



ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ  
IN VITRO



Спецификации готового к использованию лизирующего реагента OptiLyse C

Состояние	Буферный раствор, содержащий 1.5% формальдегид
Объем	100 мл
Количество флаконов	1 флакон
Объем для одного исследования	0.5 мл

### НАЗНАЧЕНИЕ

Данный реагент предназначен для лизиса эритроцитов при подготовке биологических образцов к цитометрическому анализу. Реагент используется после окрашивания лейкоцитов флуоресцирующими антителами. OptiLyse C используется только в системах Beckman Coulter, при этом отмывка образца не выполняется при условии использования надлежащим образом откалиброванных флуоресцирующих антител.

### ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Биологические образцы инкубируются с раствором OptiLyse C, что приводит к лизису эритроцитов и фиксации состояния лейкоцитов. Первоначально выполняется специфическое окрашивание лейкоцитов путем инкубации образца с антителами. Затем в результате лизиса эритроциты удаляются, а зафиксированные на этом этапе лейкоциты анализируются на проточном цитофлуориметре.

Подготовленный образец необходимо хранить при температуре 2 - 8°C, анализ следует выполнять вскоре после подготовки. Отмывка образца не требуется.

Проточный цитометр измеряет светорассеяние и флуоресценцию клеток. Он позволяет выделить интересующую популяцию на диаграмме, отображающей светорассеяние в боковом направлении (Side Scatter или SS) и светорассеяние в прямом направлении под малыми углами (Forward Scatter или FS). Для выбора анализируемых популяций в различных приложениях можно использовать другие двухпараметровые диаграммы.

Прибор выполняет анализ флуоресценции выбранной популяции, распознавая окрашенные и неокрашенные клетки. Результат представляется в виде процентного содержания положительных клеток от всех клеток выбранной популяции.

### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагент OptiLyse C хранится при температуре 18 - 25°C.

Стабильность нераспечатанного реагента приводится на этикетке флакона.

Стабильность распечатанного реагента 90 дней.

### ВНИМАНИЕ

1. Не используйте реагент с истекшим сроком годности.
2. Не храните в холодильнике и не замораживайте реагент.
3. Воздействие света в ходе инкубации необходимо свести к минимуму.
4. Избегайте контаминации микроорганизмами, в противном случае возможно получение недостоверных результатов.
5. Формальдегид - токсичное и аллергенное вещество, потенциальный канцероген. Никогда не отбирайте его через пипетку ртом, не допускайте контакта с кожей, слизистой оболочкой, глазами, избегайте попадания на одежду.
6. Все образцы крови следует рассматривать как потенциально инфицированные. При

работе с ними необходимо соблюдать все меры предосторожности (в частности, использовать защитные перчатки, халат и очки).

7. После завершения работы пробирки с кровью и все одноразовые материалы необходимо поместить в специальные контейнеры для утилизации.

### ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь или образцы костного мозга необходимо отобрать в стерильные пробирки с солью EDTA, цитратом декстрозы (ACD) или гепарином в качестве антикоагулянта.

Образцы должны храниться при комнатной температуре (18 - 25°C). Встряхивание образцов не допускается. Перед отбором аликвоты образец следует гомогенизировать, аккуратно перемешав.

Анализ образцов необходимо выполнить в течение 24 часов после отбора.

### МЕТОДИКА

#### НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Пробирки и материалы для отбора проб. Автоматические пипетки с одноразовыми наконечниками на 20, 100, 500 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки для гемолиза.
- Калибровочные частицы: флуоросферы Flow-Set™ (кат. № 6607007).
- Специфические флуоресцирующие антитела.
- Изотипические контроли.
- Буфер (PBS: 0.01 M фосфат натрия; 0.145 M хлорид натрия; pH 7.2).
- Реагент для фиксации лейкоцитов. Например: IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800).
- Центрифуга.
- Миксер (вортекс).
- Проточный цитофлуориметр.

### ПОДГОТОВКА ПРОБ

Концентрация лейкоцитов в образце должна быть меньше  $10^4$  клеток/мкл ( $10^{10}$ /л). При необходимости разведите образец PBS до концентрации лейкоцитов  $5 \times 10^3$  / мкл ( $5 \times 10^9$ /л).

Концентрация эритроцитов в образце должна быть меньше  $6 \times 10^9$ /мкл ( $6 \times 10^{12}$ /л), рекомендуется развести образец PBS до концентрации эритроцитов  $5 \times 10^8$ /мкл.

При коррекции концентрации как лейкоцитов, так и эритроцитов необходимо использовать большее разведение. Для анализа в пробирку отбирается 100 мкл как разведенного, так и неразведенного образца.

### ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ ПРОБ

#### Подготовка реагента

Подготовка не требуется. Используйте раствор OptiLyse C непосредственно из флакона.

#### Процедура

При исследовании любого образца необходимо также проанализировать контрольный образец (исследуемый образец плюс изотипический контроль, соответствующий специфическому окрашиванию).

**ЗАМЕЧАНИЕ:** Процедура окрашивания и лизиса без отмывки, описанная в пунктах 1-9, применяется при использовании надлежащим образом откалиброванных флуоресцирующих антител.

1. В пробирки для анализа клинических образцов добавьте рекомендованное производителем количество конъюгатов антител, необходимых для окрашивания  $5 \times 10^5$  лейкоцитов.
  2. В пробирки для анализа контролей добавьте рекомендованный производителем объем изотипического контроля, необходимый для окрашивания  $5 \times 10^5$  лейкоцитов.
  3. В пробирки для анализа образцов и для анализа изотипических контролей добавьте по 100 мкл образца (разведенного или неразведенного). Аккуратно перемешайте на вортексе.
  4. Инкубируйте в соответствии с указаниями инструкции к используемым антителам.
  5. Добавьте 0.5 мл реагента OptiLyse C и немедленно перемешайте на вортексе в течение 1 секунды.
  6. Инкубируйте по меньшей мере 10 минут при комнатной температуре ( $18 - 25^{\circ}\text{C}$ ) в защищенном от света месте.
  7. Добавьте 0.5 мл PBS. Перемешайте на вортексе.
  8. Инкубируйте по меньшей мере 5 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.
  9. Проанализируйте образцы в проточном цитофлуориметре.
- ЗАМЕЧАНИЕ:** Если требуется выполнить отмывку, перед анализом выполните шаги 10 и 11.
10. Отцентрифугируйте в течение 5 минут при  $300 \times g$  при комнатной температуре.
  11. Удалите супернатант аспирацией. Ресуспендируйте осадок клеток в 0.5 или 1 мл PBS с 0.1% раствором формальдегида. Данный раствор можно получить разведением 12.5 мкл реагента IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800) в 10-кратной концентрации в 1 мл PBS.

**ЗАМЕЧАНИЕ:** Независимо от способа подготовки, подготовленные пробы необходимо хранить при температуре  $2 - 8^{\circ}\text{C}$  в защищенном от света месте. Анализ следует провести в течение 24 часов.

## СПЕЦИАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### ЧИСТОТА И ВЫХОД ЛИМФОЦИТОВ

Чистота и выход лимфоцитов оценивались в соответствии с рекомендациями Центров по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) (1). Образцы крови 10 здоровых доноров были отобраны с использованием  $\text{K}_3\text{EDTA}$  и помечены смесью моноклональных антител CD45-FITC и CD14-PE, откалиброванных для выполнения безотмывочного окрашивания и лизиса. В следующей таблице приводятся средние значения выхода и чистоты лимфоцитов, а также диапазоны значений:

Выход (%)	Чистота (%)
96.8	94.8
96.2 / 97.3	94.3 / 95.1

**ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ  
ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ**

В один день на одном цитометре определялась средняя интенсивность флуоресценции, СИФ (в процентах) CD45+CD14- лимфоцитов в одном образце (в цельной крови здорового донора). Измерение выполнялось 12 раз. Отмывка после окрашивания и лизиса не использовалась. Полученные результаты суммированы в следующей таблице:

Цельная кровь	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD45+CD14- лимфоциты (%)	12	99.9	0.04	0.0
CD45+CD14- лимфоциты (СИФ)	12	30.78	0.28	0.9

**МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ  
ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ**

В один день на **двух цитометрах** определялось процентное содержание и средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) CD45+CD14- лимфоцитов в одном образце (в цельной крови здорового донора). Измерение выполнялось 12 раз. Отмывка после окрашивания и лизиса не использовалась. Полученные результаты суммированы в следующих таблицах:

**Цитометр # 1**

Цельная кровь	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD45+CD14- лимфоциты (%)	12	99.9	0.04	0.0
CD45+CD14- лимфоциты (СИФ)	12	30.78	0.28	0.9

**Цитометр # 2**

Цельная кровь	Количество измерений	Среднее (%)	SD	CV (%)
CD45+CD14- лимфоциты (%)	12	99.0	1.49	1.5
CD45+CD14- лимфоциты (СИФ)	12	37.65	0.20	0.5

**ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ**

1. При **неправильной** настройке цитофлуориметра, неверной компенсации флуоресценции и **неправильном** расположении регионов могут быть получены **недостоверные** результаты.
2. Для получения точных и воспроизводимых результатов необходимо соблюдать все приведенные инструкции и следовать нормам лабораторной работы.
3. При гиперлейкоцитозе разведите образец PBS так, чтобы получить примерную концентрацию лейкоцитов  $5 \times 10^9/л$ .
4. При полиглобулинемии разведите образец PBS так, чтобы получить примерную концентрацию эритроцитов  $5 \times 10^{12}/л$ .
5. Перед использованием необходимо довести температуру реагента OptiLyse C до комнатной (18 - 25 °C).
6. Визуально проверьте эффективность лизиса. Если образцы мутные, а также в том случае, если на диаграмме светорассеяния заметно необычное распределение, возможно, произошел неполный лизис.
7. Эритробласты могут лизироваться не полностью и появляться на диаграмме светорассеяния в зоне лейкоцитов.

8. При некоторых заболеваниях, таких как тяжелая почечная недостаточность или гемоглобинопатии, лизис эритроцитов может происходить медленно, не полностью или совсем не происходить. В этом случае перед окрашиванием рекомендуется выделить мононуклеарные клетки в градиенте плотности (например, фикола).

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ**

В приложении приводится список литературы и примеры диаграмм.

**ТОРГОВЫЕ ЗНАКИ**

Логотип Beckman Coulter, COULTER, EPICS, EXPO, Flow-Set, IOTest, System II, XL являются зарегистрированными торговыми знаками компании Beckman Coulter Inc.

**ИЗГОТОВЛЕНО:**

IMMUNOTECH S.A.  
a Beckman Coulter Company  
130 avenue de Lattre de Tassigny  
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9  
France

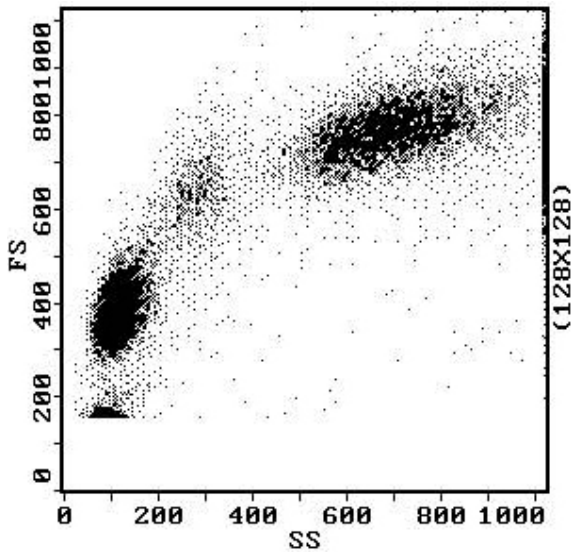
Отдел по работе с клиентами: (33) 4 91 17 27 27

[www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com)



**ПРИМЕРЫ ДИАГРАММ**

Ниже показана двухпараметровая диаграмма (светорассеяние в прямом направлении – светорассеяние в боковом направлении), полученная при анализе образца нормальной цельной крови, лизированного с помощью реагента OptiLyse C (кат. № А11895). Отмывка образца не проводилась.



Считывание и анализ данных выполнены с помощью проточного цитофлуориметра COULTER® EPICS® XL™ в программном обеспечении System II™.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Nicholson, J.K.A., Hearn, T.L., Cross, G.D., White, M.D., "1997 revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV)", 1997, MMWR 46, RR-21-29.
2. Ashmore, L.M., Shopp, G.M., Edwards, B.S., "Lymphocyte subset analysis by flow cytometry. Comparison of three different staining techniques and effects of blood storage", 1989, J. Immunol. Methods, 118, 209-215.
3. Macey, M.G., McCarthy, D.A., Milne, T., Cavenagh, J.D., Newland, A.C., "Comparative study of five commercial reagents for preparing normal and leukaemic lymphocytes for immunophenotypic analysis by flow cytometry", 1999, Communications Clinical Cytometry, 38, 153-160.
4. Macey, M.G., McCarthy, D.A., van Agthoven, A., Newland, A.C., "How should CD34+ cells be analysed? A study of three classes of antibody and five leucocyte preparation procedures", J. Immunol. Methods, 204, 175-188.
5. Vuorte, J., Jansson, S-E., Repo, H., "Evaluation of red blood cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH assay", 2001, Cytometry, 43, 290-296.