- Условия хранения: влажность не более 80%, температура от +2 до +8 °С. Избегать попадания прямых солнечных лучей.
- Каким методом взято/получено: метод градиентного центрифугирования крови человека. Используется 4 мл венозной крови, а в качестве градиента плотности раствор фикола (плотность 1.077). Условия центрифугирования 30 минут при 400g в горизонтальном роторе центрифуги. Полученную фракцию лимфоцитов отмывают фосфатным буфером (pH 7,2-7,4) и фиксируют раствором 95% этанола.
- Референс-метод: цитологическое исследование, иммуноцитохимия.
- среда для взятия материала: комнатная температура, стерильные условия, фиксация 95% этиловым спиртом.
- Возраст донора: 45 лет.
- Пол: мужской.
- Заболевание: не применимо.
- Характеризуется присутствием таких-то клеток: лимфоциты.
- HCV, HbS-Ag, RW, ВИЧ-отрицательно.

Антигенный статус: EpCAM(клон BerEp4) – отрицательно, CD45 – положительно.

Морфометрическая оценка: в пробирке присутствует более 3×10^3 клеток, буфер (спиртовой) 1 мл, размер клеток 6-18 мкм. Коэффициент ядро-цитоплазма равен 0,9. Клетки округлые. Ядро округлое или овальное. Число ядер не превышает число клеток.

Положительный контрольный материал:

- Материал: Клеточная линия MCF7.
- Срок хранения: 12 месяцев.
- Условия хранения: влажность не более 80%, температура от +2 до +8 °С. Избегать попадания прямых солнечных лучей.
- Каким методом взято/получено: метод культивации культуры.
- Референс-метод: цитологическое исследование, иммуноцитохимия.
- среда для взятия материала: комнатная температура, стерильные условия, фиксация 95% этиловым спиртом.

- Возраст: не применимо.
- Пол: не применимо.
- Заболевание: не применимо.
- Характеризуется присутствием таких-то клеток: клетки клеточной линии MCF7
- HCV, HbS-Ag, RW, ВИЧ-отрицательно.

Антигенный статус: ЕрСАМ (клон VerEr4) – положительно.

Морфометрическая оценка: в пробирке присутствует более 3×10^3 клеток, буфер (спиртовой) 1 мл, размер клеток 35-60 мкм. Коэффициент ядро-цитоплазма равен 0,75. Клетки округлые. Форма ядра округлая. Число ядер не превышает число клеток.

Прошито и скреплено печатью

С.В. Зиновьев (19) листа (ов)

Генеральный директор

ООО «РУССЭЛ»

С.В. Зиновьев

