

«УТВЕРЖДАЮ»



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Медицинского изделия для диагностики *in vitro*

«Набор реагентов для полуколичественного цитофлуориметрического определения уровня активации базофилов в цельной периферической крови человека «АллергоФлоу», по ТУ 21.20.23-723-98539446-2023»

ВВЕДЕНИЕ

Базофилы, или базофильные гранулоциты, наряду с тучными клетками, участвуют в формировании патохимической стадии реакции гиперчувствительности I типа (IgE-зависимой реакции). В отличие от тучных клеток базофилы локализуются в кровеносном русле, что позволяет использовать их для выявления аллерген-специфической сенсибилизации.

Базофилы экспрессируют на своей поверхности высокоаффинный IgE-рецептор (FcεRI). Попарное связывание двух локализованных рядом молекул IgE на поверхности базофилов и тучных клеток с двумя эпитопами молекулы аллергена вызывает активацию клетки [1-3]. Активированные клетки высвобождают содержимое гранул и, таким образом поддерживают течение аллергического процесса. Однако, наиболее ранним событием, предшествующим дегрануляции базофилов, является повышение экспрессии специфических клеточных маркеров, так называемых маркеров активации, одним из которых является рецептор CD203c [4].

Оценка уровня экспрессии CD203c у пациентов с клиническими признаками сенсибилизации позволяет выявить причинно-значимый аллерген в случае IgE-зависимого иммунного ответа.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. «Набор реагентов для полуколичественного цитофлуориметрического определения уровня активации базофилов в цельной периферической крови человека «АллергоФлоу», по ТУ 21.20.23-723-98539446-2023» предназначен для полуколичественного цитофлуориметрического определения уровня активации базофилов по интенсивности экспрессии поверхностного маркера базофилов CD203c в цельной периферической крови (содержащей литиевую соль гепарина в качестве антикоагулянта) человека с использованием проточного цитофлуориметра.

«Набор реагентов для полуколичественного цитофлуориметрического определения уровня активации базофилов в цельной периферической крови человека «АллергоФлоу», по ТУ

«АллергоФлоу»

21.20.23-723-98539446-2023» (далее по тексту – набор, набор «АллергоФлоу») валидирован для использования совместно с МИ «Реагент для специфической активации базофилов «Аллергены для проточной цитометрии», по ТУ 21.20.23-722-98539446-2023» (далее по тексту – «Аллергены для проточной цитометрии»).

Функциональное назначение набора «АллергоФлоу» – вспомогательное средство в диагностике гиперчувствительности I типа.

1.2. Показания к применению: выявление гиперчувствительности к исследуемым аллергенам.

1.3. Набор «АллергоФлоу» предназначен только для клинической лабораторной диагностики *in vitro*, для профессионального применения персоналом, имеющим квалификацию для выполнения диагностических исследований *in vitro* в результате специального образования и обучения. Исследования могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием (врач КЛД, биолог, медицинский технолог).

Исследования проводят в клиничко-диагностических лабораториях, областных, городских или районных, государственных или частных больницах и других ЛПУ.

1.4. Набор «АллергоФлоу» предназначен для обследования всех групп населения любого возраста без градации по демографическому или популяционному признаку.

1.5. Набор «АллергоФлоу» не имеет противопоказаний к применению.

1.6. Набор «АллергоФлоу» предназначен для однократного применения.

1.7. Набор «АллергоФлоу» не подлежит ремонту и обслуживанию.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «АллергоФлоу» реализован принцип базофильного теста (Basophil activation test) с использованием трехцветной панели моноклональных антител для проведения цитофлуориметрического анализа. «Коктейль» включает следующие моноклональные антитела к поверхностным клеточным антигенам человека: FITC anti-human CD294, APC anti-human CD3 и PE anti-human CD203c.

Для диагностики чувствительности к одному или нескольким аллергенам проводят инкубацию цельной периферической крови пациента с аллергенами из МИ «Аллергены для проточной цитометрии» (для каждого наименования – в индивидуальной пробирке), с неспецифическим активатором (Положительный контроль, далее по тексту – ПК) и без каких-либо активаторов (Отрицательный контроль, далее по тексту – ОК), одновременно с окрашиванием коктейлем моноклональных антител. Далее осуществляют лизис эритроцитов и подготавливают пробы к цитометрическому анализу.

В ходе цитофлуориметрического анализа осуществляется выбор целевой популяции базофильных гранулоцитов и оценка их активации. Основным специфичным маркером базофилов является CD294 (CRTH2) – молекула семейства рецепторов хемокинов, экспрессируется на базофилах, эозинофилах, Th2-клетках и активированных моноцитах. Последующая изоляция базофилов от эозинофилов осуществляется по параметру бокового светорассеяния SS (см. Рисунок 1, Гистограмма 2) и от Th2-лимфоцитов – с помощью лимфоцитарного маркера CD3 (см. Рисунок 1, Гистограмма 3). Активированные моноциты, в свою очередь, имеют более низкую плотность экспрессии CRTH2 (CD294dim), чем базофилы. Степень активации базофилов оценивается по уровню экспрессии маркера CD203c (ENPP-3) (белок, представляющий собой эктоэнзим –

«АллергоФлоу»

пирофосфатаза/фосфодиэстераза внеклеточных нуклеотидов). Маркер CD203c также является специфичным для базофилов, т.к. присутствует и на неактивированных клетках. Таким образом, фенотип базофилов можно описать как SSslowCD294brightCD3negCD203cpos (далее по тексту – базофилы).

Результатом исследования является индекс стимуляции (Stimulation Index, далее по тексту – SI), который показывает, во сколько раз уровень экспрессии маркера CD203c в пробе с аллергеном или в пробе с положительным контролем выше, чем в отрицательном контроле.

Корректная интерпретация результатов теста требует включения проб ОК и ПК в панель обследования каждого пациента.

Процедура анализа «АллергоФлоу» включает два этапа:

- Во время первой инкубации происходит взаимодействие моноклоналов периферической крови с неспецифическим активатором (ПК), а также осуществляется окрашивание моноклональными антителами «коктейля» набора «АллергоФлоу». На данном этапе используется активирующий буфер (Буфер для инкубации), содержащий ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , что необходимо для активации базофилов и экспрессии рецептора CD203c. Инкубация проводится на водяной бане при температуре $+37^\circ\text{C}$.

- На этапе второй инкубации осуществляют остановку активации базофилов с помощью Стоп-раствора, который содержит калиевую соль ЭДТА для связывания двухвалентных ионов из реакционной смеси, а также лизис эритроцитов с последующей отмывкой лейкоцитов и их фиксацией в Фиксирующем растворе.

2.2. Состав и варианты исполнения МИ

В состав набора «АллергоФлоу» входят следующие компоненты:

- Водно-солевой раствор, содержащий ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , маркирован «Буфер для инкубации», 1 флакон (7 мл) (Таблица 1);
- Моноклональные антитела к IgE человека в водно-солевом растворе, маркированы «Положительный контроль», 1 флакон (лиофилизат) (Таблица 1);
- Смесь моноклональных антител, меченных флуорохромами CD203c-PE/CD294-FITC/CD3-PE-CF@647T (далее по тексту – 647T), маркирована «ФМО-контроль-647T» или смесь моноклональных антител, меченных флуорохромами CD203c-PE/CD294-FITC/CD3-APC (далее по тексту – APC), маркирована «ФМО-контроль-APC» в зависимости от варианта исполнения, 0 или 1 пробирка (10 мкл) (Таблица 1)*;
- Смесь моноклональных антител, меченных флуорохромами 647T, маркирована «Коктейль антител 647T» или смесь моноклональных антител, меченных флуорохромами APC, маркирована «Коктейль антител APC» в зависимости от варианта исполнения, 1 пробирка (360 мкл) (Таблица 1)*;
- Водно-солевой раствор, содержащий ЭДТА, маркирован «Стоп-раствор», 1 флакон (7 мл) (Таблица 1);
- Концентрированный водно-солевой раствор хлорида аммония, маркирован «Лизирующий раствор (10X)», 1 флакон (12 мл) (Таблица 1);
- Водно-солевой раствор формальдегида, маркирован «Фиксирующий раствор», 1 флакон (50 мл) (Таблица 1);
- Инструкция по применению (может быть предоставлена потребителю на бумажном носителе и в форме электронного документа);
- Паспорт (может быть предоставлен потребителю на бумажном носителе и в форме электронного документа).

*Характеристики используемых клонов представлены в Таблице 2.

Внимание! При дробном использовании набора при каждой постановке, необходимо обязательно проводить оценку для отрицательного и положительного контролей (п.7.2.1.).

Примечание: в случае дробного применения набор может быть использован в течение 6 месяцев после вскрытия компонентов набора.

Таблица 1

Кат. номер		300-54	300-55	300-56	300-49
Название компонента	Внешний вид компонента	Стартовая комплектация №1	Стартовая комплектация №2	Базовая комплектация №1	Базовая комплектация №2
Буфер для инкубации	Прозрачная бесцветная жидкость	1 фл.(7 мл)	1 фл.(7 мл)	1 фл.(7 мл)	1 фл.(7 мл)
Положительный контроль	Лиюфилизат	1 фл.	1 фл.	1 фл.	1 фл.
ФМО-контроль-647Т	Прозрачная жидкость светло-розового цвета	1 пр. (10 мкл)	-	-	-
ФМО-контроль-APC	Прозрачная жидкость светло-розового цвета	-	1 пр. (10 мкл)	-	-
Коктейль антител 647Т	Прозрачная жидкость светло-розового цвета	1 пр. (360 мкл)	-	1 пр. (360 мкл)	-
Коктейль антител APC	Прозрачная жидкость светло-розового цвета	-	1 пр. (360 мкл)	-	1 пр. (360 мкл)
Стоп-раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	1 фл.(7 мл)	1 фл.(7 мл)	1 фл.(7 мл)	1 фл.(7 мл)
Лизирующий раствор (10X)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 фл.(12 мл)	1 фл.(12 мл)	1 фл.(12 мл)	1 фл.(12 мл)
Фиксирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	1 фл.(50 мл)	1 фл.(50 мл)	1 фл.(50 мл)	1 фл.(50 мл)
Инструкция по применению	-	1 шт.	1 шт.	1 шт.	1 шт.
Паспорт	-	1 шт.	1 шт.	1 шт.	1 шт.

Набор имеет четыре варианта исполнения:

Стартовая комплектация №1: на 100 определений, включает реагент для осуществления самостоятельной (или удаленной)¹ настройки протокола анализа на проточном цитофлуориметре с одним лазером;

Стартовая комплектация №2: на 100 определений, включает реагент для осуществления самостоятельной (или удаленной)¹ настройки протокола анализа на проточном цитофлуориметре с двумя лазерами;

Базовая комплектация №1: на 100 определений при проведении анализа на проточном цитофлуориметре с одним лазером;

¹ Процесс настройки и оптимизация протокола анализа для работы с коктейлем антител 647Т/APC может быть организован с привлечением сервисного сопровождения, за информацией обращайтесь к производителю МИ «АллергоФлоу» в ООО «Компания Алкор Био», телефон горячей линии 8-800-222-55-70, email support@alkorbio.ru.

«АллергоФлоу»

Базовая комплектация №2: на 100 определений при проведении анализа на проточном цитофлуориметре с двумя лазерами.

Количество контрольного материала (Положительный контроль), входящего в состав каждой модели МИ, рассчитано на проведение 50 определений.

Таблица 2

Характеристика	Специфичность антител					
	Стартовая и Базовая комплектации №1			Стартовая и Базовая комплектации №2		
	CRTH ₂ (CD294)	CD203c	CD3	CRTH ₂ (CD294)	CD203c	CD3
Клон	BM16	97A6	ОКТ3	BM16	97A6	ОКТ3
Изотип	IgG2a	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG1	IgG1
Происхождение	Крысиные	Мышиные	Мышиные	Крысиные	Мышиные	Мышиные
Конъюгация	Флуоресцентин изотиоцианат (FITC)	Фикоэритрин (PE)	Фикоэритрин-CF*647T (RPE-CF647T)	Флуоресцентин изотиоцианат (FITC)	Фикоэритрин (PE)	Аллофикоцианин (APC)
Флуоресцентный канал	FL1	FL2	FL4	FL1	FL2	FL6
Длина волны возбуждения	488 нм (синий-зеленый лазер)	488 нм (синий-зеленый лазер)	488 нм (синий-зеленый лазер)	488 нм (синий-зеленый лазер)	488 нм (синий-зеленый лазер)	638 нм (красный лазер)

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность

Определяется как способность набора достоверно детектировать уровень экспрессии маркера интереса.

Определение нижних пределов измерения набора «АллергоФлоу» проводилось в соответствии с модифицированным протоколом H62 CLSI².

Предел бланка (limit of blank, LoB) – максимальное число событий (количество базофилов), которое возможно зарегистрировать в нулевой пробе (при отсутствии аналита). LoB набора «АллергоФлоу» составляет 1.

Предел детекции (limit of detection, LoD) – минимальное число событий (количество базофилов), которое возможно детектировать в пределах значения нулевой пробы. LoD набора «АллергоФлоу» составляет 2.

3.2. Аналитическая специфичность

Определяется как способность набора обнаруживать необходимое и достаточное для анализа число базофилов в присутствии интерферирующих факторов.

Эндогенные интерференты

Повышение концентрации триглицеридов до 35 мг/мл не оказывает негативного влияния на результаты анализа при использовании набора «АллергоФлоу». Недопустимо использование образцов крови, подвергшихся гемолизу, или содержащих сгустки.

Экзогенные интерференты

Недопустимо использование проб пациентов, принимавших накануне сдачи крови лекарственные средства: глюкокортикостероиды системного назначения, азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин; цитостатики (ингибиторы тирозинкиназ) системного назначения (ибрутиниб); иммуностимулирующие средства (например, рекомбинантный IL-

² Clinical and Laboratory Standards Institute, Институт клинических и лабораторных стандартов.

2); радио- или химиотерапевтические препараты (включая период после применения химиотерапии, составляющий менее 6 недель).

3.3. Повторяемость и воспроизводимость

Коэффициент вариации интенсивности флуоресценции по маркеру CD203c (MFI CD203c) в одном и том же образце цельной периферической крови не превышает 25 %.

3.4. Ограничения теста

Для получения достоверного результата необходимо учитывать ряд ограничений:

1. Пациенты с подтвержденным диагнозом базопения не подлежат тестированию данным методом.
2. Проведение теста в период обострения аллергического заболевания может нести риск получения ложноотрицательного результата, т.к. у некоторых пациентов наблюдается высокий уровень спонтанной активации базофилов (ОК).
3. Интерпретация отрицательного результата у пациента, относящегося к группе рефрактерных индивидов (см. п.9.1 настоящей инструкции) и имеющего незначительный (SI (ПК) < 1,1) уровень активации в положительном контроле, может носить неоднозначный характер.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 и СанПиН 3.3686-21.

4.4. Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.

4.5. Перед началом работы ознакомиться с инструкцией и применять набор строго по назначению.

4.6. При работе с набором следует использовать спецодежду (медицинский халат или комбинезон, шапочку) и средства индивидуальной защиты (маску, защитные очки, одноразовые перчатки, разрешенные к применению на территории РФ).

4.7. **Внимание!** В состав компонентов МИ входят 0,05% соляная кислота, 0,05 % формальдегид и 0,05 % азид натрия, что является безопасным для человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. Избегайте попадания в глаза и на кожу, опасно при проглатывании. При попадании в глаза – промыть водой, при попадании на кожу – смыть большим количеством воды, при проглатывании – прополоскать рот водой и обратиться за медицинской помощью.

4.8. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.9. Для обработки посуды и оборудования рекомендуется использовать дезинфицирующие средства, изготовленные на основе третичных аминов, четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) или спиртов и разрешенные к применению на территории РФ. Использование дезинфицирующих средств на основе активного кислорода и хлора возможно лишь на предстерилизационном этапе, с последующей термической стерилизацией.

4.10. Внимание! Во время процедуры отмывки лейкоцитов (после лизиса эритроцитов) содержимое пробирок (супернатант) необходимо сбрасывать в контейнер с дезинфицирующим раствором.

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

4.12. Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы набора, используя дезинфицирующие средства в соответствии МУ 287-113.

4.13. Удалять неиспользованные реактивы набора в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

4.14. После использования все компоненты набора, образцы биологического материала, контрольные материалы, расходные материалы и другие реагенты, которые контактировали с образцами биологического материала во время обработки, хранения или анализа (в том числе: перчатки, наконечники и т.д.) должны собираться отдельно и подвергаться автоклавированию с последующей утилизацией в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21. Вместо автоклавирования отходы могут быть обеззаражены дезинфицирующим средством, после утилизированы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

4.15. Не использовать набор по истечении срока годности, при нарушении целостности первичной упаковки компонентов набора и/или несоответствии внешнего вида компонентов набора приведенному в настоящей инструкции описанию.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- МИ «Аллергены для проточной цитометрии» (производитель ООО «Компания Алкор Био», Россия);

- Проточный цитофлуориметр с одним твердотельным синим лазером (488нм) или двумя твердотельными лазерами: синим (488нм) и красным (638 нм)³;

- Встряхиватель медицинский вибрационный с неопреновой насадкой, 500–3000 об/мин;

- Центрифуга лабораторная, 2500 об/мин;

- Баня-термостат водяная⁴;

- Цитометрические полипропиленовые пробирки 12х75 мм³ с пробками;

- Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными одноразовыми наконечниками⁶ с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 2–10 мкл; на 5–50 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;

- Вода дистиллированная или очищенная денонизованная⁷;

- Морозильная камера;

³ Cytomics FC 500, Beckman Coulter Inc., США, PЗН 2018/6733 от 22.01.2018, NAVIOS Beckman Coulter, США, ФСЗ 2010/07319 от 07.05.2014, BD FACSCanto II, Becton Dickinson and Co., ФСЗ 2007/00950, с 09.09.2015.

⁴ Использование термостата не является альтернативным вариантом!

⁵ Повторное использование цитометрических пробирок не допускается.

⁶ Повторное использование наконечников не допускается. При внесении каждого образца крови, при внесении положительного контроля и аллергенов необходимо использовать новый наконечник.

⁷ В соответствии с ГОСТ Р 58144-2018 «Вода дистиллированная» необходимо периодически контролировать качество воды, используемой для приготовления растворов.

«АллергоФлоу»

- Холодильник;
- Пробирки полипропиленовые конические с крышкой объемом 50 мл;
- Дезинфицирующий раствор на основе третичных аминов, ЧАС или спиртов;
- Контейнер для дезинфекции;
- Отдельные халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки, разрешенные к применению на территории РФ.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

- 6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики.
- 6.2. Для проведения анализа рекомендуется использовать цельную периферическую кровь человека (с литиевой солью гепарина в качестве антикоагулянта).
- 6.3. Образцы крови допускается хранить при комнатной температуре +18...+25 °С (далее по тексту – КТ) не более 24 часов до проведения анализа, т.к. стабильность крови при более длительном хранении может носить индивидуальный характер.
- 6.4. Перед внесением в соответствующие пробирки, образцы крови необходимо аккуратно перемешать, плавно переворачивая пробирки.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

Все компоненты, входящие в состав набора «АллергоФлоу», перед проведением анализа должны быть доведены до КТ (выдержать в течение не менее 30 минут) и тщательно перемешаны.

7.1.1. Буфер для инкубации готов к использованию.

7.1.2. Положительный контроль

ПК требуется восстановить из лиофилизованного состояния. Для этого перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флакона и/или к крышке. Открыть флакон и положить крышку перевернутой на сухую поверхность. Внести во флакон с ПК 0,3 мл дистиллированной или очищенной деионизированной воды и закрыть крышкой. Выдержать флакон в течение 10 минут без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флакон, перемешать его содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут периодически перемешивать содержимое флакона.

Внимание! Аликвотировать восстановленный ПК по 50 – 100 мкл, оставить необходимое количество алиquot для проведения анализа, остальные – хранить при температуре -30...-18 °С до следующего использования.

7.1.3. Реагент ФМО-контроль-647Т готов к использованию.

7.1.4. Реагент ФМО-контроль-АРС готов к использованию.

7.1.5. Коктейль антител 647Т готов к использованию.

7.1.6. Коктейль антител АРС готов к использованию.

7.1.7. Стоп-раствор готов к использованию.

7.1.8. Лизирующий раствор

Непосредственно перед проведением анализа необходимое количество Лизирующего раствора (10X) развести дистиллированной водой или очищенной деионизированной водой в 10 раз.

Например, 1 мл Лизирующего раствора + 9 мл воды.

«АллергоФлоу»

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.9. Фиксирующий раствор готов к использованию.

Внимание! Лизирующий раствор не подлежит хранению после подготовки к использованию.

7.1.10. «Аллергены для проточной цитометрии»

Подготовить компоненты МИ в соответствии с инструкцией производителя.

7.1.11. Образцы крови пациентов

Перед анализом перемешать образцы, аккуратно переворачивая пробирки.

7.2. Настройка и оптимизация протокола анализа

Внимание! Данный раздел необходим для работы со Стартовой комплектацией (№1 или №2) набора «АллергоФлоу»¹.

7.2.1. Подготовить и промаркировать чистую пробирку «ФМО» (проба, необходимая для проведения настройки протокола). Последовательно внести в промаркированную пробирку:

- 25 мкл Буфера для инкубации;
- 3 мкл ФМО-контроля-647Т или ФМО-контроля-APC (в зависимости от используемой марки набора);

- 25 мкл образца цельной периферической крови.

7.2.2. Далее следовать п.п. 7.3.6. – 7.3.11. настоящей инструкции.

7.2.3. Провести цитометрический анализ.

7.2.4. Построить гистограммы (пример приведен на Рисунке 1).

7.2.4.1. Настроить напряжение на каналах FS и SS (Гистограмма 1, Рисунок 1) так, чтобы основные субпопуляции периферической крови располагались равномерно в поле гистограммы;

7.2.4.2. Проанализировать Гистограмму 3 (Рисунок 1): субпопуляции должны располагаться на одном уровне относительно горизонтальной и вертикальной оси;

7.2.4.3. Проанализировать Гистограмму 4a (Рисунок 1): в гейте S должны визуализироваться только негативные популяции CD203cneg/CD294neg и CD203cneg/CD294pos, локализованные на одном уровне в области первой декады по шкале интенсивности флуоресценции FL2.

7.3. Постановка анализа

На странице 16 приведена схема проведения анализа.

7.3.1. Подготовить и промаркировать необходимое количество чистых пробирок. Пробирки промаркировать следующим образом:

№ 1 – ОК – Отрицательный контроль для определения уровня спонтанной активации базофилов;

№ 2 – ПК – Положительный контроль для оценки активации базофилов при неспецифической стимуляции;

№ 3...n – «Название аллергена» – пробы для проведения стимуляции базофилов аллергенами из МИ «Аллергены для проточной цитометрии».

7.3.2. Внести Буфер для инкубации в пробирку №1 – 25 мкл, в оставшиеся – по 20 мкл.

7.3.3. В пробирку №2 внести 5 мкл Положительного контроля, в оставшиеся – по 5 мкл раствора соответствующего аллергена (-ов).

7.3.4. Внести в каждую пробирку по 3 мкл Коктейля антител (Коктейль антител 647Т или Коктейль антител APC, в зависимости от используемого варианта исполнения набора).

7.3.5. Во все пробирки внести по 25 мкл анализируемого образца крови.

Примечание: время внесения образцов не должно превышать 10 минут.

7.3.6. Инкубировать пробы в течение 15 минут в термостатируемой водяной бане при температуре +37 °С.

7.3.7. По окончании инкубации во все пробирки внести по 50 мкл Стоп-раствора.

7.3.8. Добавить во все пробирки по 1,0 мл Лизирующего раствора.

7.3.9. Инкубировать в темноте при КТ в течение 10 минут.

7.3.10. Центрифугировать пробирки в течение 5 минут при 2100 об/мин⁸ (500 x g). В контейнер с дезинфицирующим раствором удалить декантированием надосадочную жидкость из пробирок.

7.3.11. Внести во все пробирки по 450 – 650 мкл⁹ Фиксирующего раствора и аккуратно ресуспендировать осадок на вортексе.

Примечание: если невозможно провести цитометрический анализ подготовленных проб непосредственно после выполнения п. 7.3.11., то следует иметь в виду, что цитометрические пробы стабильны в течение 3-х часов в темноте при КТ и в течение 24 часов в темноте при температуре +2... +8 °С.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Провести анализ на проточном цитометре, используя принцип гейтирования, на Рисунке 1 представлен возможный вариант визуализации результата.

8.2. В каждой пробе необходимо анализировать не менее 300 базофилов. При проведении анализа проб на проточном цитометре регистрируют значения интенсивности флуоресценции (MFI) по маркеру CD203c (Рисунок 1, Гистограмма 5).

8.3. Критерии достоверности анализа

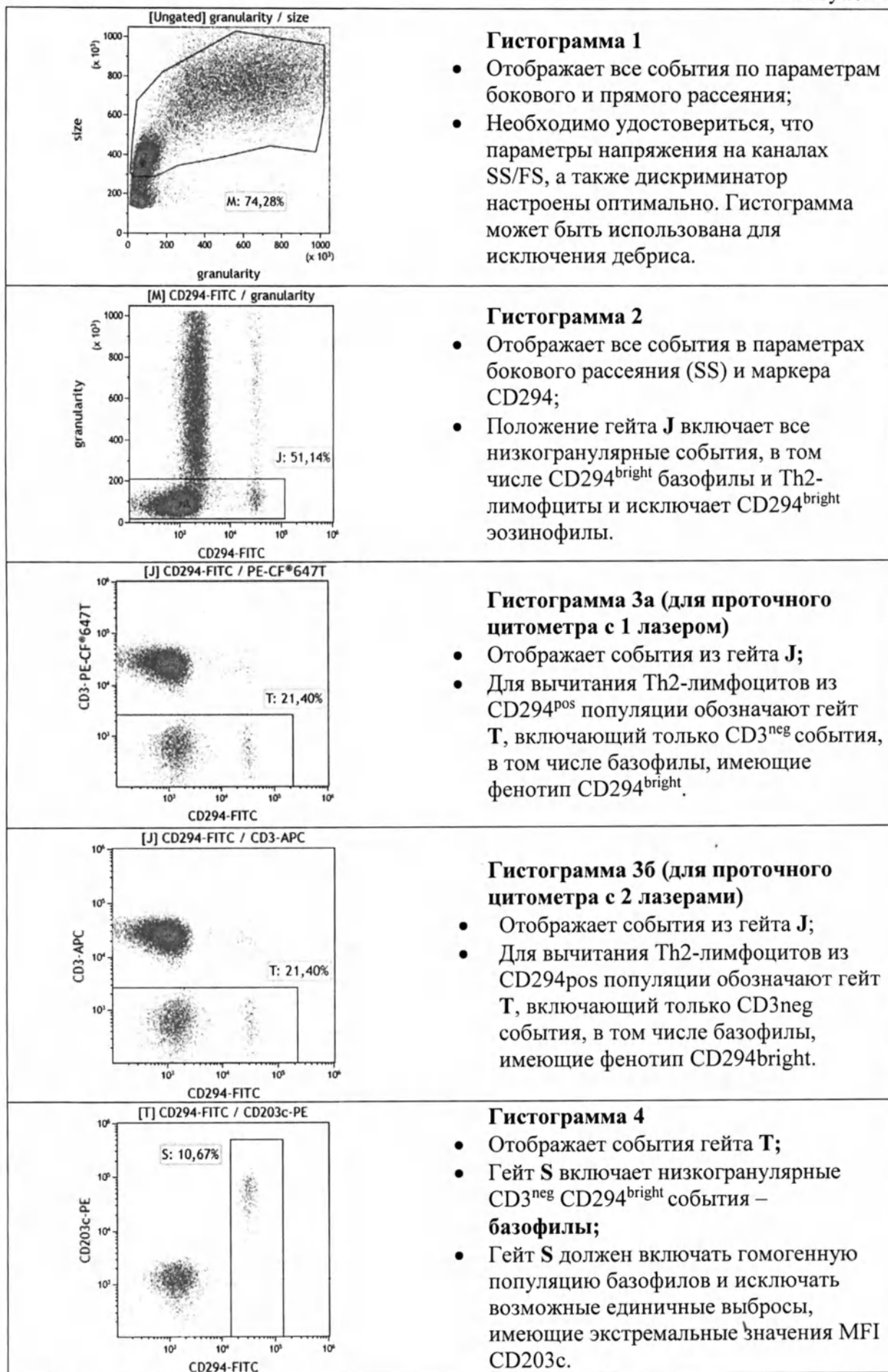
- Визуализация клеточных популяций на гистограммах должна быть четкой и типичной (при условии корректной настройки базовых конфигураций прибора);
- Индекс стимуляции в положительном контроле должен быть не менее 1,1;
- Результирующий гейт S включает гомогенную популяцию базофилов (SSlow CD294pos CD3neg CD203c pos) и исключает единичные экстремальные выбросы;
- Результирующий гейт S включает не менее 300 базофилов (минимально допустимое количество базофилов – 150).

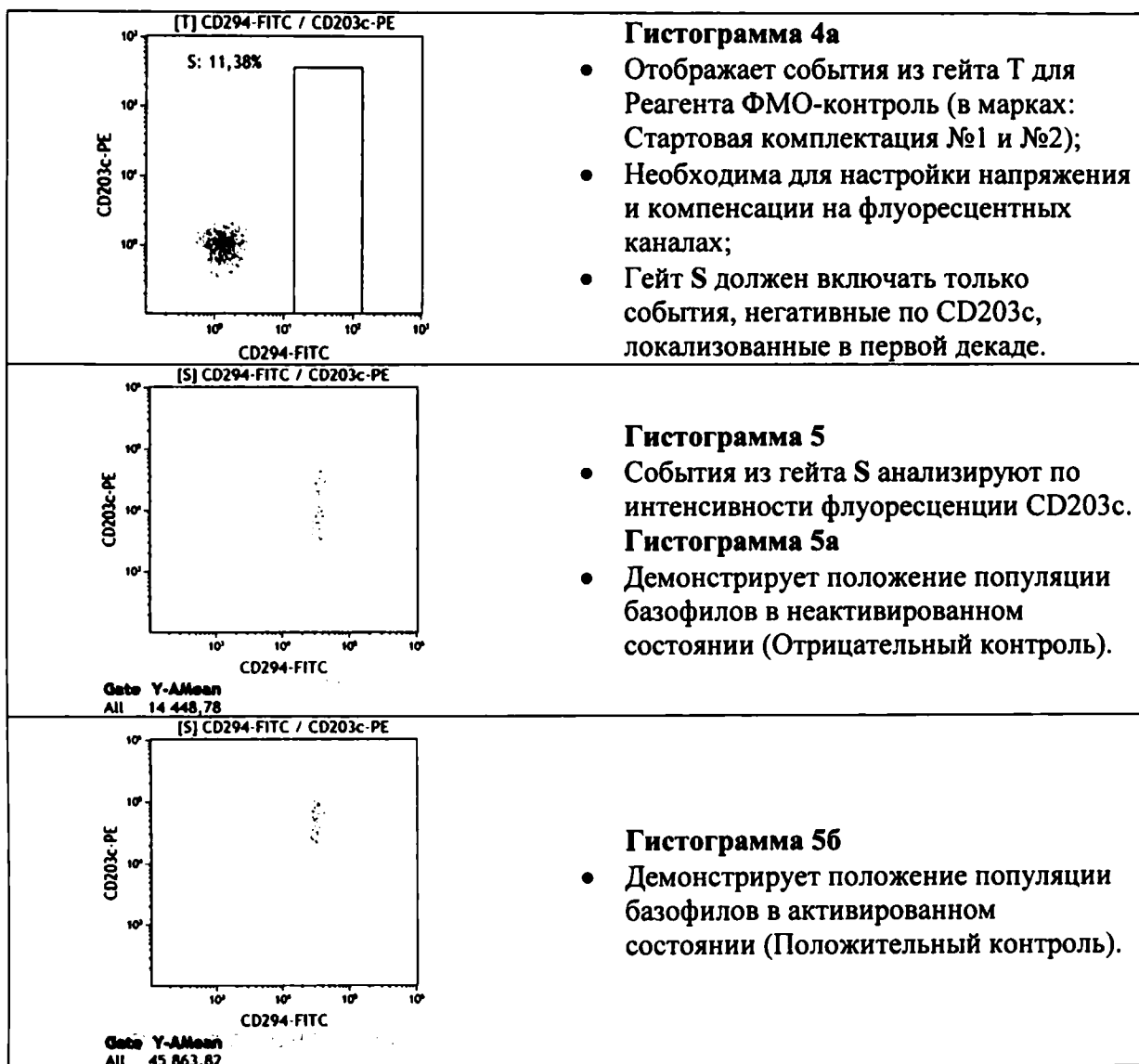
8.4. Результаты анализа не подлежат учету, если:

- расположение клеточных субпопуляций на гистограммах 1 и 2 не соответствует типичной картине;
- результирующий гейт S включает менее 150 базофилов;
- получены отрицательные результаты в пробах с аллергенами на фоне значения SI в ПК менее 1,1.

⁸ Количество об/мин зависит от радиуса ротора используемой центрифуги.

⁹ В зависимости от технических особенностей проточного цитофлуориметра.





9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результатом проведения анализа является **Индекс стимуляции (SI)** для ПК и проб с аллергенами, который рассчитывается по формуле:

$$SI = \frac{MFI(ПК / Аллерген)}{MFI(OK)},$$

где MFI (ПК или аллерген) – среднее значение интенсивности флуоресценции CD203с в ПК или в пробе с аллергеном;

MFI (OK) – среднее арифметическое значение интенсивности флуоресценции CD203с в ОК.

Принцип интерпретации результата анализа отображен в блок-схеме в Приложении 2 (стр. 17).

9.1. Оценка результатов в Положительном контроле

Индекс стимуляции в ПК должен быть не менее 1,1. В случае отсутствия результатов по ПК или, если значение SI в ПК меньше 1,1, то отрицательный результат в пробе с аллергеном можно расценивать только как **ложноотрицательный**.

Подобный результат может быть получен в случае, если:

1. Пациент относится к группе так называемых рефрактерных индивидов, не

«АллергоФлоу»

отвечающих на IgE-опосредованную активацию базофилов (приблизительно 5 – 10 % индивидов). Для таких пациентов данный вид исследования не может быть применен как диагностический.

2. У пациента в момент обследования наблюдается высокий уровень спонтанной активации базофилов (в ОК). Рекомендуется произвести повторное взятие крови и анализ у данного пациента вне периода обострения, соблюдая технику взятия и транспортирования образца.

9.2. Если индекс стимуляции в ПК более 1,1, следует рассчитать SI в пробах с аллергенами по формуле 1.

9.3. Интерпретация результатов в пробах с аллергенами

Значение SI в пробах с аллергенами оценивается относительно порогового значения SI, указанного на этикетке и в паспорте аллергена. При SI равном или превышающем указанное значение, делают вывод о наличии у пациента сенсibilизации к данному аллергену, при меньших значениях SI – об отсутствии сенсibilизации.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Хранение наборов должно проводиться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °C в течение всего срока годности в холодильных камерах или в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим.

10.2. Срок годности набора – 12 месяцев от даты производства.

10.3. Наборы с истекшим сроком годности применению не подлежат.

10.4. При дробном использовании компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- буфер для инкубации, коктейли антител, стоп-раствор, лизирующий раствор (10X) и фиксирующий раствор хранить плотно закрытыми при температуре +2...+8 °C в течение 6 месяцев (в пределах срока годности набора);

- восстановленный положительный контроль, аликвотированный в дозах однократного применения, хранить при температуре -30...-18 °C в течение 6 месяцев (в пределах срока годности набора);

- лизирующий раствор не подлежит хранению после подготовки к использованию;

- ФМО-контроли предназначены для однократной настройки протокола и после вскрытия хранению не подлежат.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов разных серий.

10.6. Запрещается использовать любые компоненты из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. Таблица расхода реагентов:

Количество пациентов	Буфер для инкубации, мл	Стоп-раствор, мл	Лизирующий раствор (10X), мл	Вода очищенная, мл	Фиксирующий раствор, мл	Положительный контроль, мкл	Коктейль антител, мкл	Аллерген, мкл
1	0,065	0,150	0,3	2,7	1,35	5	9	5
2	0,130	0,300	0,6	5,4	2,70	10	18	10
3	0,195	0,450	0,9	8,1	4,05	15	27	15
4	0,260	0,600	1,2	10,8	5,40	20	36	20

5	0,325	0,750	1,5	13,5	6,75	25	45	25
6	0,390	0,900	1,8	16,2	8,10	30	54	30
7	0,455	1,050	2,1	18,9	9,45	35	63	35
8	0,520	1,200	2,4	21,6	10,80	40	72	40
9	0,585	1,350	2,7	24,3	12,15	45	81	45
10	0,650	1,500	3	27	13,50	50	90	50
11	0,715	1,650	3,3	29,7	14,85	55	99	55
12	0,780	1,800	3,6	32,4	16,20	60	108	60
13	0,845	1,950	3,9	35,1	17,55	65	117	65
14	0,910	2,100	4,2	37,8	18,90	70	126	70
15	0,975	2,250	4,5	40,5	20,25	75	135	75
16	1,040	2,400	4,8	43,2	21,60	80	144	80
17	1,105	2,550	5,1	45,9	22,95	85	153	85
18	1,170	2,700	5,4	48,6	24,30	90	162	90
19	1,235	2,850	5,7	51,3	25,65	95	171	95
20	1,300	3,000	6	54	27,00	100	180	100
21	1,365	3,150	6,3	56,7	28,35	105	189	105
22	1,430	3,300	6,6	59,4	29,70	110	198	110
23	1,495	3,450	6,9	62,1	31,05	115	207	115
24	1,560	3,600	7,2	64,8	32,40	120	216	120
25	1,625	3,750	7,5	67,5	33,75	125	225	125
26	1,690	3,900	7,8	70,2	35,10	130	234	130
27	1,755	4,050	8,1	72,9	36,45	135	243	135
28	1,820	4,200	8,4	75,6	37,80	140	252	140
29	1,885	4,350	8,7	78,3	39,15	145	261	145
30	1,950	4,500	9	81	40,50	150	270	150

11. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

11.1. Транспортирование наборов следует производить всеми видами крытого транспорта при температуре +2...+8 °С.

11.2. Транспортирование должно производиться в емкостях или при помощи холодильных установок, обеспечивающих регламентированный температурный режим.

11.3. Допускается транспортирование наборов при температуре до + 25 °С не более 15 суток, в том числе при температуре + 37 °С не более 1 суток.

11.4. Наборы, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

12. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

12.1. При использовании набора «АллергоФлоу» образуются отходы классов А и Б, которые утилизируются в соответствии с СанПиНом 2.1.3684-21 и МУ 287-113.

12.2. Азид натрия, входящий в состав компонентов МИ, может реагировать с медными, свинцовыми трубами. При утилизации следует смывать растворы большим количеством воды во избежание накопления азидов.

13. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам качества МИ «Набор реагентов для полуколичественного цитофлуориметрического определения уровня активации базофилов в цельной периферической крови человека «АллергоФлоу», по ТУ 21.20.23-723-98539446-2023» обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный проспект, д. 40, лит. А, тел/факс: 8(812) 677-8779.

Бесплатный телефон горячей линии по России: 8-800-222-55-70, email support@alkorbio.ru.

14. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Гарантийный срок хранения набора «АллергоФлоу» – 12 месяцев от даты производства.

15. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА ЭТИКЕТКАХ

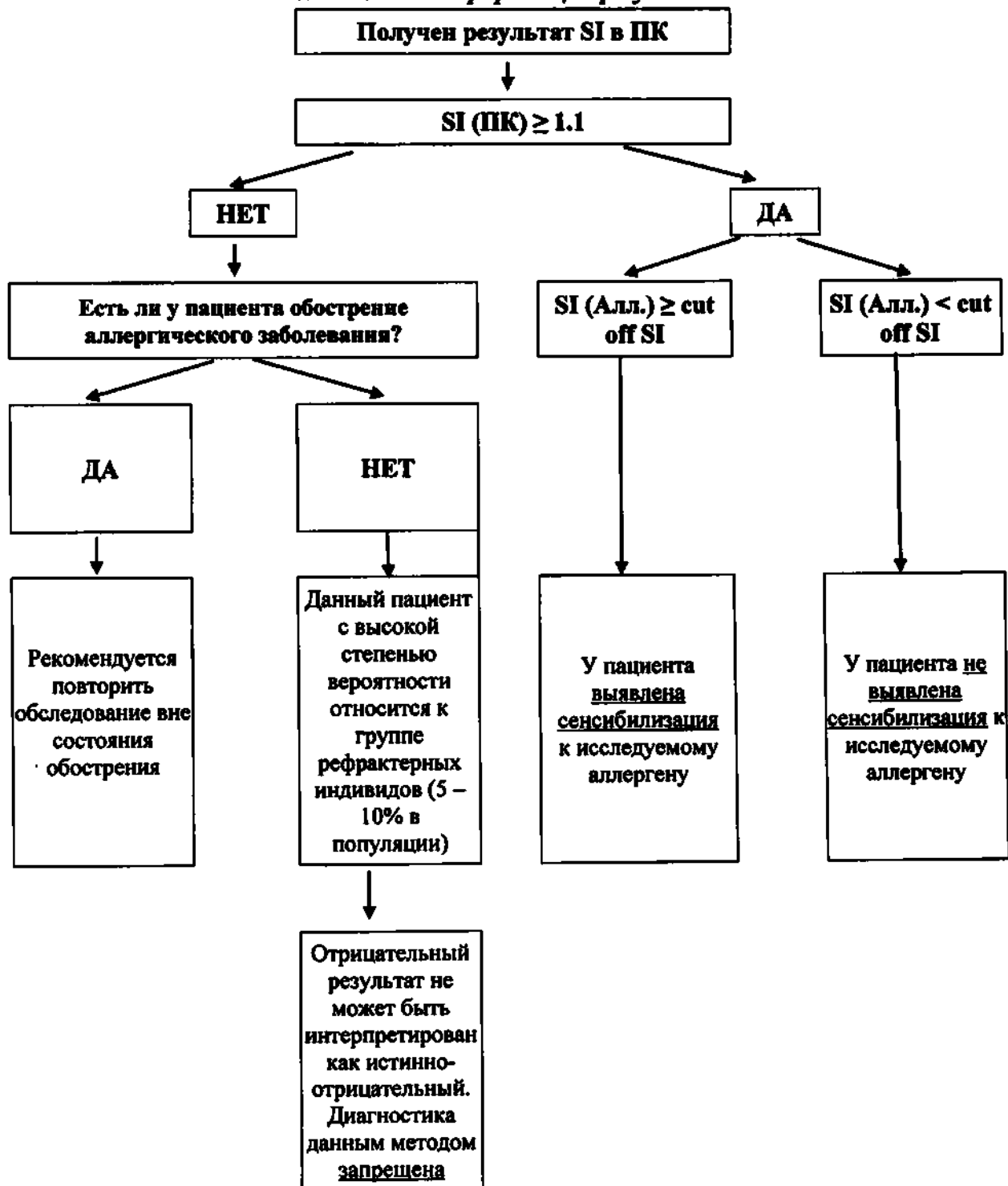
	Медицинское изделие для <i>in vitro</i> диагностики		Содержимого достаточно для проведения <n> тестов
	Номер по каталогу		Не допускать воздействия влаги
	Код партии (номер серии)		Использовать до
	Изготовитель		Температурный диапазон
	Дата изготовления		Биологические риски
	Обратитесь к инструкции по применению		Осторожно
	Верх		

Инструкция разработана в соответствии с ТУ 21.20.23-723-98539446-2023.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Стадия (операция)	Реагенты	Расход реагента на пробу, мкл			Температура	Время	Примечания
		ОК	ПК	Аллерген			
Внесение реагентов	Буфер для инкубации	25	20	20	КТ	Время внесения образцов крови должно составлять не более 10 мин.	-
	Положительный контроль	-	5	-			
	Аллерген	-	-	5			
	Коктейль антител	3	3	3			Необходимо тщательно перемешать перед внесением
	Образец крови	25	25	25			Аккуратно перемешать перед внесением
Инкубация 1	-				+37 °C	15 мин.	Термостатируемая водяная баня
Внесение реагентов	Стоп-раствор	50	50	50	КТ	-	
	Лизирующий раствор	1000	1000	1000	КТ	-	1-кратный Лизирующий раствор (1 мл Лизирующего раствора + 9 мл H ₂ O), КТ
Инкубация 2					КТ	10 мин.	в темноте
Отмывка лейкоцитов	-	-			КТ	5 мин.	Центрифугировать при 500 об/мин и удалить надосадочную жидкость
	Фиксирующий раствор	450 – 650	450 – 650	450 – 650	КТ	-	В зависимости от технических особенностей проточного цитометра
Регистрация результатов	-				КТ	В течение 3-х часов при КТ после пробоподготовки	Проточный цитофлуориметр (лазер 488нм, 638нм); Хранить пробы в темноте
Обработка результатов	-				-	-	Калькулятор

Блок-схема интерпретации результата



Список литературы

1. Boumiza R., Debard A.L., Monneret G et al. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. Clin. Mol. Allergy, 2005, v.3, p.9;
2. Ebo GD, MD, Chris H. Bridts, M., et al. Principles, potential, and limitations of ex vivo basophil activation by flow cytometry in allergology: A narrative review. J Allergy Clin. Immunol, 2021, 147(4):1143-1153;
3. Santos, AF, Hans-Jürgen T. Basophil activation test: Mechanisms and considerations for use in clinical trials and clinical practice. Allergy. 2021, 76:2420–2432;
4. Buhning H.-J. et al. The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis. Int Arch Allergy Immunol, 2004, 133: 317-329.

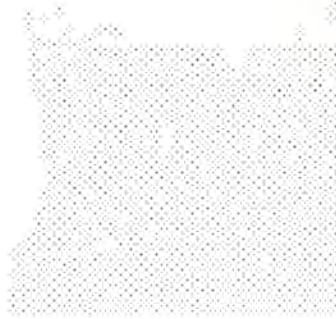
Прошито, пронумеровано, скреплено печатью

18 (подпись) лист 8

Генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био»

Д.Е. Полинцев



П А С П О Р Т № E004

Набор реагентов для полуколичественного цитофлуориметрического определения уровня активации базофилов в цельной периферической крови человека «АллергоФлоу», по ТУ 21.20.23-723-98539446-2023

Стартовая комплектация №1

Кат. № 300-54 Серия № E004 Формирование № 1 Количество 30 шт.

Наименование реагента	Внешний вид и форма выпуска	Комплекта-ция	Серия реа-гента	Соответствие контро-лируемого параметра
Состав набора				
Буфер для инкубации	прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию	1 фл. (7 мл)	004	соответствует
Положительный контроль	лиофилизат	1 фл.	004	соответствует
ФМО-контроль-647Т	прозрачная жидкость светло-розового цвета, готов к использованию	1 пр. (10 мкл)	004	соответствует
Коктейль антител 647Т	прозрачная жидкость светло-розового цвета, готов к использованию	1 пр. (360 мкл)	004	соответствует
Стоп-раствор	прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию	1 фл. (7 мл)	004	соответствует
Лизирующий раствор (10X)	прозрачная бесцветная жидкость, 10-ти кратный	1 фл. (12 мл)	004	соответствует
Фиксирующий раствор	прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию	1 фл. (50 мл)	004	соответствует
Инструкция по применению	-	1 шт.	-	-
Паспорт	-	1 шт.	-	-
Параметры контроля качества				
Наименование контролируемого параметра	Норма		Соответствие контролируемого параметра	
Визуальная оценка расположения лейкоцитарных субпопуляций	Типичное расположение трех клеточных популяций на гистограмме FS/SS; типичное расположение эозинофилов		соответствует	
SI для ПК, не менее	1,1		соответствует	
Аналитический сигнал ФМО, число событий, не более	1		соответствует	
Упаковка и маркировка	Полиэтиленовые флаконы 20 мл и 50 мл (с завинчивающимися крышками), стеклянный флакон с завинчивающейся крышкой, пробирки полипропиленовые светозащитные коричневого цвета с основанием (с завинчивающейся крышкой) 1,5 мл, этикетки из ленты клеевой на бумажной основе		соответствует	

Дата изготовления набора «23» августа 2023 г.

Срок годности набора до «23» августа 2024 г.

Условия хранения +2...+8 °С.

Условия транспортирования +2...+8 °С.

Допускается транспортирование при температуре до + 25 °С не более 15 суток,
в том числе при температуре + 37 °С не более 1 суток.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*

Для профессионального применения

Набор соответствует

ТУ 21.20.23-723-98539446-2023

РУ _____

Выполнил: Афанасьева Н.М.



Проверил: Корниш Л.А.

ООО «Компания Алкор Био»
г. Санкт-Петербург, Железнодорожный пр., д. 40, лит. А
Телефон/факс: (812) 677-87-79

П А С П О Р Т № E004

Набор реагентов для полуколичественного цитофлуориметрического определения уровня активации базофилов в цельной периферической крови человека «АллергоФлоу», по ТУ 21.20.23-723-98539446-2023

Стартовая комплектация №2

Кат. № 300-55 Серия № E004 Формирование № 1 Количество 30 шт.

Наименование реагента	Внешний вид и форма выпуска	Комплекта-ция	Серия реа-гента	Соответствие контро-лируемого параметра
Состав набора				
Буфер для инкубации	прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию	1 фл. (7 мл)	004	соответствует
Положительный контроль	лиофилизат	1 фл.	004	соответствует
ФМО-контроль-АРС	прозрачная жидкость светло-розового цвета, готов к использованию	1 пр. (10 мкл)	004	соответствует
Коктейль антител АРС	прозрачная жидкость светло-розового цвета, готов к использованию	1 пр. (360 мкл)	004	соответствует
Стоп-раствор	прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию	1 фл. (7 мл)	004	соответствует
Лизирующий раствор (10X)	прозрачная бесцветная жидкость, 10-ти кратный	1 фл. (12 мл)	004	соответствует
Фиксирующий раствор	прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию	1 фл. (50 мл)	004	соответствует
Инструкция по применению	-	1 шт.	-	-
Паспорт	-	1 шт.	-	-
Параметры контроля качества				
Наименование контролируемого параметра	Норма	Соответствие контролируемого параметра		
Визуальная оценка расположения лейкоцитарных субпопуляций	Типичное расположение трех клеточных популяций на гистограмме FS/SS; типичное расположение эозинофилов	соответствует		
SI для ПК, не менее	1,1	соответствует		
Аналитический сигнал ФМО, число событий, не более	1	соответствует		
Упаковка и маркировка	Полиэтиленовые флаконы 20 мл и 50 мл (с завинчивающимися крышками), стеклянный флакон с завинчивающейся крышкой, пробирки полипропиленовые светозащитные коричневого цвета с основанием (с завинчивающейся крышкой) 1,5 мл, этикетки из ленты клеевой на бумажной основе	соответствует		



Дата изготовления набора «23» августа 2023 г.

Срок годности набора до «23» августа 2024 г.

Условия хранения +2...+8 °C.

Условия транспортирования +2...+8 °C.

Допускается транспортирование при температуре до + 25 °C не более 15 суток,
в том числе при температуре + 37 °C не более 1 суток.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*

Для профессионального применения

Набор соответствует

ТУ 21.20.23-723-98539446-2023

РУ _____

Выполнил: Афанасьева Н.М.



П А С П О Р Т № E004

**Набор реагентов для полуколичественного цитофлуориметрического
ределения уровня активации базофилов в цельной периферической крови
человека «АллергоФлоу», по ТУ 21.20.23-723-98539446-2023**

Базовая комплектация №1

Кат. № 300-56 Серия № E004 Формирование № 1 Количество 30 шт.

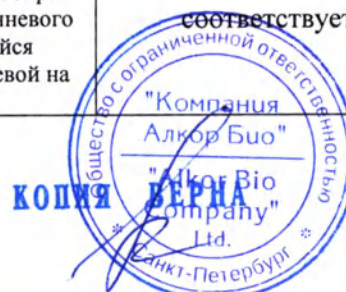
Наименование реагента	Внешний вид и форма выпуска	Комплекта- ция	Серия реа- гента	Соответствие контро- лируемого параметра
--------------------------	-----------------------------	-------------------	------------------------	---

Состав набора

Буфер для инкубации	прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию	1 фл. (7 мл)	004	соответствует
Положительный контроль	лиофилизат	1 фл.	004	соответствует
Коктейль антител 647Г	прозрачная жидкость светло-розового цвета, готов к использованию	1 пр. (360 мкл)	004	соответствует
Стоп-раствор	прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию	1 фл. (7 мл)	004	соответствует
Лизирующий раствор (10X)	прозрачная бесцветная жидкость, 10-ти кратный	1 фл. (12 мл)	004	соответствует
Фиксирующий раствор	прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию	1 фл. (50 мл)	004	соответствует
Инструкция по применению	-	1 шт.	-	-
Паспорт	-	1 шт.	-	-

Параметры контроля качества

Наименование контролируемого параметра	Норма	Соответствие контролируемого параметра
Визуальная оценка расположения лейкоцитарных субпопуляций	Типичное расположение трех клеточных популяций на гистограмме FS/SS; типичное расположение эозинофилов	соответствует
SI для ПК, не менее	1,1	соответствует
Аналитический сигнал FMO, число событий, не более	1	соответствует
Упаковка и маркировка	Полиэтиленовые флаконы 20 мл и 50 мл (с завинчивающимися крышками), стеклянный флакон с завинчивающейся крышкой, пробирки полипропиленовые светозащитные коричневого цвета с основанием (с завинчивающейся крышкой) 1,5 мл, этикетки из ленты клеевой на бумажной основе	соответствует



Дата изготовления набора «23» августа 2023 г.

Срок годности набора до «23» августа 2024 г.

Условия хранения +2...+8 °C.

Условия транспортирования +2...+8 °C.

Допускается транспортирование при температуре до + 25 °C не более 15 суток,
в том числе при температуре + 37 °C не более 1 суток.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*

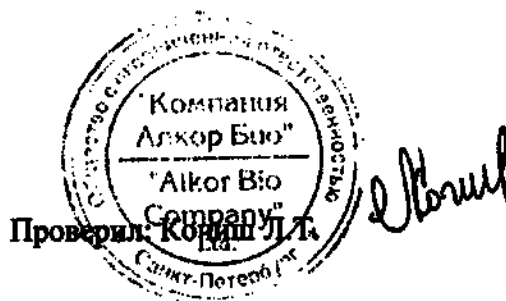
Для профессионального применения

Набор соответствует

ТУ 21.20.23-723-98539446-2023

РУ _____

Выполнил: Афанасьева Н.М.



ООО «Компания Алкор Био»
г. Санкт-Петербург, Железнодорожный пр., д. 40, лит. А
Телефон/факс: (812) 677-87-79

П А С П О Р Т № E004

Набор реагентов для полуколичественного цитофлуориметрического определения уровня активации базофилов в цельной периферической крови человека «АллергоФлоу», по ТУ 21.20.23-723-98539446-2023

Базовая комплектация №2

Кат. № 300-49 Серия № E004 Формирование № 1 Количество 30 шт.

Наименование реагента	Внешний вид и форма выпуска	Комплекта-ция	Серия реа-гента	Соответствие контро-лируемого параметра
Состав набора				
Буфер для инкубации	прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию	1 фл. (7 мл)	004	соответствует
Положительный контроль	лиофилизат	1 фл.	004	соответствует
Коктейль антител APC	прозрачная жидкость светло-розового цвета, готов к использованию	1 пр. (360 мкл)	004	соответствует
Стоп-раствор	прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию	1 фл. (7 мл)	004	соответствует
Лизирующий раствор (10X)	прозрачная бесцветная жидкость, 10-ти кратный	1 фл. (12 мл)	004	соответствует
Фиксирующий раствор	прозрачная бесцветная жидкость, готов к использованию	1 фл. (50 мл)	004	соответствует
Инструкция по применению	-	1 шт.	-	-
Паспорт	-	1 шт.	-	-
Параметры контроля качества				
Наименование контролируемого параметра	Норма	Соответствие контролируемого параметра		
Визуальная оценка расположения лейкоцитарных субпопуляций	Типичное расположение трех клеточных популяций на гистограмме FS/SS; типичное расположение эозинофилов	соответствует		
SI для ПК, не менее	1,1	соответствует		
Аналитический сигнал FMO, число событий, не более	1	соответствует		
Упаковка и маркировка	Полиэтиленовые флаконы 20 мл и 50 мл (с завинчивающимися крышками), стеклянный флакон с завинчивающейся крышкой, пробирки полипропиленовые светозащитные коричневого цвета с основанием (с завинчивающейся крышкой) 1,5 мл, этикетки из ленты клеевой на бумажной основе	соответствует		



Дата изготовления набора «23» августа 2023 г.

Срок годности набора до «23» августа 2024 г.

Условия хранения +2...+8 °С.

Условия транспортирования +2...+8 °С.

Допускается транспортирование при температуре до + 25 °С не более 15 суток,
в том числе при температуре + 37 °С не более 1 суток.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*

Для профессионального применения

Набор соответствует

ТУ 21.20.23-723-98539446-2023

РУ _____

Выполнил: Афанасьева Н.М.



Проверил: Кочиш Л.Т.

Прошито, пронумеровано, скреплено печатью

8 (*Восемь*) лист *20*

Генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био»

Д.И. Полинцев

