

Набор реагентов из античеловеческих моноклональных мышиных антител для идентификации клеток, экспрессирующих антигены CD16 и CD62L



ГРАНУЛО ЧЕК

ТУ 20.59.52-001-79536146-2026

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор используется в научных целях. Не для медицинского использования.

Производитель	ООО «Научно-производственное объединение «Биотестпроект»
Адрес	115114, Москва, ул. Кожевническая, д. 1, стр. 1, пом. 1/4
Электронная почта	info@biotest-project.ru
Сайт	https://biotest-project.ru/

Перед использованием набора внимательно прочитайте настоящую инструкцию

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов ГранулоЧЕК предназначен для определения степени зрелости нейтрофилов на основании полуколичественной оценки уровня экспрессии CD16 на поверхности нейтрофилов периферической крови, ярко экспрессирующих CD62L.

Набор используется в качестве вспомогательного средства для определения степени тяжести течения воспалительного процесса при заболеваниях различных органов и систем (пневмония, энтероколит, пиелонефрит и др.) при анализе венозной крови взрослых и детей, начиная с первого дня жизни.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

2.1. Состав набора

Набор реагентов ГранулоЧЕК включает следующие компоненты:

№	Наименование компонента	Количество тестов
1	коктейль из античеловеческих моноклональных мышиных антител для идентификации клеток, экспрессирующих антиген CD45, конъюгированных с PE-Cy5; антиген CD62L, конъюгированных с AF488 и антиген CD16, конъюгированных с PE с известной степенью мечения	100

2.2. Метод исследования

Набор предназначен для исследований методом проточной цитометрии.

2.3. Принцип метода

Метод основан на иммунофенотипировании нейтрофилов периферической крови с использованием флуоресцентно-меченых моноклональных антител: анти-CD16-ФЭ и анти-CD62L-AF488. Анализ выполняется на проточном цитометре с лазером 488 нм. Степень зрелости нейтрофилов оценивается по уровню экспрессии CD16 в субпопуляции клеток, высоко экспрессирующих CD62L.

3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

Внешний вид компонентов набора должен соответствовать требованиям, приведённым в таблице ниже.

Таблица 1 — Показатели качества компонентов набора

Показатель	Значение показателя
Внешний вид	Однородная прозрачная или слабоопалесцирующая жидкость без видимых частиц
Цвет раствора	Бесцветный или слабоокрашенный
Процент окрашенных нейтрофилов (CD16+ и CD62L+ среди нейтрофилов у условно-здоровых доноров), %, не менее	80%

4. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

4.1. Условия хранения

Набор реагентов следует хранить в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С в течение не более 1 года с даты производства. После первого вскрытия флакона с антителами зафиксировать дату вскрытия; компонент допускается использовать в течение срока годности набора при условии соблюдения условий хранения.

ВАЖНО: не допускается замораживание компонентов набора. Реагенты, подвергшиеся замораживанию, не пригодны для использования и подлежат утилизации.

Внимание: Флуорохромы AF488 и ФЭ фоточувствительны. Хранить компоненты в оригинальной упаковке, защищающей от света.

4.2. Условия транспортирования

Транспортировать набор в термоконтейнерах с хладоэлементами при температуре от 2 °С до 8 °С. Флаконы с реагентами должны быть надёжно зафиксированы во избежание механических повреждений. Не допускать прямого контакта флаконов с хладоэлементами (риск локального замораживания).

4.3. Дата истечения срока годности

По истечении срока годности следует прекратить применение набора. Применение набора после истечения срока годности не допускается.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1. Специальное оборудование

Для корректного использования набора реагентов требуется проточный цитометр, соответствующий следующим техническим характеристикам:

Параметр	Требования
Тип прибора	Проточный цитометр аналитического класса с регистрацией светорассеяния и многоцветной флуоресценции
Лазерное возбуждение	488 нм (синий, аргоновый или твердотельный) — обязательно
Канал FL1 (AF488 / CD62L)	Фильтр 525/30 нм или 530/30 нм
Канал FL2 (ФЭ / CD16)	Фильтр 575/26 нм или 585/42 нм
Канал FL4 (ФЭ-Су5 / CD45)	Фильтр 675/25 нм или 660/20 нм
Светорассеяние FSC	Оценка размера клеток
Светорассеяние SSC	Оценка гранулярности клеток
Программное обеспечение	Построение одно- и двухпараметрических гистограмм; гейтирование; экспорт в форматах FCS 2.0/3.0/3.1

Примечание: перед началом работы убедиться в совместимости прибора с флуорохромами AF488, ФЭ и ФЭ-Су5 и провести настройку компенсаций спектрального перекрытия.

5.2. Дополнительное оборудование и материалы (обеспечиваются потребителем)

- Пробирки для проточной цитометрии: полистирол, 12×75 мм или 5 мл полипропиленовые
- Дозаторы переменного объема: 1–10 мкл, 10–100 мкл, 100–1000 мкл (поверенные)
- Наконечники для автоматических пипеток (стерильные, с фильтрами — рекомендуется)
- Лабораторная центрифуга (300–500 g, адаптер под пробирки 12×75 мм)
- Фосфатно-солевой буфер PBS, pH 7,2–7,4, стерильный, без азидов и кальция/магния
- Лизирующий раствор для эритроцитов (аммоний-хлоридный или коммерческий, совместимый с флуоресцентными антителами)
- Флуоресцентные микросферы для настройки ФЭУ и компенсации (одноцветные контроли для AF488 и ФЭ)
- Изотипические контрольные антитела (опционально, для оценки неспецифического связывания)
- Средства индивидуальной защиты: нитриловые/латексные перчатки, лабораторный халат, защитные очки

5.3. Требования к условиям эксплуатации

Параметр	Значение
Температура помещения	+18...+25 °С
Влажность воздуха	20–80% (без конденсата)
Электропитание	220 В ±10%, 50 Гц, с заземлением; рекомендуется ИБП

6. ТИП ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ. УСЛОВИЯ СБОРА, ОБРАБОТКИ И ХРАНЕНИЯ

6.1. Тип биологического материала

Тип образца	Описание	Объём на тест
Цельная периферическая кровь	Кровь из периферической вены, стабилизированная антикоагулянтом (ЭДТА или гепарин)	50 мкл на тест
Выделенные нейтрофилы	Фракция гранулоцитов, обогащённая методом градиентного центрифугирования или магнитной сепарации, ресуспендированная в буфере	$1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ кл/тест

6.2. Условия сбора биологического материала

6.2.1. Преаналитический этап

- Забор крови проводить утром, натощак (не менее 6 часов голодания), в положении сидя или лёжа.
- За 30 минут до забора исключить курение, интенсивную физическую нагрузку, эмоциональный стресс.
- Зафиксировать в сопроводительной документации сведения о принимаемых лекарственных препаратах (особенно глюкокортикоиды, НПВП, цитостатики).
- Использовать стерильные вакуумные системы для забора крови с антикоагулянтом ЭДТА или гепарин. Не допускается использование пробирок с активаторами свёртывания, фторидом натрия или гелевыми сепараторами.

6.2.2. Маркировка и транспортировка

- Пробирки маркировать уникальным идентификатором, ФИО пациента, датой и временем забора.
- Транспортировать в вертикальном положении, в термоконтейнере при температуре +18...+25 °С.
- Запрещается замораживать, встряхивать или подвергать образцы прямому воздействию солнечного света.

6.3. Предварительная обработка образцов

6.3.1. Обработка цельной крови

- Анализ начинать не позднее 2 часов с момента забора крови.
- Перед отбором аликвоты кровь аккуратно перемешать 5–10 раз инверсией (не встряхивать!).

6.3.2. Выделение нейтрофилов (опциональный этап)

- Применять методы, минимизирующие активацию клеток: градиенты плотности (Ficoll, Percoll) с лизисом эритроцитов или магнитную сепарацию.
- После выделения ресуспендировать в холодном буфере (PBS + 1% БСА + 0,1% азид натрия). Использовать в течение 30 минут.

6.4. Критерии приёмки и браковки образцов

Признак	Вероятная причина	Действие
Гемолиз плазмы	Неправильный забор, хранение, транспортировка	Отклонить
Сгустки или микросгустки	Недостаточное перемешивание с антикоагулянтом	Отклонить
Липемия/иктеричность высокой степени	Метаболические нарушения пациента	Выдать ответ с пометкой: возможна фоновая флуоресценция
Бактериальное загрязнение (мутность)	Нарушение стерильности при заборе	Отклонить
Время от забора до анализа более 24 ч	Нарушение сроков доставки	Отклонить

6.5. Меры предосторожности при работе с биологическим материалом

ВАЖНО: Все образцы крови считать потенциально инфицированными ВИЧ, гепатитами В/С и другими патогенами, передающимися с кровью. Работы проводить в соответствии с требованиями уровня биологической безопасности ББ-2 (BSL-2) согласно СанПиН 3.3686-21.

- Использовать СИЗ: лабораторный халат, нитриловые/латексные перчатки, защитные очки/экран, маску при риске аэролизации.
- Компоненты набора содержат азид натрия (NaN_3) в концентрации 0,1%. При работе с кислотами азид может образовывать токсичные летучие соединения — не допускать контакта с кислотосодержащими растворами.
- При попадании реагентов на кожу или слизистые — немедленно промыть большим количеством воды.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (АНАЛИЗА)

7.1. Подготовка к анализу

- Все реагенты набора, образцы крови и буферные растворы выдержать при температуре +18...+25 °С в течение 15–30 минут перед началом работы.
- Приготовить рабочий раствор PBS (рН 7,2–7,4); при необходимости добавить 0,5–1% БСА и 0,1% азида натрия.
- Включить проточный цитометр согласно руководству пользователя. Провести промывку системы и настройку оптики с помощью контрольных микросфер.
- Настроить матрицу спектральной компенсации для пары флуорохромов AF488 / ФЭ (PE).

Внимание: Антитела должны храниться в темноте до момента использования. Не допускать замораживания.

7.2. Протокол окрашивания

1. **Маркировка пробирок.** Промаркировать полистироловые пробирки для проточной цитометрии (12×75 мм) в соответствии с количеством образцов и контролей. Включить пробирку с изотипическим контролем (рекомендуется).
2. **Внесение антител.** На дно каждой пробирки внести **10 мкл** раствора антител.
3. **Внесение образца.** Добавить **50 мкл** хорошо перемешанной цельной крови в каждую пробирку с антителами. Аккуратно перемешать содержимое.
4. **Инкубация.** Инкубировать пробирки в тёмном месте при температуре +18...+25 °С в течение **20 минут**.
5. **Лизис эритроцитов.** Добавить лизирующий раствор согласно инструкции его производителя. Инкубировать в тёмном месте при +18...+25 °С в течение **5–10 минут** до просветления раствора.
6. **Промывка.** Центрифугировать при **300–400 g, 5 минут** при +18...+25 °С. Удалить супернатант, не затрагивая клеточный осадок. Добавить 1 мл PBS (0,5% БСА). Повторить центрифугирование и удалить супернатант.
7. **Ресуспензия.** Ресуспендировать клеточный осадок в **0,2–0,3 мл** PBS. Анализ провести в течение **1 часа** после завершения окрашивания.

7.3. Настройка цитометра и сбор данных

- FSC: настроить порог (threshold) для отсеечения шума и мелких фрагментов.
- SSC: настроить усиление так, чтобы популяция нейтрофилов находилась в центре шкалы.
- FL1 (AF488/CD62L): отрицательная популяция или изотипический контроль — в первой декаде логарифмической шкалы.
- FL2 (ФЭ/CD16): нейтрофилы (CD16 ярко-позитивные) — в пределах шкалы без выхода за верхний предел.
- FL4 (ФЭ-Cy5/CD45): нейтрофилы (CD16 ярко-позитивные) — в пределах шкалы без выхода за верхний предел.

- Спектральная компенсация: обязательно провести с одноцветными контрольными образцами или компенсационными микросферами.
- Сбор событий: не менее 10 000 событий, идентифицированных как нейтрофилы. Рекомендуется низкая или средняя скорость потока.

7.4. Анализ данных. Стратегия гейтирования

Рекомендуемая последовательность гейтов:

8. Выделить популяцию нейтрофилов по морфологии и экспрессии CD45 (рисунок 1).
9. Среди нейтрофилов выделить регион клеток, высоко экспрессирующих CD16 и CD62L (рисунок 2).

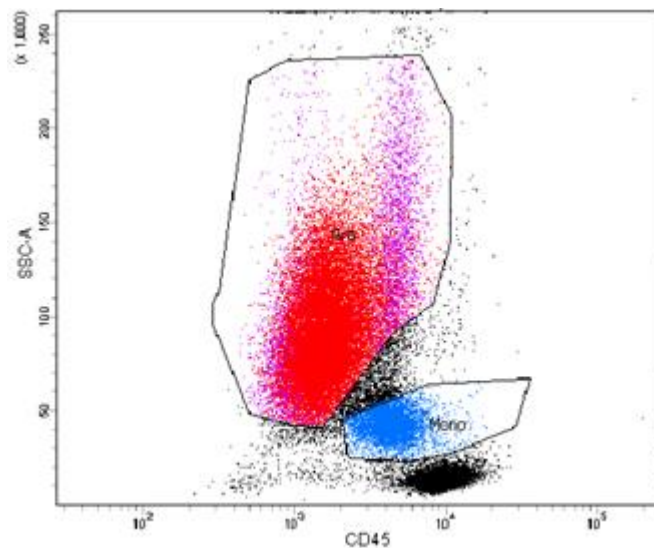


Рисунок 1 — Выделение популяции нейтрофилов по морфологии (CD45/SSC)

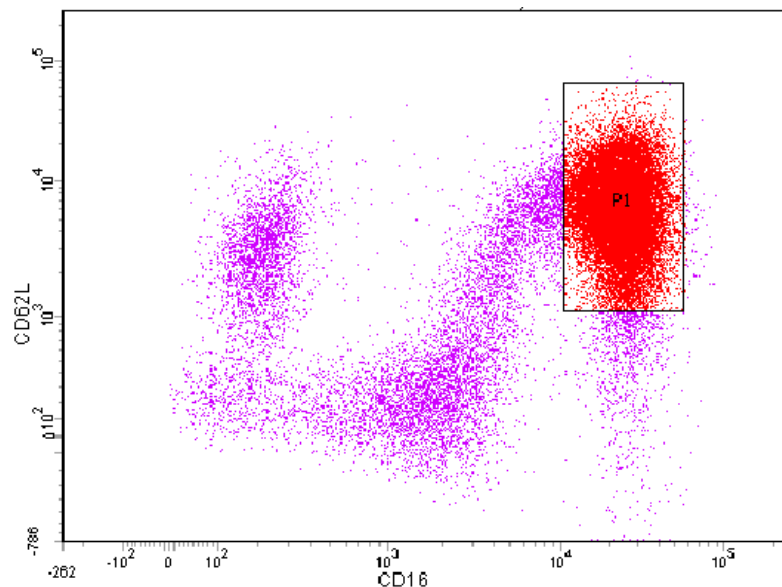


Рисунок 2 — Гейт CD16high CD62L+ нейтрофилов

7.5. Контроль качества запуска

Критерий	Требование / Действие при несоответствии
Результаты ежедневного контроля качества цитометра (микросферы)	Должны быть в пределах нормы; при выходе за пределы — остановить работу, устранить неисправность
Количество событий в гейте нейтрофилов	Не менее 10 000; при меньшем значении — повторить сбор данных
Уровень фона в изотипическом контроле	Не более 2–5% позитивных клеток; при превышении — проверить компенсацию и состояние реагентов

7.6. Меры предосторожности при проведении процедуры

- Защита от света: пробирки на всех этапах защищать от прямого света (фольга, непрозрачные штативы), флуорохромы AF488, ФЭ и ФЭ-Су5 фоточувствительны.
- Предотвращение активации: исключить резкие перепады температур, замораживание образцов, интенсивное встряхивание — возможна потеря CD62L нейтрофилами.
- Химическая безопасность: реагенты содержат азид натрия. Не сливать в раковину без разбавления. Не смешивать с кислотами.
- Биобезопасность: все манипуляции с кровью проводить в перчатках, в вытяжном шкафу или боксе биологической безопасности.

8. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оценка результатов выполняется на основе распределения значений уровня экспрессии CD16, полученных при обследовании внутрилабораторной контрольной группы.

Для исключения влияния межсерийных различий в степени мечения рекомендуется нормировать полученные показатели на значение степени мечения, указанное в паспорте набора.

Таблица 2 — Интерпретация значения CD16 относительно первого квартиля (Q1) внутрилабораторной контрольной группы

Значение CD16 (относит. Q1)	Интерпретация	Степень тяжести воспалит. процесса
Менее $0,33 \times Q1$	+	Тяжёлая
$0,33 \times Q1$ — $1,0 \times Q1$	++	Средняя
Более $1,0 \times Q1$	+++	Лёгкая

8.1. Формирование внутрилабораторной контрольной группы

В качестве контрольного материала используется кровь условно-здорового индивида, соответствующего по возрасту исследуемой когорте пациентов.

Критерии включения в контрольную группу:

- Отсутствие острых инфекционных, воспалительных или аутоиммунных заболеваний в течение последних 4 недель.

- Отсутствие приёма иммуномодулирующих, противовоспалительных или цитотоксических препаратов в течение последних 2 недель.
- Отсутствие признаков гемолиза или липемии образца.

9. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ПЕРСОНАЛА

Работа с набором реагентов допускается только для специалистов, прошедших соответствующую подготовку и имеющих документальное подтверждение квалификации.

Категория персонала	Минимальные требования
Лаборант / Медицинский лабораторный техник	Среднее профессиональное образование по специальности «Лабораторная диагностика» или «Медицинская биохимия»; действующий сертификат/свидетельство об аккредитации; инструктаж по работе с проточным цитометром
Врач клинической лабораторной диагностики	Высшее медицинское образование + ординатура/переподготовка по специальности «Клиническая лабораторная диагностика»; действующий сертификат специалиста/свидетельство об аккредитации
Исследователь (научная работа)	Высшее образование в области биологии, биохимии, иммунологии; подтверждённый опыт работы с методами проточной цитометрии

Примечание: Лица, не имеющие соответствующей квалификации, допускаются к работе с набором только под непосредственным контролем квалифицированного специалиста.

10. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРОТИВ СПЕЦИАЛЬНЫХ РИСКОВ

10.1. Идентификация специальных рисков компонентов набора

Компонент	Природа	Специфический риск	Категория опасности
Азид натрия (NaN ₃), ≤0,1%	Консервант	Токсичен при проглатывании, контакте с кожей, ингаляции. При контакте с кислотами выделяет высокотоксичный газ HN ₃ . Образует взрывоопасные соединения с медью, свинцом и латунью в стоках	Токсичность, химическая реактивность
Фикоэритрин (ФЭ)	Белковый флуорохром	Фоточувствительность; деградация при воздействии света → ложные результаты; потенциальный аллерген	Нестабильность, сенсibilизация
Фикоэритрин-Су5 (ФЭ-Су5)	Тандемный флуорохром	Фоточувствительность; деградация при воздействии света → ложные	Нестабильность, сенсibilизация

		результаты; потенциальный аллерген	
AF488	Флуоресцентный краситель	Фоточувствительность; раздражение слизистых при контакте с концентратом	Раздражающее действие, нестабильность
Мышинные мАТ IgG1	Иммуноглобулины	Потенциальная иммуногенность при повторном контакте; риск сенсibilизации	Биологическая активность, сенсibilизация

10.2. Меры первой помощи

- При попадании на кожу: немедленно промыть большим количеством воды с мылом в течение 15 минут.
- При попадании в глаза: промыть проточной водой не менее 15 минут; обратиться к врачу.
- При проглатывании: не вызывать рвоту, прополоскать рот, выпить воды; немедленно обратиться за медицинской помощью.

10.3. Утилизация отходов

- Жидкие отходы с азидом натрия: разбавить не менее чем в 100 раз водой; нейтрализовать 0,5% раствором гипохлорита натрия (30 мин) перед утилизацией. Запрещается использовать кислоты для нейтрализации азидсодержащих отходов.
- Пробирки и наконечники, загрязнённые биологическим материалом: обеззараживать 0,1–0,5% гипохлоритом натрия (15–30 мин) или автоклавировать (121 °С, 20 мин); утилизировать как медицинские отходы класса Б.
- Флаконы из-под антител: после обеззараживания утилизировать как отходы класса А (при отсутствии контакта с биоматериалом).

11. ДЕЙСТВИЯ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ УПАКОВКИ

Пользователь обязан визуально осмотреть упаковку набора при получении и перед каждым использованием.

ВАЖНО: Любое повреждение упаковки, которое может повлиять на целостность, стерильность, температурный режим или светозащиту компонентов набора, требует приостановки его использования до проведения оценки пригодности.

11.1. Виды повреждений упаковки

Тип упаковки	Признаки повреждения	Потенциальный риск
--------------	----------------------	--------------------

Транспортная коробка	Разрывы, вмятины, следы увлажнения/замораживания; нарушение пломб; повреждение термоиндикаторов	Нарушение температурного режима; механическое повреждение флаконов
Вторичная упаковка (картонная пачка)	Разрывы, деформация, следы вскрытия; нечитаемость маркировки	Потеря компонентов; световое воздействие на флуорохромы
Первичная упаковка (флаконы)	Трещины, сколы, нарушение герметичности; следы протечек; изменение объёма/цвета реагента	Дегградация флуорохромов; изменение концентрации компонентов

11.2. Порядок действий при обнаружении повреждения

- Прекратить использование набора или его компонентов с повреждённой упаковкой.
- Изолировать набор от других реагентов, поместить в контейнер с маркировкой «НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ — ПОВРЕЖДЁННАЯ УПАКОВКА».
- При наличии протечек надеть дополнительные СИЗ. При разливе реагента с азидом — действовать согласно разделу 10.
- При повреждении стеклянных флаконов использовать механические средства сбора осколков.
- Направить рекламацию производителю согласно разделу 12.

12. ПОРЯДОК ПРЕДСТАВЛЕНИЯ РЕКЛАМАЦИЙ

12.1. Основания для подачи рекламации

- Выявление несоответствия качества набора требованиям технической документации (нарушение целостности упаковки, изменение цвета/консистенции реагентов, наличие осадка).
- Несоответствие фактического количества компонентов комплектации.
- Истечение срока годности на момент получения набора (при соблюдении условий транспортировки).
- Систематическое получение неконтролируемых результатов при строгом соблюдении методики.

12.2. Действия потребителя перед подачей рекламации

- Прекратить использование подозреваемой серии набора реагентов.
- Проверить соблюдение условий хранения и транспортировки.
- Убедиться в исправности лабораторного оборудования.
- Повторить анализ с использованием новой упаковки из той же серии или из другой серии.
- Провести анализ с использованием альтернативного метода (для верификации результата).
- Убедиться в пригодности контрольных материалов и образцов пациентов.

12.3. Состав информации, прилагаемой к рекламации

- Письменное описание проблемы: описание дефекта, этапы работы.
- Идентификационные данные набора: наименование, номер серии (лот), дата производства, срок годности.
- Данные о контроле качества: протоколы внутреннего контроля за период использования спорной серии.
- Протокол исследования: сырые данные проблемных анализов с датами и временем проведения.
- Информация об оборудовании: модель цитометра, серийный номер, дата последней калибровки и ТО.
- Информация об условиях хранения: распечатки с терморегистраторов, журналы учёта температуры.
- Контактные данные ответственного лица. При наличии — фотографии дефектной упаковки/реагентов.

12.4. Порядок направления и сроки рассмотрения

Рекламация направляется производителю:

Способ обращения	Контактные данные
Почтовый адрес	115114, Москва, ул. Кожевническая, д. 1, стр. 1, пом. 1/4 (ООО «НПО Биотестпроект»)
Электронная почта	info@biotest-project.ru (с пометкой «РЕКЛАМАЦИЯ НА НАБОР РЕАГЕНТОВ»)
Срок регистрации рекламации	Не более 3–5 рабочих дней с момента получения
Срок рассмотрения и ответа	Не более 30 календарных дней

Вся информация, предоставленная в рамках рекламации, используется исключительно для расследования инцидента и улучшения качества продукции. Производитель информирует потребителя о результатах расследования и предпринятых корректирующих действиях.

Дата последнего пересмотра инструкции по применению: 27.03.2026