

Флуоросферы FLOW-COUNT™

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР 7547053 – 200 тестов

PN 7507992-J



Определение абсолютного количества клеток с использованием проточных цитофлуориметров COULTER® EPICS® XL™/XL-MCL™, Cytomics FC 500 и аналогичных систем

Для диагностики *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Флуоросферы FLOW-COUNT представляют собой флуоресцирующий реагент для прямого определения абсолютного количества и процентного содержания лимфоцитов, клеток субпопуляций лимфоцитов и субпопуляции CD34+ в биологических образцах. Анализ может выполняться с помощью цитофлуориметров EPICS XL/XL-MCL, Cytomics FC 500 и других аналогичных систем проточной цитометрии.

На вкладыше к упаковкам реагентов приводится полная информация по работе с реагентом, включающая назначение, клиническую значимость, а также инструкции по отбору, окрашиванию и лизису образцов при подготовке к анализу методом проточной цитометрии.

ПРИНЦИП ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Общее количество лейкоцитов и процентное содержание лимфоцитов, как правило, высчитываются путем умножения количества лимфоцитов, подсчитанного с помощью автоматизированного гематологического анализатора, на процентное содержание положительно окрашенных клеток, найденной с помощью проточного цитофлуориметра. Данный стандартный (непрямой) метод, однако, имеет значительный межлабораторный разброс результатов.¹⁻⁴ Флуоросферы FLOW-COUNT являются эффективной альтернативой стандартного (непрямого) метода и обеспечивают прямое одноплатформенное определение абсолютного количества клеток. При равных объемах образца и флуоросфер FLOW-COUNT устанавливается соотношение количества клеток в образце и флуоросфер. Затем с помощью анализаторов EPICS XL/XL-MCL, Cytomics FC 500 или аналогичных систем подсчитывается количество клеток интересующей популяции и количество флуоросфер. Поскольку концентрация флуоросфер известна, абсолютное количество клеток определяется по формуле:

$$\text{Абсолютное количество (клеток/мкл)} = \frac{\text{Общее количество подсчитанных клеток}}{\text{Общее количество подсчитанных флуоросфер}} \times \text{Заданная концентрация флуоросфер FLOW-COUNT}$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АБСОЛЮТНОГО КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК

При использовании данного метода на 100 мкл образца добавляется 100 мкл флуоросфер FLOW-COUNT известной концентрации. **Подготовка образца выполняется в соответствии с указаниями на вкладыше к реагентам. Затем в подготовленный образец добавляются флуоросферы FLOW-COUNT.** После проведения анализа с помощью проточного цитофлуориметра, на основании заданной концентрации флуоросфер можно вычислить абсолютное количество клеток (самостоятельно или автоматически с использованием программного обеспечения прибора).

РЕАГЕНТ

Флуоросферы FLOW-COUNT,
Каталожный номер 7547053 - 200 тестов (1 x 20 мл)

СОСТАВ РЕАГЕНТА

Реагент FLOW-COUNT представляет собой полистирольные флуоросферы диаметром 10 мкм (номинально), суспендированные в водной среде с сурфактантом и 1% формальдегидом. Каждая флуоросфера окрашена красителем с длиной волны излучения от 525 до 700 нм при длине волны возбуждения 488 нм. Заданная концентрация (Assayed Concentration) флуоросфер FLOW-COUNT определяется путем многократного тестирования раствора флуоросфер с помощью анализатора частиц COULTER.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТА

Подготовка не требуется. Разведение флуоросфер не требуется. С верхней части флакона необходимо удалить всю алюминиевую фольгу. Перед использованием флуоросферы необходимо тщательно перемешать на вортексе в течение 12 секунд.

ВНИМАНИЕ

1. Реагент FLOW-COUNT содержит 1% формальдегид. Избегайте контакта с кожей и попадания в глаза, поскольку это может иметь необратимые последствия. Не вдыхайте испарения реагента. Используйте соответствующие средства защиты, такие как перчатки и защитные очки.
2. Флуоросферы FLOW-COUNT не требуют предварительной подготовки и используются в том виде, в котором поставляются во флаконе. Не допускается разведение или замораживание флуоросфер FLOW-COUNT. В противном случае, возможно появление недостоверных результатов.
3. С верхней части флакона необходимо удалить всю алюминиевую фольгу, поскольку алюминий вступает в реакцию с формальдегидом, что может сделать реагент непригодным к использованию.
4. Распечатанные флаконы с флуоросферами FLOW-COUNT должны храниться в вертикальном положении, чтобы избежать утечки реагента.
5. Обращайтесь с пробями, образцами и всеми контактирующими с ними материалами, как с потенциально инфекционными. Используйте надлежащие методы утилизации.
6. Никогда не отбирайте пробы и подготовленные образцы через пипетку ртом, не допускайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
7. Не используйте флуоросферы FLOW-COUNT с истекшим сроком годности, указанным на этикетке флакона.
8. Для отбора образцов и флуоросфер используйте точные откалиброванные пипетки прямого вытеснения или степперы. В противном случае возможно получение недостоверных результатов.
9. Для обеспечения точности отбора и дозирования следуйте методике, рекомендованной производителем пипетки. В противном случае возможно получение недостоверных результатов.
10. При хранении флуоросферы FLOW-COUNT осаждаются. Перед использованием необходимо их полностью ресуспендировать. Избегайте слишком интенсивного перемешивания реагента, которое может привести к образованию пузырьков воздуха. Не отбирайте реагент, в котором присутствуют пузырьки, поскольку это может вызвать появление недостоверных результатов.
11. Изменение указанного времени инкубации или перемешивания, или изменение указанной температуры может привести к появлению недостоверных результатов.
12. Подготовленные образцы необходимо проанализировать на проточном цитометре в течение двух или менее часов (см. вкладыши к реагентам) после добавления флуоросфер FLOW-COUNT.
13. Концентрация флуоросфер FLOW-COUNT разных партий различается. Убедитесь в том, что при выполнении абсолютного подсчета используется правильное значение заданной концентрации (Assayed Concentration).

14. Убедитесь в том, что подсчитано не менее 1000 флуоросфер FLOW-COUNT. В противном случае возможно получение недостоверных результатов.
15. При хранении и использовании флуоросфер FLOW-COUNT не подвергайте их воздействию яркого света.
16. Контаминация микроорганизмами может вызвать появление недостоверных результатов.
17. Не допускайте испарения и утечки флуоросфер FLOW-COUNT и образцов, это может привести к получению недостоверных результатов.
18. Не используйте методики подготовки образцов, включающие отмывку, поскольку это может привести к неучтенной потере клеток.
19. При контакте с кожей реагент может вызвать сенсибилизацию.
20. Возможно появление необратимых эффектов.
21. При попадании реагента в глаза немедленно промойте их большим количеством воды и обратитесь к врачу.
22. При работе с реагентом используйте защитную одежду, перчатки, маску и очки.
23. При контакте с реагентом или если вы почувствовали недомогание, немедленно обратитесь за медицинской помощью (если возможно, покажите врачу этикетку реагента).
24. Работайте с реагентом только под вытяжкой.
25. Имеются свидетельства возможного канцерогенного действия реагента.

ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

ЭТО ВАЖНО: Во избежание утечки реагента распечатанные флаконы с флуоросферами FLOW-COUNT должны храниться в вертикальном положении.

При температуре 2 - 8°C реагент стабилен в течение срока годности, указанного на этикетке флакона. Распечатанные флаконы с флуоросферами при хранении в темном помещении при температуре 2 - 8°C стабильны в течение 30 дней. Замораживание реагента не допускается. Избегайте воздействия света. Перед использованием доведите температуру реагента до 20 - 25°C.

После добавления флуоросфер FLOW-COUNT подготовленные образцы стабильны в течение двух или менее часов (см. указания на вкладышах к реагентам).

ПРИЗНАКИ НЕПРИГОДНОСТИ РЕАГЕНТА

Любые изменения внешнего вида суспензии флуоросфер FLOW-COUNT (мутная бесцветная жидкость), а также появление вторичных популяций, содержащих более 20% клеток общей популяции могут свидетельствовать о непригодности реагента.

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Указания по подготовке образцов при выполнении специфических задач приводятся на вкладышах к реагентам.

ОПИСАНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АБСОЛЮТНОГО КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ
Флуоросферы FLOW-COUNT,
Каталожный номер 7547053 - 200 тестов (1 x 20 мл)

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Биологический образец, окрашенный требующимися моноклональными антителами и лизированный с помощью набора реагентов COULTER® IMMUNOPREP™ Reagent System, или

Биологический образец, окрашенный с помощью реагентов Stem-Kit™ и лизированный с помощью раствора 10X NH₄Cl Lysing Solution.
Степпер (100 мкл) и наконечники или

Автосэмплер (пипетка прямого вытеснения) (100 мкл) и наконечники

Таймер
Миксер (вортекс)

Проточный цитофлуориметр EPICS XL/XL-MCL, Cytomics FC 500 или другая аналогичная система проточной цитометрии

ДОБАВЛЕНИЕ ФЛУОРОСФЕР FLOW-COUNT

1. Для выполнения процедуры потребуется пробирка с подготовленным образцом, в которой будет проведен анализ.

ЭТО ВАЖНО

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать точность дозирования при добавлении 100 мкл образца и 100 мкл флуоросфер Flow-Count в пробирку для анализа. См. указания изготовителя пипетки и раздел ПРОВЕРКА ТОЧНОСТИ ПИПЕТИРОВАНИЯ.

2. Перемешайте флуоросферы Flow-Count на вортексе в течение 10 – 12 секунд. Чтобы свести к минимуму образование пузырьков воздуха, не перемешивайте реагент слишком долго.

3. Добавьте в пробирку для анализа 100 мкл флуоросфер Flow-Count. Раствор не должен содержать пузырьков воздуха.

4. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 5 секунд. Раствор не должен подниматься выше половины пробирки. Необходимо провести повторное перемешивание непосредственно перед выполнением анализа.

5. Повторите шаги 1 - 4 для всех анализируемых образцов.

ЭТО ВАЖНО

Подготовленные образцы необходимо проанализировать на проточном цитометре в течение двух часов после добавления флуоросфер Flow-Count. При выполнении некоторых задач время, в течение которого можно провести анализ образцов после добавления флуоросфер, может быть меньше. Эта информация приводится на вкладышах к реагентам.

ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЯ ОБРАЗЦОВ

Инструкции по выполнению анализа приводятся на вкладышах к реагентам и в руководствах к анализаторам.

1. Убедитесь в том, проточный цитофлуориметр настроен, выполнена стандартизация светорассеяния и флуоресценции, установлены параметры компенсации флуоресценции. См. соответствующие руководства к анализатору.

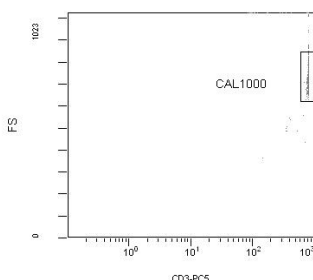
2. Создайте диаграммы в соответствии с указаниями руководства.

3. Создайте дополнительную двухпараметровую диаграмму с осями FL4 LOG (FL3 LOG, FL2 LOG или FL1 LOG) и FS (Светорассеяние в прямом направлении) или TIME (Время). См. рисунок 1. Создайте прямоугольное (или эквивалентное) выделение вокруг флуоросфер FLOW-COUNT (в верхнем правом углу) и назовите его CAL.

4. Введите заданную концентрацию (Assayed Concentration) флуоросфер FLOW-COUNT, указанную на вкладыше к упаковке реагента. Как ввести заданную концентрацию (или калибровочный коэффициент – CAL Factor), описывается в руководстве для вашего прибора.

Рисунок 1

Пример диаграммы анализа флуоросфер FLOW-COUNT, полученной с помощью проточного цитофлуориметра Cytomics FC 500.



ЭТО ВАЖНО

Убедитесь в том, что регион CAL полностью включает основную популяцию флуоросфер FLOW-COUNT (синглетные события), но исключает дубли (события с очень большим светорассеянием в прямом направлении), а также в том, что используется верное значение заданной концентрации.

5. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе в течение 5 секунд. Раствор не должен подниматься выше половины пробирки.

6. Проанализируйте подготовленный образец с помощью проточного цитофлуориметра.

ЭТО ВАЖНО

Убедитесь в том, что было подсчитано не менее 1000 флуоросфер Flow-Count.

ПРОВЕРКА ТОЧНОСТИ ПИПЕТИРОВАНИЯ

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать точность отбора и дозирования образцов и флуоросфер Flow-Count. Чтобы проверить точность пипетирования, следуйте приведенным ниже указаниям.

1. Поставьте пробирку в держателе на аналитические весы.

2. Обнулите показания весов.

3. Следуя инструкциям изготовителя пипетки, внесите 100 мкл образца или флуоросфер Flow-Count в пробирку.

4. Запишите массу пробирки, держателя и внесенного раствора.

5. Обнулите показания весов.

6. Повторите шаги 3 – 5. Необходимо взвесить, как минимум, 10 растворов флуоросфер FLOW-COUNT или 10 образцов.

7. Вычислите среднее, среднеквадратическое отклонение (± 1 SD) и коэффициент вариации (% CV).

8. Коэффициент вариации (% CV) должен быть $\leq 2.0\%$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АБСОЛЮТНОГО КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК

Чтобы определить абсолютное количество клеток, необходимо ввести заданную концентрацию флуоросфер FLOW-COUNT при создании региона CAL. См. пункт 3 в разделе ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЯ ОБРАЗЦОВ. При подсчете не менее 1000 флуоросфер будет автоматически вычислено абсолютное количество клеток по следующей формуле:

$$\text{Абсолютное количество (клеток/мкл)} = \frac{\text{Общее количество подсчитанных клеток}}{\text{Общее количество подсчитанных флуоросфер}} \times \text{Заданная концентрация флуоросфер Flow-Count}$$

Если выполнялось разведение образца, полученный по данной формуле результат должен быть пересчитан с учетом соответствующего коэффициента разведения.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для получения достоверных результатов необходимо регулярно выполнять калибровку пипеток в соответствии с рекомендациями изготовителя. Убедитесь в том, проточный цитофлуориметр настроен, выполнена стандартизация светорассеяния и флуоресценции, установлены параметры компенсации флуоресценции.

Инструкции по выполнению контроля качества см. в руководстве к используемому прибору.

Информацию о контроле качества реагентов см. на вкладышах к упаковкам реагентов.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. При работе с флуоросферами FLOW-COUNT для лизирования можно использовать только реагенты IMMUNOPREP или раствор 10X NH₄Cl Lysing Solution (только с реагентами Stem-Kit). Другие способы лизиса не допускаются.

2. Добавление органических растворителей или растворов высокой ионной силы может привести к необратимому увеличению размеров флуоросфер FLOW-COUNT или их агрегации.

3. Подготовленные образцы необходимо проанализировать на проточном цитофлуориметре в течение двух или менее часов после добавления флуоросфер FLOW-COUNT.

4. Дополнительные ограничения, связанные с использованием проточного цитофлуориметра, см. в руководствах по эксплуатации прибора.

5. Дополнительные ограничения, связанные с использованием реагентов, см. на вкладышах к упаковкам реагентов.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

ТОЧНОСТЬ МЕТОДА

См. специальный вкладыш.

ЛИНЕЙНОСТЬ

См. специальный вкладыш.

ПОГРЕШНОСТЬ

См. специальный вкладыш.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rumke CL. 1995. The imprecision of the ratio of two percentages observed in differential white blood cell counts: A warning. Blood Cells 11:137-140.

2. Rumke CL. 1995. Imprecision of the ratio-derived differential leukocyte counts. Blood Cells 11:311-314.

3. Koeperke JA and Landay AL. 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol 52:19-27.

4. Malone JL, Simms TE, Gray GC, Wagner KF, Burge JR and Burke DS. 1990. Sources of variability in repeated T-helper lymphocyte counts from human immunodeficiency virus Type 1-infected patients: Total lymphocyte count fluctuations and diurnal cycle are important. J AIDS 3:144-151.

ЗАКАЗ РЕАГЕНТА

Флуоросферы FLOW-COUNT,
Каталожный номер 7547053 – 200 тестов (1 x 20 мл)

За дополнительной информацией, а также при получении поврежденного товара, обращайтесь в местное представительство компании Beckman Coulter. Телефон в США 800-526-7694.

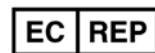
ТОРГОВЫЕ ЗНАКИ

Логотип Beckman Coulter, COULTER, EPICS, FLOW-COUNT, IMMUNOPREP, Stem-Kit, XL и XL-MCL являются зарегистрированными торговыми знаками компании Beckman Coulter, Inc.

Реагент FLOW-COUNT защищен патентом США 5,451,525.



Beckman Coulter, Inc.
4300 N. Harbor Blvd.
Fullerton, CA 92835
www.beckmancoulter.com



Beckman Coulter Ireland Inc.
Mervue Business Park,
Mervue, Galway,
Ireland (353 91 774068)

Распечатано в России
Изготовлено в США

© 2004 Beckman Coulter, Inc.
Авторские права защищены.