ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 19001— 2013

ИЗДЕЛИЯ МЕДИЦИНСКИЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*

Информация, предоставляемая изготовителем с диагностическими реагентами *in vitro*, применяемыми для окрашивания в биологии

ISO 19001:2002
In vitro diagnostic medical devices – Information supplied by the manufacturer with in vitro diagnostic reagents for staining in biology
(IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации – ГОСТ Р 1.0–2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Лабораторией проблем клинико-лабораторной диагностики НИИ общественного здоровья и управления здравоохранением Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» Минздрава РФ на основе собственного аутентичного перевода на русский язык международного стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 380 «Клинические лабораторные исследования и медицинские изделия для диагностики *in vitro*»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 25 октября 2013 г. № 1201-ст.

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 19001:2002 «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем с диагностическими реагентами *in vitro* для окрашивания в биологии» (ISO 19001:2002 «*In vitro* diagnostic medical devices – Information supplied by the manufacturer with *in vitro* diagnostic reagents for staining in biology»).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ Р 1.5 (подраздел 3.5).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им национальные стандарты Российской Федерации, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок – в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (gost.ru)

© Стандартинформ, 2014

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ИЗДЕЛИЯ МЕДИЦИНСКИЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO* Информация, предоставляемая изготовителем с диагностическими реагентами *in vitro*, применяемыми для окрашивания в биологии

In vitro diagnostic medical devices. Information supplied by the manufacturer with *in vitro* diagnostic reagents for staining in biology

Дата введения — 2014—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает требования к информации, предоставляемой изготовителями с реагентами, применяемыми для окрашивания в биологии. Требования относятся к изготовителям, поставщикам и продавцам красителей, красок, хромогенных реагентов и других реагентов, применяемых для окрашивания в биологии. Требования к информации, предоставляемой изготовителями, устанавливаемые настоящим стандартом, являются необходимым условием получения сравнимых и воспроизводимых результатов во всех сферах окрашивания в биологии.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие международные и европейские региональные стандарты:

ИСО 31-8, Величины и единицы. Часть 8. Физическая химия и молекулярная физика (ISO 31-8, Quantities and units — Part 8: Physical chemistry and molecular physics)

ИСО 1000, Единицы СИ и рекомендации по использованию их кратных и других единиц (ISO 1000, SI units and recommendations for the use of their multiples and of certain other units)

ЕН 375:2001 Информация, предоставляемая изготовителем с реактивами для диагностики *in vitro* для профессионального применения (EN 375:2001, Information supplied by the manufacturer with *in vitro* diagnostic reagents for professional use)

ЕН 376:2001 Информация, предоставляемая изготовителем с реактивами для диагностики *in vitro* для самотестирования (EN 376:2001, Information supplied by the manufacturer with *in vitro* diagnostic reagents for self-testing)

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими им определениями:

3.1 информация, предоставляемая изготовителем (information supplied by the manufacturer): Вся печатная, письменная, графическая или иная информация, прилагаемая или сопровождающая реагент для диагностики *in vitro.*

3.2 маркировка (label): Любая печатная, письменная или графическая информация, нанесенная на упаковку.

[EN 375]

3.3 реагент диагностики *in vitro* (*in vitro* diagnostic reagent): Реагент, используемый самостоятельно или в комбинации с другими медицинскими изделиями для диагностики *in vitro,* предназначенный изготовителем для исследований *in vitro* веществ человеческого, животного или растительного происхождения с целью получения информации, относящейся к обнаружению, диагностике, мониторингу или лечению физиологических состояний. состояний здоровья или болезни иди врожденной аномалии.

3.4 окрашивание (staining): Придание цвета материалу с помощью реакции с красителем или хромогенным реагентом.

3.5 красящее вещество (dye): Окрашенное органическое соединение, которое, будучи растворенным в подходящем растворителе, способно придать цвет материалу.

Примечание – Физической природой цвета является избирательная абсорбция (и/или эмиссия) в видимой области электромагнитного спектра между 400 и 800 нм. Красящие вещества являются молекулами с большими системами делокализованных электронов (связанных π-электронных систем). Характеристики абсорбции света красящих веществ представлены спектром абсорбции в форме диаграммы, на которой сопоставлены абсорбция света и длина волны. Спектр и длина волны при максимальной абсорбции зависят от химической структуры красящего вещества, растворителя и от условий спектрального измерения.

3.6 краситель, краска (stain): Раствор одного или нескольких красящих веществ в определенных концентрациях в определенном растворителе, используемый для окрашивания.

Примечание – Краска может быть приготовлены прямым растворением красящего вещества в растворителе или разведения готового основного раствора подходящими агентами.

3.6.1 основной раствор красителя (stock solution of stain): Стабильный определенный раствор одного или нескольких красящих веществ в более высокой концентрации, чем используемая при окраске.

Примечание – Стабильность означает постоянство свойств красящего вещества даже в присутствии других красящих веществ.

3.7 хромогенный реагент (chromogenic reagent): Реагент, который реагирует с химическими группами, присутствующими или вызванными в клетках и тканях, с образованием окрашенного соединения *in situ.*

Пример – Типичные хромогенные реагенты:

a) соль диазония;

b) реагент Шиффа.

3.8 флюорохром (fluorochrome): Реагент, который испускает видимый свет при облучении возбуждающим светом более короткой длины волны.

3.9 антитело (antibody): Специфический иммуноглобулин, образованный *B*-лимфоцитами в ответ на воздействие иммуногенным веществом и способный связываться с ним.

Примечание – Молекула иммуногенного вещества содержит одну или несколько частей с характерным химическим составом, эпитоп.

3.9.1 поликлональное антитело (polyclonal antibody): Смесь антител, способных специфически реагировать с определенным иммуногенным веществом.

3.9.2 моноклональное антитело (monoclonal antibody): Антитело, способное специфически реагировать с одиночным эпитопом определенного иммуногенного вещества.

3.10 зонд нуклеиновой кислоты (nucleic acid probe): Односпиральный олигонуклеотид или полинуклеотид определенной длины, комплементарный со специфической последовательностью нуклеотидов нуклеиновых кислот.

3.11 лектин (lectin): Белок неиммуногенного происхождения с двумя или несколькими связывающими участками, который распознает и связывается со специфическими остатками сахаридов.

4 Требования к информации, предоставляемой изготовителем

4.1 Общие требования

4.1.1 Информация, предоставляемая изготовителем с реагентами, используемыми для окрашивания в биологии

Информация, предоставляемая изготовителем с реагентами, используемыми для окрашивания в биологии, должна соответствовать ИСО 31-8, ИСО 1000, ЕН 375 и ЕН 376. Особое внимание следует уделить предупреждениям, приведенным в ЕН 375. Кроме того, если это применимо, требования, установленные в 4.1.2, 4.1.3 и 4.1.4, должны быть применены к различным реагентам, используемым для окрашивания в биологии.

4.1.2 Наименование продукта

Наименование продукта должно включать в себя регистрационный номер в CAS и наименование и номер индекса красителя, если это применимо.

Примечание 1 – Регистрационные номера в CAS являются регистрационными номерами в Химической справочной службе (CAS). Они представляют собой числовые кодовые номера веществ, получивших индекс в Химической справочной службе приписанные химическим веществам.

Примечание 2 – Индекс красок дает 5-значный номер, номер C.I. и специально составленное наименование большинства красящих веществ.

4.1.3 Описание реагента

Описание реагента должно включать в себя соответствующие физико-химические данные, сопровождаемые сведениями, относящимися к каждой партии. Данные должны содержать, по крайней мере, следующую информацию:

a) молекулярную формулу, включая противоион;

b) молярную массу (г/моль) точно обозначенную, с включением противо-иона или без него;

c) допускаемые пределы интерферирующих веществ;

Для окрашенных органических соединений данные должны содержать:

d) молярную абсорбцию (вместо этого может быть приведено содержание молекулы чистого красящего вещества, но не содержание общего красящего вещества);

e) длина волны или число волн при максимальной абсорбции;

f) данные тонкослойной хроматографии, высокопроизводительной жидкостной хроматографии или высокопроизводительной тонкослойной хроматографии.

4.1.4 Предназначенное применение

Должно быть приведено описание, содержащее руководство по окрашиванию в биологии и количественные и качественные процедуры (если это применимо). Информация должна включать сведения относительно следующего:

a) тип (типы) биологического материала, обращение и обработку перед окрашиванием, например:

1) могут ли быть использованы пробы клеток или тканей;

2) может ли быть использован замороженный или химически-фиксированный материал;

3) протокол для обращения с тканью;

4) какая закрепляющая среда может быть применена;

b) детали соответствующей методики реакции, использованной изготовителем для исследования реактивности красящего вещества, краски, хромогенного реактива, флюорохрома, антитела, зонда нуклеиновой кислоты или лектина, применяемых для окрашивания в биологии;

c) результат (результаты), ожидаемые при методике реакции на предполагаемом типе (типах) материала при способе, намеченном изготовителем;

d) замечания о подходящем положительном или отрицательном контроле ткани и об интерпретации результата (результатов);

e) ссылки на опубликованные результаты, полученные при использовании продукта способом, предлагаемым изготовителем.

4.2 Дополнительные требования к реагентам специфических видов

4.2.1 Флюорохромы

Независимо от типа применения, флюорохромы, предлагаемые для окрашивания в биологии, должны сопровождаться следующей информацией:

а) избирательность, например, описание мишени (мишеней), которые
могут быть продемонстрированы, с использованием специфических условий;
длины волн света возбуждения и испускания;
для флюорохромов, связанных с антителами, отношение
флюорохром/белок (Ф/Б).

4.2.2 Соли металлов

В случае, если предлагаются металлсодержащие соединения для применения в поглощающей металл методике при окрашивании в биологии, должна быть приведена следующая дополнительная информация:

систематическое наименование;
чистота (отсутствие примесей).

4.2.3 Антитела

Антитела, предлагаемые для окрашивания в биологии, должны сопровождаться следующей информацией:

а) описание антигена (иммуногенного вещества), против которого направлено антитело и если антиген определен кластером системы дифференциации – номер CD. Описание должно содержать, если это приемлемо, тип обнаруживаемой макромолекулы, часть которой должна быть обнаружена, клеточная локализация и клетки или ткани, в которых она находится, и любая перекрестная реактивность с другими эпитопами;

b) для моноклональных антител – клон, метод образования (супернатант культуры ткани или асцитическая жидкость), подкласс иммуноглобулина и идентичность легкой цепи;

c) для поликлональных антител – животное-хозяин, и используется ли
цельная сыворотка или фракция иммуноглобулина;
описание формы (раствор или лиофилизированный порошок), количество общего белка и специфическое антитело, а для раствора – природа и концентрация растворителя или среды;

e) если применимо, описание любых молекулярных связующих веществ или наполнителей, добавленных к антителу;

заявление о чистоте, технике очищения и методах обнаружения примесей (например, Вестерн-блоттинг, иммуногистохимия);

соответствующие ссылки на публикации, посвященные применению антитела.

4.2.4 Зонды нуклеиновой кислоты

Зонды нуклеиновой кислоты, предлагаемые для окрашивания в биологии, должны сопровождаться следующей информацией:

последовательность оснований и является зонд одно- или двух-спиральным;

молярная масса зонда или число оснований и, если приемлемо, число фракций (в процентах) пар оснований гуанин – цитозин;

использованный маркер (радиоактивный изотоп или нерадиоактивная молекула), точка прикрепления к зонду (3' и/или 5') и доля вещества в процентах меченого зонда;

обнаруживаемая генная мишень (последовательность ДНК или РНК);

e) описание формы (лиофилизированный порошок или раствор) и количество (пг или пмоль) или концентрация (пг/мл или пмоль/мл), если применимо, и, в случае раствора, – природа и концентрация растворителя или среды;

f) заявление о чистоте, методиках очистки и методах обнаружения примесей, например, высокопроизводительная жидкостная хроматография;

g) соответствующие ссылки на публикации, касающиеся источников описания последовательности ДНК, существования любых известных патентов и информации по применению зондов нуклеиновой кислоты.

Приложение А
(справочное)

Примеры информации, предоставляемой изготовителем с реагентами, обычно применяемыми в методиках биологического окрашивания

А.1 Общие положения

Следующая информация представляет собой примеры процедур и не должна рассматриваться как единственный способ процедуры, которая должна быть проведена. Эти процедуры могут быть использованы изготовителем для исследования реактивности красящих веществ и иллюстрируют то, каким образом изготовитель может представить информацию, чтобы соответствовать настоящему стандарту.

А.2 Краситель метиловый зеленый-пиронин Y

А.2.1 Красящее вещество метиловый зеленый

Информация, касающаяся красящего вещества метиловый зеленый, следующая:

a) идентичность продукта:

- метиловый зеленый (синонимы: двойной зеленый SF, легкий зеленый);
- регистрационный номер CAS: 22383-16-0;
- наименование и номер индекса цвета: основной голубой 20, 42585;

b) состав:

- молекулярная формула, включающая противоион: $C_{26}H_{33}N_32^+$ $2BF4^-$;
- молярная масса с (или без) противоиона: 561,17 г моль$^{-1}$ (387,56 г моль$^{-1}$);
- массовая доля (содержание) метилового зеленого катиона: 85 %, определено с помощью абсорбционной спектрометрии;
- допустимые пределы интерферирующих веществ, приведенные как массовые доли:

1) вода: менее 1 %;

2) неорганические соли: менее 0,1 %;

3) детергенты: не присутствуют;

4) окрашенные примеси, включая кристаллы виолета: не определимы с помощью тонкослойной хроматографии;

5) индифферентные соединения: 14 % растворимого крахмала;

c) длина волны максимальной абсорбции раствора красящего вещества: 633 нм;

d) тонкослойная хроматография: присутствует только один основной компонент, соответствующий метиловому зеленому;

e) обращение и хранение: стабилен при хранении в тщательно закупоренной коричневой бутылке при комнатной температуре (от 18 °C до 28 °C).

А.2.2 Красящее вещество этиловый зеленый

Информация, относящаяся к красящемуся веществу этиловому зеленому, следующая:

a) идентичность продукта:

1) этиловый зеленый (синоним: метиловый зеленый);

2) регистрационный номер CAS: 7114-03-6;

3) наименование и номер индекса красок: наименование в индексе красок отсутствует, 42590;

b) состав:

1) молекулярная формула, включающая противоион: $C_{27}H_{35}N_3^{2+}$ 2 BF_4^-;

2) молярная масса с (или без) противоионом: 575,19 г моль$^{-1}$ (401,58 г моль$^{-1}$);

3) массовая доля этилового зеленого катиона: 85 %, определена с помощью абсорбционной спектрометрии;

4) допустимые пределы интерферирующих веществ, приведенные как массовые доли:

-вода: менее 1 %;

- неорганические соли: менее 0,1 %;
- детергенты: отсутствуют;
- окрашенные примеси, включая кристаллы виолета: не обнаруживаются с помощью тонкослойной хроматографии;
- индифферентные соединения: 14 % растворимого крахмала;

c) длина волны максимальной абсорбции раствора красящего вещества: 633 нм;

d) тонкослойная хроматография: присутствует только один основной компонент, совпадающий с этиловым зеленым;

e) обращение и хранение: стабилен при хранении в тщательно закрытой бутылке из коричневого стекла при комнатной температуре от 18 °C до 28 °C.

А.2.3 Красящее вещество пиронин Y

К красящему веществу пиронин Y относится следующая информация:

a) идентичность продукта:

1) пиронин Y (синонимы: pyronine Y, пиронин G, pyronine G);

2) регистрационный номер CAS: 92-32-0;

3) наименование и номер в индексе красок: наименование в индексе красок отсутствует, 45005;

b) состав:

1) молекулярная формула, включающая противоион: $C_{17}H_{19}N_2O^+$ Cl^-;

2) молярная масса с (или без) противоионом: 302,75 г моль$^{-1}$ (267,30 г моль$^{-1}$);

3) массовая доля пиронина Y катиона: 80 %, определена с помощью абсорбционной спектрометрии;

4) допустимые пределы интерферирующих веществ, приведенные как массовые доли:

- вода: менее 1 %;

- неорганические соли: менее 0,1 %;

- детергенты: отсутствуют;

- окрашенные примеси, включая кристаллы виолета: не обнаруживаются с помощью тонкослойной хроматографии;

- индифферентные соединения: 19 % растворимого крахмала;

c) длина волны максимальной абсорбции раствора красящего вещества: 550 нм;

d) тонкослойная хроматография: присутствует только один основной компонент, совпадающий с пиронином Y;

e) обращение и хранение: стабилен при хранении в тщательно закрытой бутылке из коричневого стекла при комнатной температуре от 18 °C до 28 °C.

A.2.4 Предназначенное применение метода окрашивания метиловым зеленым-пиронином Y

A.2.4.1 Тип (типы) материала

Краска метиловый зеленый-пиронин Y применяется для окрашивания свежезамороженных, парафинированных или пластиковых срезов тканей различных видов.

A.2.4.2 Обращение и обработка перед окрашиванием

Возможные фиксирующие средства включают в себя:

- жидкость Карноя [этанол (объемная доля 99 %) + хлороформ + уксусная кислота (массовая доля 99 %), смешанные в объемах (60 + 30 + 10) мл] или

- формальдегид (массовая доля 3,6 %), забуференный фосфатом (pH = 7,0); рутинное высушивание, очистка, пропитывание и покрытие парафином, обычное приготовление срезов с помощью микротома.

A.2.4.3 Рабочий раствор

Готовят раствор этилового зеленого или метилового зеленого из количества, соответствующего массе 0,15 г чистого красящего вещества, рассчитанного как окрашенный катион (в приведенных выше примерах 0,176 г в каждом случае) в 90 мл горячей (температура 50 ^{0}C) дистиллированной воды.

Растворяют количество, соответствующее массе 0,03 г пиронина Y, рассчитанного как окрашенный катион (в примере, приведенном выше 0,038 г) в 10 мл 0,1 моль/л фталатного буфера (pH = 4,0). Смешивают последний раствор с раствором этилового зеленого или метилового зеленого.

A.2.4.4 Стабильность

Рабочий раствор стабилен по крайней мере одну неделю при хранении в плотно закрытой бутыли из коричневого стекла при комнатной температуре от 18 °C до 28 °C.

A.2.4.5 Методика окрашивания

A.2.4.5.1 Депарафинируют срезы.

A.2.4.5.2 Смачивают срезы.

A.2.4.5.3 Окрашивают срезы в течение 5 мин при комнатной температуре около 22 °C в рабочем растворе.

A.2.4.5.4 Промывают срезы в двух сменах дистиллированной воды, от 2 до 3 с в каждой.

A.2.4.5.5 Стряхивают излишки воды.

A.2.4.5.6 Активируют в трех сменах 1-бутанола.

A.2.4.5.7 Переносят непосредственно из 1-бутанола в гидрофобную синтетическую смолу.

A.2.4.6 Ожидаемый результат (результаты)

Ожидается получение следующих результатов с типами материалов, перечисленными в A.2.4.1:

a) для ядерного хроматина: зеленый (фиксатор Карнов) или голубой (фиксатор формальдегид);

a) для нуклеол и цитоплазмы, богатой рибосомами: красный (фиксатор Карнов) или лиловато- красный (фиксатор формальдегид);

c) для матрицы хрящей и гранул тучных клеток: оранжевый;

d) для мышц, коллагена и эритроцитов: не окрашенные.

A.3 Реакция Фельгена – Шиффа

A.3.1 Красящее вещество парарозанилин

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ — Для R 40: возможный риск необратимых эффектов. Для S 36/37: необходима защитная одежда и перчатки.

Следующая информация относится к красящему веществу парарозанилин.

a) идентичность продукта:

1) парарозанилин (синонимы: основной рубиновый, парафуксин, парамагента, магента 0);

2) регистрационный номер CAS: 569-61-9;

3) наименование и номер индекса красок: основной красный 9, 42500;

b) состав:

1) молекулярная формула, включающая противоион: $C_{19}H_{18}N_3^+$ Cl^-;

2) молярная масса с (и без) притивоиона: 323,73 г моль$^{-1}$ (288,28 г моль$^{-1}$);

3) массовая фракция парарозанилина катиона: 85 %, определенная с помощью абсорбционной спектрометрии;

4) допустимые пределы интерферирующих веществ, приведенные как массовые доли:

- вода: менее 1 %;
- неорганические соли: менее 0,1 %;
- детергенты: не присутствуют;
- окрашенные примеси: метилированные гомологи парарозанилина могут присутствовать в следовых количествах, определяемые с помощью тонкослойной хроматографии, но акридин отсутствует;
- индифферентные соединения: 14 % растворимого крахмала;

c) длина волны максимально абсорбции раствора красящего вещества: 542 нм;

d) тонкослойная хроматография: присутствует один основной компонент, соответствующий парарозанилину; метилированные гомологи парарозанилина в следовых количествах;

e) обращение и хранение: стабилен при хранении в тщательно закупоренной коричневой бутылке при комнатной температуре от 18 °С до 28 °С.

А.3.2 Предназначенное применение реакции Фельгена – Шиффа

А.3.2.1 Тип (типы) материала

Реакция Фельгена – Шиффа применяется для парафинированных или пластиковых срезов различных видов тканей или цитологического материала (мазок, отпечаток ткани, культура клеток, монослой):

А.3.2.2 Обращение и обработка перед окрашиванием

А.3.2.2.1 Возможные фиксирующие вещества

Возможные фиксирующие вещества включают в себя:

a) гистология: формальдегид (массовая доля 3,6 %), забуференный фосфатом, (pH =7,0);

b) цитология:

1) жидкий фиксирующий материал: этанол (объемная доля 96 %);

2) высушенный на воздухе материал:

- формальдегид (массовая доля 3,6 %), забуференный фосфатом;
- метанол+ формальдегид (массовая доля 37 %) +уксусная кислота (массовая доля 100 %), смешанные в объемах (85 +10 + 5) мл.

Материал, фиксированный в фиксаторе Буина, непригоден для этой реакции.

Детали методики, примененной изготовителем для исследования реактивности хромогенного реагента, приведены в А.3.2.2.2 – А.3.2.4.

А.3.2.2.2 Реагент парарозанилин-Шифф

Растворяют 0,5 г парарозанилин-хлорида в 15 мл 1 моль/л соляной кислоты. Добавляют 85 мл водного раствора $K_2S_2O_5$ (массовая доля 0,5 %). Ожидают 24 ч. Взбалтывают 100 мл этого раствора с 0,3 г древесного угля в течение 2 мин и профильтровывают. Хранят бесцветную жидкость при температуре не ниже 5 °С. Раствор стабилен в течение по крайней мере 12 мес в плотно закрытой посуде.

А.3.2.2.3 Раствор для промывания

Растворяют 0,5 г $K_2S_2O_5$ в 85 мл дистиллированной воды. Добавляют 15 мл 1 моль/л соляной кислоты. Раствор готов к немедленному применению и может быть использован в течение 12 ч.

А.3.2.3 Методика окрашивания

А.3.2.3.1 Депарафинируют парафинированные срезы в ксилене в течение 5 мин, затем промывают в течение 2 мин, сначала в этаноле с объемной долей 99 %, а затем в этаноле с объемной долей 50 %.

А.3.2.3.2 Смачивают пластиковые срезы, депарафинированные парафинированные срезы и цитологический материал в дистиллированной воде в течение 2 мин.

А.3.2.3.3 Гидролизуют материал в 5 моль/л соляной кислоте при температуре 22 °С в течение от 30 до 60 мин (точное время гидролиза зависит от типа материала).

А.3.2.3.4 Промывают дистиллированной водой в течение 2 мин.

А.3.2.3.5 Окрашивают реагентом парарозанилин в течение 1 ч.

А.3.2.3.6 Промывают в трех последовательных сменах промывного раствора по 5 мин в каждой.

А.3.2.3.7 Дважды промывают дистиллированной водой, по 5 мин каждый раз.

А.3.2.3.8 Дегидратируют в этаноле с объемной долей 50 % , затем с 70 % и наконец в 99 % -ном этаноле, по 3 мин каждый раз.

А.3.2.3.9 Дважды промывают в ксилене, по 5 мин каждый раз.

А.3.2.3.10 Извлекают в синтетическую гидрофобную смолу.

А.3.2.4 Ожидаемые результаты

Ожидается получение следующих результатов с типами материалов, перечисленных в А.3.2.1:

Для ядер клеток (ДНК): красный цвет.

А.4 Иммунохимическая демонстрация рецепторов эстрогенов

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ — Реагент, содержащий азид натрия (15 ммоль/л). NaN_3 может реагировать с свинцом или медью, образуя взрывчатые азиды металлов. При удалении смыть большим объемом воды.

А.4.1 Моноклональный мышиный античеловеческий рецептор эстрогенов

Следующая информация относится к моноклональному мышиному античеловеческому рецептору эстрогенов.

a) идентичность продукта: моноклональный мышиный античеловеческий рецептор эстрогенов, клон 1D5;

b) клон: 1D5;

c) иммуноген: рекомбинантный человеческий белок рецептора эстрогенов;

d) источник антител: моноклональное мышиное антитело, поставленное в жидкой форме как супернатант тканевой культуры;

e) специфичность: антитело реагирует с *N*-концевым доменом (A/B регион) рецептора. При иммуноблоттинге оно реагирует с 67 кДа полипепетидной цепью, полученной путем трансформации *Escherichia coli* и трансфекции COS клеток плазмидными векторами, экспрессирующими рецептор эстрогенов. Кроме того, антитело реагирует с цитозольными экстрактами лютеального эндометрия и клетками линии MCF-7 рака грудной железы человека;

f) перекрестная реактивность: антитело реагирует с рецепторами эстрогенов крыс;

g) состав: супернатант культуры ткани (среда RPMI 1640, содержащая сыворотку плода теленка), диализированный против 0,05 ммоль/л Tris/HCl, pH = 7,2, содержащий 15 ммоль/л NaN_3.

- концентрация Ig: 245 мг/л;
- изотип Ig: IgG1;
- идентичность легкой цепи: каппа;
- концентрация общего белка: 14,9 г/л;

h) обращение и хранение: стабилен до трех лет при температуре хранения от 2 °C до 8 °C.

A.4.2 Предназначенное применение

A.4.2.1 Общие положения

Антитело применяется для качественного и полуколичественного обнаружения экспрессии рецептора эстрогенов (например, рак грудной железы).

A.4.2.2 Тип (типы) материала

Антитело может быть применено на парафинированных срезах, фиксированных формалином, замороженных срезах, фиксированных ацетоном, и на мазках клеток. Кроме того, антитело может быть применено для детекции антител фермент-связанным иммуносорбентным исследованием (ELISA).

A.4.2.3 Методика окрашивания для иммуногистохимии

A.4.2.3.1 Общие положения

Для парафинированных срезов тканей, фиксированных формалином, применяют разнообразные чувствительные технологии окрашивания, в том числе иммунопероксидазную методику, технологию APAAP (щелочная фосфатаза антищелочная фосфатаза) и авидин-биотиновые методы, например, методы LSAB (Меченые СтрептАвидин-Биотин). Изменения антигена, такие как нагревание в 10 ммоль/л цитратном буферном растворе, pH =6,0, являются обязательными. Слайды не должны высушиваться при такой обработке или при следующей процедуре иммуногистохимического окрашивания. Для окрашивания мазков клеток предложен метод APAAP.

Детали методики, использованной изготовителем на парафинированных срезах тканей, фиксированных формалином, для исследования реактивности антитела для иммуногистохимии, приведены в A.4.2.3.2 – A.4.2.3.4.

A.4.2.3.2 Реагенты

A.4.2.3.2.1 Перекись водорода, массовая доля 3% в дистиллированной воде.

A.4.2.3.2.2 Трис-буфер солевой (TBS), состоящий из 0,05 моль/л Tris/HCl и 0,15 моль/л NaCl при pH = 7,6.

A.4.2.3.2.3 Первичное антитело, состоящее из моноклонального мышиного античеловеческого рецептора эстрогенов, разведенного оптимально в TBS (см. A.4.2.3.4).

A.4.2.3.2.4 Биотинилированное козье антитело к мышиным/кроличьим иммуноглобулинам, рабочий раствор.

Готовят этот раствор по меньшей мере за 30 мин, но не ранее, чем за 12 ч перед применением, следующим образом:

- 5 мл TBS, pH = 7,6;
- 50 мкл биотинилированного, изолированного от аффинитета козьего антитела против мышиных/кроличьих иммуноглобулинов в 0,01 моль/л фосфатном буферном растворе, 15 ммоль/л NaN_3, в количестве достаточном, чтобы довести конечную концентрацию до 10 – 20 мг/мл.

A.4.2.3.2.5 Комплекс СтрептАвидин-биотин /пероксидаза хрена (StreptABComplex/HRP), рабочий раствор.

Готовят данный раствор следующим образом:

- 5 мл TBS, pH = 7,6;
- 50 мкл СтрептАвидина (1 мг/л) в 0,01 моль/л фосфатном буферном растворе, 15 ммоль/л NaN_3;
- 50 мкл биотинилированной пероксидазы хрена (0,25 мг/л) в 0,01 моль/л фосфатном буферном растворе, 15 ммоль/л NaN_3;

A.4.2.3.2.6 Раствор диаминбензидинового субстрата (DAB)

Растворяют 6 мг 3,3'-диаминбензидинтетрагидрохлорида в 10 мл 0,05 моль/л TBS, pH = 7,6. Добавляют 0,1 мл перекиси водорода массовой долей 3% в дистиллированной воде. Если произошла преципитация, фильтруют.

A.4.2.3.2.7 Гематоксилин

Растворяют 1 г гематоксилина, 50 г алюминий калий сульфата, 0,1 г йодата натрия и 1,0 г лимонной кислоты в 750 мл дистиллированной воды. Доводят до 1000 мл дистиллированной водой.

А.4.2.3.3 Методика окрашивания

А.4.2.3.3.1 Депарафинируют и регидратируют срезы ткани; проводят изменение антигена (см. вышеприведенную методику окрашивания)

А.4.2.3.3.2 Инкубируют с перекисью водорода массовой долей 3 % в дистиллированной воде в течение 5 мин.

А.4.2.3.3.3 Промывают дистиллированной водой и помещают в TBS на 5 мин.

А.4.2.3.3.4 Инкубируют с моноклональным мышиным античеловеческим рецептором эстрогенов, разведенным оптимально в TBS (см.А.4.2.3), в течение 20 – 30 мин.

А.4.2.3.3.5 Промывают TBS и помещают в баню TBS на 5 мин.

А.4.2.3.3.6 Инкубируют с рабочим раствором биотинилированного козьего антитела к мышиным/кроличьим иммуноглобулинам в течение 20 – 30 мин.

А.4.2.3.3.7 Промывают TBS и помещают в баню TBS на 5 мин.

А.4.2.3.3.8 Инкубируют с рабочим раствором комплекса СтрептАвидин-биотин/пероксидаза хрена в течение 20 – 30 мин.

А.4.2.3.3.9 Промывают TBS и помещают в баню TBS на 5 мин.

А.4.2.3.3.10 Инкубируют с раствором DAB в течение 5-15 мин (при обращении с DAB использовать перчатки).

А.4.2.3.3.11 Промывают дистиллированной водой.

А.4.2.3.3.12 Проводят контрастное окрашивание раствором гематоксилина в течение 30 с.

А.4.2.3.3.13 Промывают водой из-под крана в течение 5 мин.

А.4.2.3.3.14 Промывают дистиллированной водой в течение 5 мин.

А.4.2.3.3.15 Дегидратируют этанолом с объемной долей 50 % в течение 3 мин, затем 3 мин с объемной долей 70 % и, наконец, 3 мин с объемной долей 99 %.

А.4.2.3.3.16 Промывают в двух сменах ксилена, по 5 мин в каждой. А.4.2.3.3.17 Извлекают в синтетическую гидрофобную смолу.

А.4.2.3.4 Предлагаемые разведения

Оптимальное окрашивание может быть получено путем разведения антитела в TBS с pH = 7,6, смешанным по объему от (1 + 50) до (1 + 75) мкл при исследовании на фиксированных формалином парафинированных срезах раковой опухоли грудной железы человека. Антитело может быть разведено TBS, смешанным по объемам от (1 + 50) до (1 + 100) мкл, для использования в технологии АРААР и авидин-биотиновых методах, при исследовании фиксированных ацетоном срезов замороженной ткани раковой опухоли грудной железы.

А.4.2.3.5 Ожидаемые результаты

Антитело интенсивно метит ядра клеток, которые, как известно, содержат большое число рецепторов эстрогенов, например, эпителиальные и миометриальные клетки матки и нормальные и гиперплазированные эпителиальные клетки молочных желез. Окрашивание преимущественно локализовано в ядрах без окрашивания цитоплазмы. Однако, на срезах криостата, содержащих небольшие или неопределимые количества рецепторов эстрогенов (например, эпителий кишечника, клетки сердечной мышцы, клетки мозга и соединительной ткани), отмечают отрицательные результаты с антителом. Антитело метит эпителиальные клетки карциномы грудной железы, которые экспрессируют рецептор эстрогенов.

Окрашивание ткани зависит от обращения и обработки ткани до окрашивания. Неправильная фиксация, замораживание, оттаивание, промывание, высушивание, нагревание, срезание или загрязнение другими тканями или жидкостями может вызвать артефакты или ложноотрицательные результаты.

А.5 Демонстрация *Т*-клеток с помощью проточной цитометрии

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ — Реагент содержит азид натрия (15 ммоль/л). NaN_3 **может реагировать со свинцом или медью, образуя взрывоопасные азиды металлов. При удалении смыть большим объемом воды.**

А.5.1 Моноклональные мышиные античеловеческие *Т*-клетки

Следующая информация относится к моноклональным мышиным античеловеческим *Т*-клеткам:

a) идентичность продукта: моноклональные мышиные античеловеческие *Т*-клетки, CD3;

b) клон: UCHT;

c) иммуноген: человеческие детские тимоциты и лимфоциты от пациента с болезнью Сезари (Sézary);

d) источник антител: очищенные моноклональные мышиные антитела;

e) специфичность: антитело реагирует с *Т*-клетками в тимусе, костном мозге, периферической лимфоидной ткани и крови. Большинство *Т*-клеток опухолей также экспрессируют антиген CD3, но он отсутствует в не *Т*-клеточных лимфоидных опухолях. Согласуется с моделью синтеза антигена в нормальных тимоцитах, наиболее ранним местом определения в опухолевых клетках является цитоплазма клетки;

f) состав:

- 0,05 моль/л Tris/HCl буфер, 15 ммоль/л NaN_3, pH = 7,2, альбумин бычьей сыворотки, массовая доля 1 %;
- изотип Ig: IgG1;
- идентичность легкой цепи: каппа;
- концентрация общего белка: 14,9 г/л;
- очистка Ig: белок А колонка сефарозы;
- чистота: массовая доля приблизительно 95 %;

- молекула конъюгата: флюоресцеин изотиоцианат изомер 1 (FITC);

- (*F/P*)-отношение: *E* 495 нм/*E* 278 нм =1,0 ± 0,1 соответственно молярному отношению FITC/белок приблизительно 5;

g) обращение и хранение: стабильны в течение трех лет после выделения при температуре от 2 °С до 8 °С.

А.5.2 Предназначенное применение

А.5.2.1 Общие положения

Антитело предназначено для применения в проточной цитометрии. Антитело может быть использовано для качественного и количественного обнаружения *Т*-клеток.

А.5.2.2 Тип (типы) материала

Антитело может быть применено на суспензиях свежих и фиксированных клеток, фиксированных ацетоном срезах криостата, на клеточных мазках.

А.5.2.3 Методика исследования реактивности антитела для проточной цитометрии

Детали методики, использованной изготовителем, следующие:

a) Собирают венозную кровь в пробирку, содержащую антикоагулянт.

b) Изолируют одноядерные клетки путем центрифугирования на разделительной среде; в ином случае лизируют эритроциты после стадии инкубации, указанной в перечислении d).

c) Промывают одноядерные клетки дважды с RPMI 1640 или забуференным фосфатом солевым раствором (PBS) (0,1 моль/л фосфата, 0,15 моль/л NaCl, pH = 7,4).

d) К 10 мкл конъюгированным FITC моноклональным мышиным анти-человеческим *Т*-клеткам, реагент CD3, добавляют суспензию клеток, содержащую $1 \cdot 10^6$ клеток (обычно около 100 мл), и перемешивают. Инкубируют в темноте при температуре 4 °С в течение 30 мин [для двойного окрашивания в то же время должно быть добавлено антитело, конъюгированное R-фикоэритрином (RPE)].

e) Промывают дважды PBS + 2 % альбумин бычьей сыворотки; ресуспендируют клетки в соответствующей жидкости для анализа на проточном цитометре.

f) В качестве негативного контроля используют иное моноклональное антитело, конъюгированное FITC (флюоресцеин изотиоцианатом)

g) Фиксируют осажденные клетки, перемешивая с 0,3 мл параформальдегида массовой долей 1 % в PBS. При хранении в темноте при температуре 4 °С фиксированные клетки могут содержаться до двух недель.

h) Проводят анализ на проточном цитометре.

А.5.2.4 Предлагаемое разведение

Антитело должно использоваться для проточной цитометрии в концентрированной форме (10 мкл/тест). Для применении на срезах криостата и мазках клеток антитело должно быть смешано с подходящим разбавителем в соотношении объемов (1 + 50) мкл.

А.5.2.5 Ожидаемые результаты

Антитело обнаруживает CD3 молекулу на поверхности *Т*-клеток. При оценке окрашивания срезов криостатов и мазков клеток продукт реакции должен быть локализован на мембране плазмы.

Окрашивание ткани зависит от обращения и обработки ткани до окрашивания. Неправильная фиксация, замораживание, оттаивание, промывание, высушивание, нагревание, получение срезов или загрязнение другими тканями или жидкостями может вызвать образование артефактов или ложноотрицательные результаты.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных и европейских региональных стандартов национальным стандартам Российской Федерации

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ИСО 31-8	–	*
ИСО 1000	–	*
ЕН 375:2001	–	*
ЕН 376:2001	–	*
* Соответствующий национальный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном центре технических регламентов и стандартов.		

Библиография

[1] The colour index, 3rd ed. The society of dyers and colourists, Bradford, U.K., 1971

[2] Council directive of 27th June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances (67/548/EEC)

[3] ECCLS: Dye standards, Part II.5: Pararosaniline (CI 42500) Histochem J. (1992) 24, pp. 233 – 235

[4] Al Saati T., Clamens S., Cohen-Knafo E., Faye J.C., Prats H. and Coindre J.M., Production of monoclonal antibodies to human oestrogen receptor protein (ER) using recombinant ER (RER), Int J Cancer (1993) 55, pp. 651 – 654

[5] Beverley P.C.L. and Callard R.E., Distinctive functional characteristics of human T lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cell antibody, Eur J Immunol (1981) 11, pp. 329 – 334

[6] Campana D., Thompson J.S., Amlot P., Brown S. and Janossy G., The cytoplasmic expression of CD3antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage, J Immunol (1987) 138, pp. 648 – 655

[7] EC Commission Directive 1976-07-14 76/907/EEC. Off J Eur Comm (1996: no L) 360: pp. 1 - 18 and 405 - 424

[8] EC Commission Directive 1983-07-29 83/467/EEC. Off J Eur Comm (1983: no L) 257, pp. 1 - 33

[9] Erber W.N., Pinching A.J. and Mason D.Y., Immunocytochemical detection of T cell and B cell populations in routine blood smears, Lancet (1984) 1, pp. 1042 – 1045

[10] Erber W.N., Mynheer L.C. and Mason D.Y., APAAP Labelling of blood and bone-marrow samples for phenotyping leukaemia, Lancet (1986) 1, pp. 761 – 765

[11] Hoyer P.E., Lyon H., Jakobsen P. and Andersen A.P., Standardized Methyl Green-Pyronin Y procedures using pure dyes, Histochem J (1986) 18, pp. 90 - 94

[12] Jakobsen P., Andersen A.P. and Lyon H., Preparation and characterization of methyl green tetrafluoroborate, Histochemistry (1984) 81, pp. 177 – 179

[13] and assay of pure pyronin Y, Histochemistry (1984) 81, pp. 99 – 101

[14] Kumar V., Green S., Stack G., Berry M., Jin J.R. and Chambon P., Functional domains of the human oestrogen receptor, Cell (1987) 51, pp. 941 – 951

[15] Lal R.B., Edison L.J. and Chused TM. Fixation and long-term storage of human lymphocytes for surface marker analysis by flow cytometry, Cytometry (1988) 9, pp. 213 – 219

[16] Swerdlow S.H., Angermeier P.A. and Hartman A.L., Intrathymic ontogeny of the T-cell receptor associated CD3 (T3) antigen, Lab Invest (1988) 58, pp. 421 – 427

УДК 64:003:054:006:354 ОКС 11.100 Р20

Ключевые слова: изделия медицинские для диагностики *in vitro*, диагностическими реактивы *in vitro* для окрашивания; красящие вещества, красители, хромогенные реагенты, лектины, флюорохромы, зонды нуклеиновых кислот, антитела

Подписано в печать 01.04.2014. Формат 60x84 1/8.

Усл. печ. л. 1,86. Тираж 31 экз. Заказ 1108

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»,

123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru