

ОКПД2 21.20.23.110

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

ООО «РУССЭЛЛ»

_____/С. В. Зиновьев/

« 21 » января 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

***Набор для микрофлюидной селективной сорбции циркулирующих
опухолевых клеток и опухоль-ассоциированных макрофагов.***

по ТУ 21.20.23–003–48327621–2021

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор предназначен для качественного выявления циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) и опухоль-ассоциированных макрофагов (САМЛ) и их цитологического исследования. Анализируемым биологическим материалом являются образцы цельной периферической крови, полученные путем пункции локтевой вены.

Используется для проведения исследований *in vitro* в клиничко-диагностических лабораториях, лечебно-профилактических и учебных учреждениях, а также в научно-исследовательской практике.

1.2. ОПИСАНИЕ ЦЕЛЕВЫХ АНАЛИТОВ

Циркулирующими опухолевыми клетками (ЦОК) называют клетки, отделившиеся от основной массы солидной опухоли и находящиеся в периферической крови¹. Циркулирующие клетки опухоли и в особенности их конгломераты (эмболы) являются основной причиной образования метастазов у опухолей с гематогенным механизмом метастазирования². В последнее время выделение и исследование циркулирующих клеток опухоли все чаще используется для диагностики, контроля прогресса и хода лечения онкологических заболеваний. В целом показано, что высокое содержание ЦОК коррелирует с высокой опухолевой нагрузкой, агрессивностью и поздней стадией развития заболевания, а также с краткой безрецидивной выживаемостью³.

В периферической крови онкологических пациентов обнаружены моноцитарные клетки с фенотипом тканевых макрофагов, которые получили название ассоциированных с раком макрофагоподобных клеток (circulation cancer associated macrophage-like cells, САМЛs)⁴. Полагают, что данная популяция появляется в результате выхода макрофагов из опухоли в кровь подобно циркулирующим опухолевым клеткам. САМЛs обнаружены исключительно у пациентов со злокачественными новообразованиями, что открывает перспективу их использования в качестве маркера диагностики и мониторинга течения заболевания⁵. К опухоль-ассоциированным макрофагам относят макрофаги размером более 50 мкм^{6,7}.

Ссылки:

1. Zhu Z. et al. Progress and challenges of sequencing and analyzing circulating tumor cells //Cell biology and toxicology. – 2018. – Т. 34. – №. 5. – С. 405-415.

2. Cabel L. et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility //International journal of clinical oncology. – 2017. – Т. 22. – №. 3. – С. 421-430.

3. Hao S. J. et al. Size-based separation methods of circulating tumor cells //Advanced drug delivery reviews. – 2018. – Т. 125. – С. 3-20.

Saad, Reda S. et al. CDX2 as a marker for intestinal differentiation: its utility and limitations// World journal of gastrointestinal surgery. – 2011. – Т. 3. – №. 11. – С. 159-166.

Ordóñez, N. G. Value of GATA3 immunostaining in tumor diagnosis: a review// *Advances in anatomic pathology*. – 2013. – Т. 20. – №. 5. – С. 352-360. Ordóñez, N. G. Value of PAX 8 immunostaining in tumor diagnosis: a review and update. *Advances in anatomic pathology*. – 2012. – Т. 19. – №. 3. – С. 140-151.

4. Movahedi K., Laoui D., Gysemans C., Baeten M., Stangé G., Van den Bossche J., Mack M., Pipeleers D., In't Veld P., Baetselier P. Van Ginderachter J.A. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res*. 2010; 70 (14): 5728–5739. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4672.

5. Franklin R.A., Liao W., Sarkar A., Kim M.V., Bivona M.R., Liu K., Pamer E.G., Li M.O. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science*. 2014; 344 (6186): 921–925. DOI: 10.1126/science.1252510.

6. Girona DJ, Adams DL, He J, Xu T, Gao H, Qiao Y, Komaki R, Reuben JM, Liao Z, Blum-Murphy M, Hofstetter WL, Tang CM, Lin SH. Cancer associated macrophage-like cells and prognosis of esophageal cancer after chemoradiation therapy. *J Transl Med*. 2020 Nov 4;18(1):413. doi: 10.1186/s12967-020-02563-x. PMID: 33148307; PMCID: PMC7640696.

7. Augustyn A, Adams DL, He J, Qiao Y, Verma V, Liao Z, Tang CM, Heymach JV, Tsao AS, Lin SH. Giant Circulating Cancer-Associated Macrophage-Like Cells Are Associated With Disease Recurrence and Survival in Non-Small-Cell Lung Cancer Treated With Chemoradiation and Atezolizumab. *Clin Lung Cancer*. 2020 Jun 20;S1525-7304(20)30210-2. doi: 10.1016/j.clcc.2020.06.016. Epub ahead of print. PMID: 32798130.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ

Настоящий набор может применяться в клинической практике для качественного выявления ЦОК и САМЛ в периферической крови в качестве вспомогательного средства при диагностике и контроле терапии пациентов с метастатическими карциномами.

Данный набор используется с учетом истории болезни пациента и прочих анализов, оценка которых проводится квалифицированным врачом. Данный набор используется с учетом истории болезни пациента и прочих анализов, оценка которых проводится квалифицированным врачом.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ.

2.1.1 Набор для микрофлюидной селективной сорбции циркулирующих опухолевых клеток, состоящие из:

1. Фильтр-кассета - 1 шт.
2. Трубка силиконовая соединительная - 1 шт.
3. Шприц полипропиленовый трехкомпонентный стерильный, объем 20 мл, - 1 шт.

1.2.2. Фильтр-кассета представляет собой входной и выходной резервуары, разделенные трековыми мембранами. Состоит из пробирки для загрузки образца, верхней части, нижней части, прокладок и трековых мембран (см. рис. 1). Нижняя часть фильтр-кассеты может быть

соединена силиконовой трубкой со шприцем для подключения к шприцевому насосу. Поставляется в собранном виде.

Размеры фильтр-кассеты в формате длина × ширина × высота составляют 40 × 51 × 119 мм.

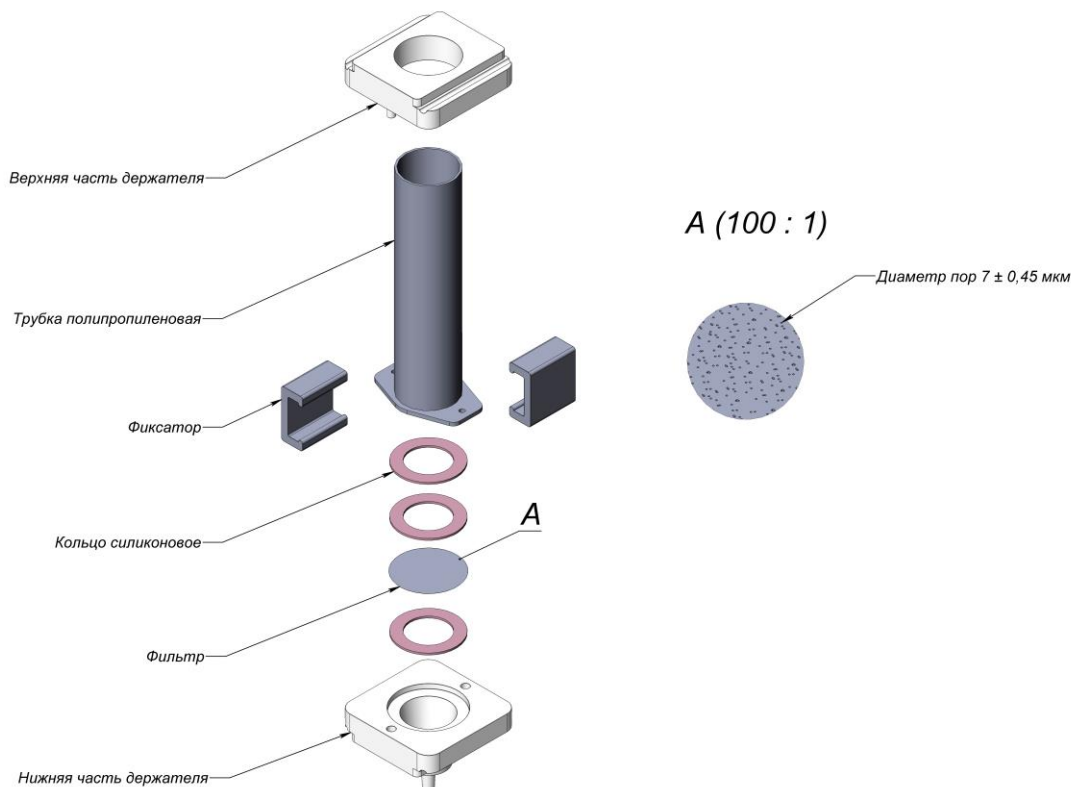


Рисунок 1. Схема фильтр-кассеты.

1.2.3. Трубка прозрачная из медицинского силикона длиной 250 ± 5 мм, внутренним диаметром 4 мм, толщина стенки 1 мм по ТУ 9398-006-48423543-2003. Регистрационное удостоверение №ФСР 2008/02487 от 23.04.2008 г. Предназначена для соединения нижней части фильтр-кассеты со шприцем для создания отрицательного давления на выходе, обеспечивающего прохождение образца из входного резервуара в выходной сквозь трековые мембраны.

1.2.4. Шприц полипропиленовый трехкомпонентный стерильный, объемом 20 мл с выходом Луер слип по ГОСТ ISO 7886-1-2011. Длина 200 мм, внутренний диаметр 19 мм, толщина стенок 1 мм. Шприц соединяется с фильтр-кассетой с помощью силиконовой трубки и помещается в инфузomat (не входит в состав набора) для создания отрицательного давления на выходе, обеспечивающего прохождение образца из входного резервуара в выходной сквозь трековые мембраны.

2.1.4 Масса набора не должна превышать 100 г.

2.1.5 Время достижения устойчивых показателей теста – 25 минут.

2.2. ФОРМА ВЫПУСКА:

2.2.1 Изделие выпускается номером 1.

2.3 ЧИСЛО АНАЛИЗИРУЕМЫХ ПРОБ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Для проведения анализа требуется один исследуемый образец.

Один набор предназначен для одного исследования.

2.4 ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип метода основан на значимо большем размере и худшей деформируемости циркулирующих опухолевых клеток и опухоль-ассоциированных макрофагов по сравнению с нормальными клетками периферической крови. Венозную кровь, взятую на ЭДТА, разбавляют в 2 раза в PBS (рН 7.2-7.4) и наносят в верхнюю часть фильтр-кассеты. Разделение клеток проводят с помощью трековой мембраны из поликарбоната с круглыми порами диаметром 6.5-7 мкм под действием отрицательного давления, приложенного с нижней стороны мембраны. Отрицательное давление создают с помощью шприцевого насоса, подключенного к нижней части фильтр-кассеты с помощью силиконовой трубки (трубка и шприц входят в состав изделия). При этом подавляющая часть эритроцитов и лейкоцитов проходит через поры, в то время как ЦОК/САМЛ задерживаются на мембране. По окончании фильтрации фильтр-кассету разбирают, и трековую мембрану с задержанными опухолевыми клетками и опухоль ассоциированными макрофагами помещают на предметное стекло (не входит в состав изделия) и высушивают. Далее мембраны могут быть окрашены по Паппенгейму с помощью стандартных красителей (не входит в состав изделия) для цитологического анализа и морфологической верификации опухолевых клеток и опухоль-ассоциированных макрофагов. Возможно применение методов иммуноцитохимии для выявления характерных антигенов.

2.5 РЕФЕРЕНТНЫЕ МЕТОДИКИ АНАЛИЗА

Проточная цитофлуориметрия.

Проточная цитометрия - метод, используемый для обнаружения и измерения физических и иммунологических характеристик популяции клеток или частиц. В этом процессе образец, содержащий клетки или частицы, суспензируется в жидкости и вводится в проточный цитометр. Образец фокусируется таким образом, чтобы в идеале пропускать одну ячейку за раз через лазерный луч, при этом параметры прямого и бокового светорассеяния позволяют оценить размер и внутреннюю структуру исследуемых клеток. Для определения экспрессии на поверхности клеток линиеспецифичных или органоспецифичных маркеров клетки предварительно окрашивают флуоресцентно мечеными антителами к соответствующим маркерам. Использование антител с флуоресцентными метками, возбуждаемыми и излучаемыми в различных диапазонах позволяет определять наличие нескольких маркеров на одной и той же клетке (коэкспрессию). Проточная цитометрия используется в фундаментальных исследованиях,

клинической практике и клинических испытаниях. Следует отметить, что описанные в литературе концентрации ЦОК и САМЛ находятся на пределе или ниже порога чувствительности метода проточной цитометрии.

3 ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

2.1 Допустимый разброс результатов при параллельном определении количества ЦОК\САМЛ в одной и той же пробе разными наборами (коэффициент вариации) – не более 20%.

2.2 Чувствительность определения наличия ЦОК\САМЛ – 1:10000 ядерных клеток крови. Минимальное количество ЦОК\САМЛ, достоверно выявляемое устройством в периферической крови, составляет 1:10000 лейкоцитов.

2.3 Аналитическая специфичность наборов 1 составляет не менее 90%.

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

2.5 Воспроизводимость результатов использования наборов составляет 100%.

2.6 Диапазон измерения (минимальное достоверно выявляемое количество ЦОК и САМЛ, выявляемое цитологическим методом после окрашивания по Паппенгейму) в анализируемом образце крови составляет от 1 клетки.

2.7 Клиническая (диагностическая) эффективность.

Клиническая (диагностическая) чувствительность составляет 87%. Контрольными образцами для определения чувствительности устройства для микрофлюидной селективной сорбции циркулирующих опухолевых клеток являлись образцы периферической крови здоровых доноров, в которую добавлены клетки клеточной линии рака молочной железы MCF7, а также иммунизированные этими клетками макрофаги в концентрации 5-20 клеток на 1 мл крови.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 При работе с набором 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 набором 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 набора с кожей, глазами и слизистыми, а также его разливания или случайного заглатывания при пипетировании.

4.4 Химическая посуда и оборудование, используемые при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

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

4.6 При выпуске набора производственные штаммы микроорганизмов не используются.

4.7 Набор не горючи, взрывобезопасны согласно ГОСТ 12.1.044.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 Оборудование:

- микроскоп световой
- инфузомат марки «SPlab»

5.2 Лабораторная посуда и прочие материалы:

- пробирки лабораторные вместимостью 20 мл
- резиновые перчатки (ГОСТ 20010-93)
 - наконечники пластиковые одноразовые к полуавтоматическим дозаторам
 - стекла предметные (ГОСТ 9284-75)

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия

- Буфер фосфатный (рН 7,2-7,4)
- Фиксатор по Май-Грюнвальду (ГОСТ 6995-77)
- Раствор Азур-Эозин по Романовскому (ТУ 9398-270-27428909-02)

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

6.1. Вид анализируемого биологического материала: используются образцы цельной периферической крови с добавлением антикоагулянта (ЭДТА К+) полученные путем пункции локтевой вены (в объеме 10 мл)

6.2 Процедура получения анализируемого биологического материала.

- Подготовьте пробирки, соответствующие заявленным тестам или необходимым пациенту лабораторным исследованиям, иглу, держатель, спиртовые салфетки или ватный тампон, пластырь.
- Наложите пациенту жгут на рубашку или пеленку на 7-10 см выше места венепункции. Попросить пациента сжать кулак.
- Выберите место венепункции. Наиболее часто используются средняя локтевая и подкожные вены, однако можно пунктировать и менее крупные и полнокровные вены тыльной поверхности запястья и кисти.
- Возьмите иглу и снимите колпачок со стороны мембраны из резины. Вставьте иглу в держатель и закручивайте до упора.
- Продезинфицируйте место венепункции марлевой салфеткой. Необходимо подождать до полного высыхания антисептического раствора.

- Снимите защитный колпачок с другой стороны. Введите вакуумную систему «держатель-игла» в вену в соответствии с алгоритмом обычного взятия крови с помощью шприца. Следите, чтобы игла находилась срезом вверх под углом 15° относительно поверхности кожи. Поскольку второй конец закрыт мембраной, кровь по игле не идет. Плавными и быстрыми движениями выполняют прокол кожи и стенки вены. Следует избегать глубокого погружения иглы.
- Вставьте пробирку до упора в держатель. В результате игла прокалывает мембрану и заглушку, формируется канал между вакуумной пробиркой и веной. Иглу нельзя двигать, когда начинает поступать кровь. Процесс продолжается пока не компенсируется вакуум в пробирке.
- Жгут необходимо снять или ослабить сразу же после начала поступления крови в вакутейнер. Убедитесь, что пациент разжал кулак.
- После остановки поступления крови пробирку извлекают из держателя. Мембрана приходит в исходное положение, ток крови по игле перекрывается. При необходимости к держателю можно подсоединять другие пробирки для забора нужного объема крови. Сразу же после заполнения пробирку нужно аккуратно перевернуть для смешивания пробы с наполнителем: пробирку с ЭДТА — 8-10 раз.
- После заполнения последней пробирки отсоедините ее от держателя и выньте систему «держатель-игла» из вены. Для обеспечения безопасности следует снять иглу с держателя и поместить в специальный контейнер для утилизации.
- На место пункции прикладывается стерильная салфетка/ватный шарик, смоченный антисептиком, или наклеивается бактерицидный пластырь.
- Пробирки маркируются и помещаются в специальный контейнер для транспортировки в лабораторию не позднее 2х часов от момента забора.

6.3. Провести анализ согласно п.8

6.4 Сбор биологического материала производится в стерильную вакуумную пробирку обработанную антикоагулянтов (ЭДТА К+)

6.5. Перед проведением исследования образец венозной крови развести раствором PBS в объеме 1:1

7 ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

7.1 ПОДГОТОВКА НАБОРА К РАБОТЕ.

Перед проведением исследования наполнить шприц, входящий в состав набора, фосфатным буфером рН 7,2-7,4, поместить шприц в инфузomat, подключить устройство к шприцу с помощью силиконовой трубки, входящей в состав набора. Включить инфузomat в режиме ручной инфузии для подачи фосфатного буфера в фильтр-кассету и дождаться, пока мембраны не будут полностью покрыты буфером.

8 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

8.1 РАСХОД КАЖДОГО КОМПОНЕНТА

Цельная венозная кровь, обработанная антикоагулянтом в объеме 10мл.

Раствор PBS в объеме 10 мл.

8.2 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

- 1 Образцы цельной венозной крови развести фосфатным буфером pH 7,2-7,4 в соотношении 1:1
- 2 Подготовленный образец перенести устройство для фильтрации клеток с помощью автоматического дозатора с одноразовым наконечником
- 3 Установить на инфузомате скорость фильтрации не более 0,5 мл в минуту, переключить инфузомат в режим откачивания и начать процесс фильтрации.
- 4 По окончании фильтрации остановить инфузомат и отсоединить фильтр-кассету
- 5 Извлечь фильтрующую мембрану и поместить на предметное стекло.
- 6 Полученный препарат высушить на воздухе и окрасить по методу Паппенгейма
- 7 После окрашивания микроскопировать препарат методом светлопольной микроскопии при увеличении x100-x1000

Время достижения устойчивых показателей теста 25 минут.

Повторное использование изделия невозможно.

8.3 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.3.1 Оценку результатов проводит квалифицированный цитолог

8.3.2 Положительный результат - наличие клеток видимыми признаками атипии и /или макрофагов размером более 40 мкм

8.3.3 При отрицательном результате – в препарате исследуемые клеточные элементы отсутствуют

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

9.8 Качественные показатели проводимых исследований и их метрологическую прослеживаемость проверяют с помощью окраски по Паппенгейму и световой микроскопии.

10 УНИЧТОЖЕНИЕ

10.1 Набор, пришедший в негодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежит уничтожению.

10.2 Изготовитель, поставщики, импортеры могут осуществлять уничтожение набора, 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 набора 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 набора 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 набора 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 m/s^2 – 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 набора 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 метки.

11.5 Набор, хранившийся с нарушением регламентированного режима, использованию не подлежит.

11.6 Гарантийный срок хранения в упаковке – *12 месяцев* со дня изготовления
По истечении срока годности набор применению не подлежит.

12 ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА И ВЛИЯНИЕ ИЗВЕСТНЫХ ИНТЕРФЕРЕНТОВ

Специфические ограничения

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

13. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

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

По истечению срока годности набора применению не подлежат.

13.3 По вопросам, касающимся качества Набор для микрофлюидной селективной сорбции циркулирующих опухолевых клеток и опухоль-ассоциированных макрофагов. по ТУ 21.20.23–003–48327621–2021 следует обращаться в компанию ООО «РУССЭЛЛ», по адресу: Россия, г.Н.Новгород ул.Минина д.5 оф 13; тел. +7 9870895992 e-mail: info@ruscell.ru

Составил

Главный технолог ООО «РУССЭЛЛ»

Директор ООО «РУССЭЛЛ»

Уткин О.В.

Зиновьев С. В.