

Комплект для подсчёта LeukoSure

Для подсчёта белых клеток крови в пробах крови со сниженным числом лейкоцитов

REF 175621 - 200 тестов

REF 6607124 - 200 тестов

Ч.№ 175624-EA



IVD

НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект для подсчёта LeukoSure состоит из набора реагентов, используемых для подготовки и подсчёта с помощью проточной цитометрии белых клеток крови в пробах красных клеток крови и тромбоцитов с пониженным числом лейкоцитов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Для предотвращения разнообразных опасных последствий переливания крови, продукты крови, содержащие красные клетки крови (RBC) и тромбоциты обрабатываются для удаления белых клеток крови (WBC).¹ На настоящий момент допустимым уровнем остаточных WBC считается менее 3,3 WBC/ μ L на единицу упаковки крови в 300 mL.^{2,3} Большинство стандартных методов подсчёта не регистрирует такие значения.⁴ Комплект для подсчёта LeukoSure создан для использования чувствительности проточной цитометрии для подсчёта остаточных лейкоцитов на уровне значений, необходимом для обеспечения контроля качества крови со сниженным числом лейкоцитов.^{5,6}

ПРИНЦИПЫ ТЕСТИРОВАНИЯ

Образец лизируется и проводится через процедуру повышения проницаемости мембран с использованием лизирующего реагента LeukoSure для уничтожения красных клеток крови и подготовки клеток для последующего добавления красящего реагента LeukoSure, содержащего йодид пропидия и РНКазу (для удаления рибонуклеиновой кислоты, или РНК). В отсутствие РНК, йодид пропидия связывается только с двухцепочечной дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК), таким образом, что ядродержащие клетки в пробе флуоресцируют с интенсивностью, пропорциональной содержанию в них ДНК. Проточный цитометр измеряет флуоресценцию каждой помеченной клетки по мере ее прохождения сквозь лазерный луч. Так как зрелые тромбоциты и красные клетки крови не содержат ДНК, помеченные клетки будут представлять лейкоцитарный компонент крови.

Метод подсчёта зависит от смешивания пробы флуоросфер LeukoSure известного объёма (100 μ L) и концентрации с равным объёмом тестируемой пробы. После анализа проводится абсолютный подсчет образца, дающий абсолютное число лейкоцитов в пробе.

ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ РЕАКТИВЫ

Комплект для подсчёта LeukoSure

REF 175621 (200 тестов)

Лизирующий реагент LeukoSure, 1 x 20 mL

Красящий реагент LeukoSure, 2 x 70 mL

Флуоросферы LeukoSure, 1 x 20 mL

СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Лизирующий реагент LeukoSure содержит <0,1% цианида калия, <0,1% NaN₃, неионогенные детергенты, физиологический раствор и стабилизаторы.

Красящий реагент LeukoSure содержит 50 μ g/mL йодида пропидия (<0,5% йодида пропидия), РНКазу [Тип III-A, бычья поджелудочная железа] (4 KU/mL), <0,1% NaN₃, физиологический раствор и стабилизаторы.

Флуоросферы LeukoSure состоят из 10 μ m (номинальный диаметр) полистироловых флуоросфер в среде для водной суспензии, содержащей сурфактант и 1% формальдегид. Аналитическая концентрация флуоросфер LeukoSure получена по результатам многочисленных повторных анализов на анализаторе размеров частиц COULTER Model Z 1/Z2.

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ

Йодид пропидия	Возбуждается светом длиной волны 488 нм Светоизлучает на длине волны 560-630 нм.
Флуоросферы LeukoSure	Светоизлучает на длине волны 525-700 нм. Возбуждается светом длиной волны 488 нм

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

- Красящий реагент LeukoSure содержит йодид пропидия. Йодид пропидия является мутагеном и, предположительно, канцерогеном, и при работе с ним следует соблюдать все меры предосторожности. При работе с этим реагентом следует всегда носить непроницаемые для жидкостей перчатки.
- Лизирующий реагент LeukoSure содержит цианид калия. Контакт этого реагента с кислотой может привести к высвобождению ядовитого газа. Избегайте контакта с кислотой.
- Красящий и лизирующий реагенты LeukoSure содержат азид натрия. Азид натрия в кислотной среде образует азотистоводородную кислоту, являющуюся исключительно токсичным соединением. Во время утилизации соединения азидов следует смывать проточной водой. Рекомендуется соблюдение этих предосторожностей для избежания образования отложений в металлических трубах, что может создавать взрывоопасные условия. При попадании в глаза или на кожу, незамедлительно тщательно промойте водой.
- Флуоросферы LeukoSure содержат 1% формальдегид. Избегайте попадания в глаза и на кожу, так как формальдегид может необратимо повредить эти ткани. Не вдыхайте пары. Пользуйтесь соответствующей защитой, такой как перчатки и защита для глаз.
- Следует удалить весь алюминий от термосваренного покрытия с верха флакона с флуоросферами LeukoSure. Остатки алюминия могут прореагировать с формальдегидом и вызвать изменение в свечении флуоросфер.
- Чтобы избежать получения ошибочных результатов после вскрытия флуоросферы LeukoSure следует хранить тщательно закрытыми в вертикальном положении для предотвращения испарения или утечки.
- Флуоросферы LeukoSure оседают в течение долгого времени. Перед использованием убедитесь, что флуоросферы полностью ресуспендированы. Избегайте чрезмерного перемешивания для минимизации возможности возникновения пузырьков воздуха. Чтобы избежать

получения ошибочных результатов, не пипетируйте пузыри воздуха.

- Чтобы избежать получения ошибочных результатов, используйте откалиброванную пипетку с позитивным вытеснением или пипетку повтора для подачи компонентов крови со сниженным числом лейкоцитов и LeukoSure флуоросфер.
- Чтобы избежать получения ошибочных результатов, для точного и аккуратного пипетирования образца со сниженным числом лейкоцитов и флуоросфер LeukoSure пользуйтесь техниками пипетирования, рекомендованными производителем пипетки.
- Каждая партия флуоросфер LeukoSure имеет определённую концентрацию флуоросфер. При определении абсолютного количества клеток-мишеней убедитесь, что используете правильную аналитическую концентрацию.
- Чтобы избежать получения ошибочных результатов, убедитесь в том, что сосчитаны, по крайней мере, 10 000 флуоросфер LeukoSure.
- С образцами, пробами и всеми материалами, с ними соприкасающимися, следует работать как с потенциально передающими инфекцию и утилизировать их с соответствующими мерами предосторожности.
- Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.
- Помеченные и лизированные пробы следует анализировать на проточном цитометре в пределах 2 или менее часов после добавления флуоросфер LeukoSure.
- Не используйте реагент после даты истечения срока годности, указанной на этикетке флакона.
- Минимизируйте воздействие света на реагент при хранении или инкубации.
- Избегайте бактериального заражения реагентов, так как оно может привести к ошибочным результатам.
- Следуйте надлежащей лабораторной практике (GLP) при работе с этими реагентами.
- Существуют отдельные свидетельства наличия канцерогенного эффекта.
- При попадании на кожу может вызывать сенсibilизацию.
- Используйте соответствующую защитную одежду, перчатки и средства защиты глаз и лица.
- При попадании в глаза немедленно промойте их большим количеством воды и обратитесь к врачу.
- Используйте только в хорошо вентилируемых зонах.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовки не требуется. Используйте реагенты комплекта для подсчёта LeukoSure прямо из флаконов. Смешивайте флуоросферы LeukoSure на вихревом смесителе от 10 до 12 секунд. Подождите, пока рассеются пузыри воздуха, прежде чем пипетировать из флакона. Следует удалить весь алюминий от термосваренного покрытия с верха флакона с флуоросферами LeukoSure.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- При хранении при 2-8°C реагенты комплекта для подсчёта LeukoSure сохраняют стабильность до истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.
- Открытые флаконы с красящим и лизирующим реагентами LeukoSure сохраняют стабильность в течение 60 дней.
- Открытые флаконы с флуоросферами LeukoSure сохраняют стабильность в течение 30 дней.

ПРИМЕЧАНИЕ: Открытые флаконы с флуоросферами LeukoSure следует хранить в вертикальном положении во избежание утечки.

ПРИМЕЧАНИЕ: При возникновении необходимости в дополнительных флуоросферах LeukoSure, заказывайте флуоросферы LeukoSure, Ч.№ 6607124.

4. Реагенты комплекта подсчёта LeukoSure перед использованием следует довести до комнатной температуры (20-25°C).
5. Не замораживайте.
6. Минимизируйте воздействие света.

ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любое внешнее изменение этих реагентов или значительные колебания значений, полученных на контрольных пробах, могут указывать на разрушение реагентов, и в таком случае их не следует использовать.

В норме красящий реагент LeukoSure выглядит как прозрачная жидкость розово-красного цвета.

В норме лизирующий реагент LeukoSure выглядит как прозрачная жидкость светло-коричневого цвета. Неспособность этого реагента к лизису красных клеток крови может указывать на его разрушение.

В норме флуоросферы LeukoSure выглядят как мутная бесцветная жидкость. Появление в процессе анализа вторичных флуоресцирующих популяций, составляющих более 20% всей популяции может указывать на разрушение реагента.

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

Пробы красных клеток крови, собранные в CPD (цитрат фосфат декстрозе), CPDA (цитрат фосфат декстрозе аденина) или CPD2 (CPDA с Adsol), следует хранить охлаждёнными (2-8°C) до проведения тестов. Пробы тромбоцитов, собранные в ACD (кислой цитрат декстрозе), следует хранить при комнатной температуре (20-25°C) до проведения тестов. Пробы следует окрашивать в течение 48 часов после снижения числа лейкоцитов.

Окрашенные пробы следует хранить при 2-8°C.

Пробы, окрашенные в пределах 24 часов после снижения числа лейкоцитов, можно анализировать в течение последующих 24 часов после мечения. Пробы, окрашенные после 24 часов и вплоть до 48 часов после снижения числа лейкоцитов, следует анализировать в течение 2 часов после мечения.

Перед проведением анализа доведите помеченные пробы до комнатной температуры.

После добавления флуоросфер LeukoSure, пробы сохраняют стабильность в течение 2 часов.

ПРОЦЕДУРА

ПРЕДОСТАВЛЕННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Комплект для подсчёта LeukoSure
REF 175621 - 200 тестов

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Пипетка повтора (100 µL) и наконечники

или

Пипетка с позитивным вытеснением (100 µL) и наконечники

Таймер

тест-пробирки 12 x 75 mm

Вихревой смеситель

Проточный цитометр

Флуоросферы Flow-Set, Ч.№ 6607007

Флуоросферы Flow-Check, Ч.№ 6605359

Изотонический раствор IsoFlow, Ч.№ 8547008

Очиститель COULTER CLENZ, Ч.№ 8546929

Комплект контроля тромбоцитов Leuko-Trol, Ч.№ 175651

или

Клетки контроля RBC Leuko-Trol, Ч.№ 175658

ПРИМЕЧАНИЕ: При возникновении необходимости в дополнительных флуоросферах LeukoSure, заказывайте флуоросферы LeukoSure, Ч.№ 6607124.

ПРОЦЕДУРА ЛИЗИСА И ОКРАШИВАНИЯ

1. Промаркируйте тест-пробирку 12 x 75 mm для тестирования каждого образца или клеток контроля Leuko-Trol.
2. Внесите в каждую пробирку по 100 µL пробы. Перед тем, как переносить пробу, аккуратно протрите внешнюю поверхность наконечника пипетки, избегая отверстия на кончике.
3. Добавьте 100 µL лизирующего реагента LeukoSure в первую пробирку; немедленно поставьте её перемешиваться в течение 5-10 секунд на вихревом смесителе.
4. Добавьте 500 µL красящего реагента LeukoSure в пробирку; немедленно смешайте на вихревом смесителе.
5. Инкубируйте при комнатной температуре (20-25°C), в темноте, в течение 15 минут.
6. Повторите шаги со 2 по 5 для каждой пробирки с пробой.
7. Перед самым проведением анализа добавьте в каждую пробирку с пробой по 100 µL флуоросфер LeukoSure (пользуясь той же пипеткой, которой пипетировали образец). Перед тем, как переносить пробу, аккуратно протрите внешнюю поверхность наконечника пипетки, избегая отверстия на кончике. Аккуратно смешайте, пользуясь вихревым смесителем.
8. Пробы следует проанализировать в течение 2 часов после добавления флуоросфер LeukoSure.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для получения оптимальных результатов перемежайте прогоны проб прогоном холостой пробирки с изотоническим раствором IsoFlow.

АНАЛИЗ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИЕЙ

Подготовка прибора

1. Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизован для светорассеяния и интенсивности флуоресценции. За инструкциями обратитесь к руководству по изделию или справочнику в сети.
2. Создайте протокол для флуоросфер Flow-Set с однопараметрической гистограммой для светорассеяния (одной для линейного рассеяния вперёд (FS) и другой – для бокового рассеяния (SS)) и тремя параметрами флуоресценции (LOG FL1, LOG FL2 и LOG FL3).
3. Создайте линейную зону в каждой гистограмме.
4. Назначьте зону гистограммы FS в качестве селектора для гистограмм SS и логарифма флуоресценции.
5. Установите компенсацию цвета на 0% для всех параметров флуоресценции.
6. На FL3 установите классификатор на 3.
7. Установите остановку на 10 000 событий для каждой гистограммы флуоресценции.
8. Запустите Flow-Set Fluorospheres для установки напряжений PMT. Целевые значения каналов см. в Таблице настроек целевого приложения Flow-Set Fluorospheres.

Протокол анализа проб

Создайте следующие гистограммы:

1. Создайте гистограмму 1, SS к FS (обращайтесь к Рисунку 1)
2. Создайте гистограмму 2, FL3 к Соотношению (FL3/FL2) (обращайтесь к Рисунку 2)
3. Создайте гистограмму 3, LOG FL1 к Количеству.

Объяснение гистограмм

Гистограмма 1 используется для визуального подтверждения обнаружения за счёт светорассеяния. Гистограмма 2 использует повышенную флуоресценцию лейкоцитов как в FL2, так и в FL3 для получения дополнительных данных для выявления ядросодержащих лейкоцитов среди тромбоцитов, красных клеток крови или обломков клеток. События, лежащие на диагональ этой гистограммы являются неспецифическим дебрисом и выводятся из анализа. Гистограмма 3 предоставляет зону флуоросфер LeukoSure, используемую при вычислении абсолютного количества WBC.

Создание зон

1. Создайте линейную зону CAL (A), содержащую пик флуоросфер LeukoSure в Гистограмме 3.

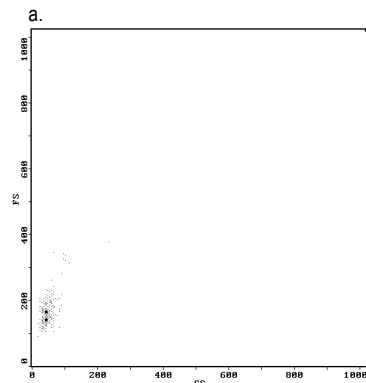
Важно: Убедитесь в том, что зона CAL полностью охватывает синглеты популяции флуоросфер LeukoSure и что была использована правильная аналитическая концентрация x 10.

2. Создайте аморфную зону (B) на Гистограмме 2, чтобы объединить всю популяцию помеченных йодидом пропидия лейкоцитов.
3. В Гистограмме 1 аналитическая зона не нужна.
4. На Гистограммах 1 и 2 для исключения флуоросфер используйте негативный селектор [-A, или NOT (CAL)].
5. Используйте негативный селектор [-B, or NOT (B)] на Гистограмме 3 для подсчёта только флуоросфер. Установите остановку счёта на 10 000 событий для этой гистограммы.

Установки прибора

1. Перед прогоном проб или контроля, установите на FL3 классификатор на 50.
2. Переведите полученные после прогона протокола Flow-Set высокое напряжение и коэффициенты усиления на протокол анализа проб.
3. Установите время остановки на 300 секунд.
4. Пробы можно прогонять с уровнем потока, установленным на HIGH (высокий).
5. Сохраните протокол анализа проб.

Рисунок 1: Гистограмма 1 демонстрирует SS к FS и используется для визуального подтверждения обнаружения. Гистограммы показывают обнаружение Leuko-Trol, тромбоцитов H на EPICS XL/XL-MCL с программным обеспечением System II Version 3.0 (a) и на FC 500 с программным обеспечением RXP b).



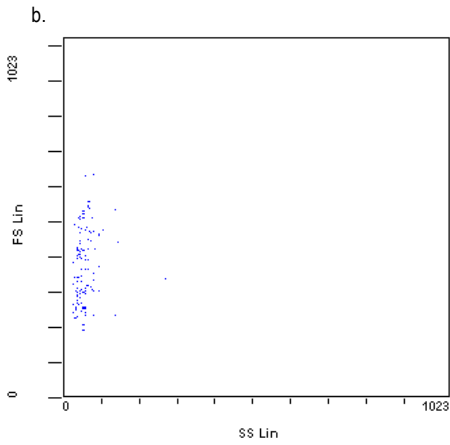
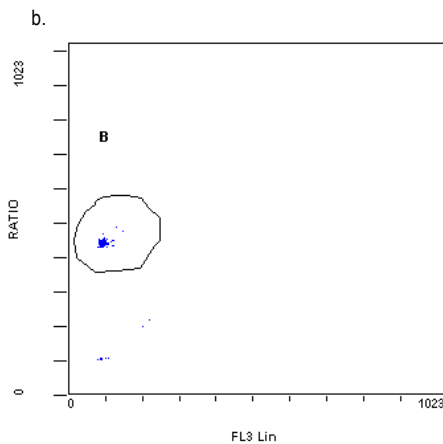
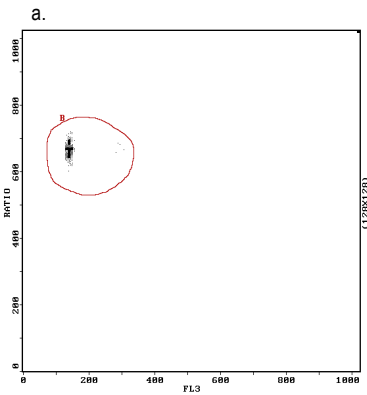


Рисунок 2: Гистограмма 2 демонстрирует is FL3 к соотношению (FL3/FL2), что даёт дополнительный материал для выявления ядросодержащих лейкоцитов среди тромбоцитов, красных клеток или клеточных обломков. События, лежащие на диагональ этой гистограммы являются неспецифическим дебрисом и выводятся из анализа. Гистограммы показывают обнаружение Leuko-Trol, тромбоцитов уровня Н на EPICS XL/XL-MCL с программным обеспечением System II Version 3.0 (a) и на FC 500 с программным обеспечением RXP (b).



Дополнительно доступные гистограммы

Эти гистограммы могут служить дополнительным источником информации при выявлении и оценке нарушений работы. Дополнительные гистограммы демонстрируют как однопараметрические события FL2 и FL3, так и соотношение время к флуоросферам LeukoSure.

1. Создайте гистограмму 4, FL2 к количеству с линейной зоной вокруг пика флуоресценции. Используйте негативный селектор [-A, or NOT (CAL)].
2. Создайте гистограмму 5, FL3 к количеству с линейной зоной вокруг пика флуоресценции. Используйте негативный селектор [-A, or NOT (CAL)].
3. Создайте гистограмму 6, время к LOG FL с прямолинейной зоной вокруг пика флуоресценции флуоросфер LeukoSure. Используйте негативный селектор [-B, or NOT (B)].

Контрольный протокол IsoFlow

Для создания протокола для прогона контрольной пробирки:

1. Сохраните протокол анализа проб как контрольный IsoFlow.
2. Снизьте время остановки до 60 секунд.
3. Сохраните контрольный протокол IsoFlow.

ПРОЦЕДУРА ПРОВЕРКИ ТЕХНИКИ ПИПЕТИРОВАНИЯ

Оптимальные результаты получаются при точном и аккуратном пипетировании и образца, и флуоросфер LeukoSure. Чтобы проверить, является техника пипетирования, использованная для подачи образца и флуоросфер LeukoSure, точной, следуйте описанной ниже процедуре проверки.

1. Поместите тест-пробирку и сосуд для уравнивания на аналитические весы.
2. Настройте значение весов на нуль.
3. Следуя инструкции по пипетированию производителя пипетки, пипетируйте 100 μ L образца или флуоросфер LeukoSure в тест-пробирку.
4. Перед тем, как переносить реагент, чтобы удалить его излишек, аккуратно протрите внешнюю поверхность наконечника пипетки, избегая отверстия на кончике.
5. Запишите вес тест-пробирки, сосуда для уравнивания и перенесённого образца или LeukoSure.
6. Повторяйте шаги с 2 по 4, пока не взвесите по крайней мере 10 образцов или проб флуоросфер LeukoSure.
7. Вычислите среднее, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (% CV) взвешиваний.
8. % CV должен быть $\leq 2,0\%$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АБСОЛЮТНОГО КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

Для определения абсолютного количества на проточных цитометрах EPICS XL/XL-MCL или FC Series, введите аналитическую концентрацию флуоросфер LeukoSure в виде **десятикратного числа** (например, если аналитическая концентрация равна 1004, вы введёте 10040) при именовании зоны в соответствии с 12 шагом инструкции под заголовком АНАЛИЗ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИЕЙ. После того, как сосчитаны по крайней мере 10000 флуоросфер, абсолютное количество клеток-мишеней вычисляется по следующей формуле:

Абсолютное количество (клеток/10 μ L) = (Общее число сосчитанных клеток, делённое на общее число сосчитанных флуоросфер) умноженное на десятикратную аналитическую концентрацию флуоросфер LeukoSure.

Полученный результат исчисляется в WBC/10 μ L. Для перевода значения в WBC/ μ L, разделите его на 10.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Линейность

Были проведены повторные измерения для каждого из 10 последовательных разведений эритроцитов и тромбоцитарных проб с добавкой лейкоцитов для получения динамического диапазона (от 0 до 400 клеток/ μ L) и диапазона чувствительности нижнего края (от 0 до 20 клеток/ μ L). Пробы были подготовлены в соответствии с инструкцией на вкладыше в комплект для подсчёта LeukoSure и проанализированы на проточных цитометрах EPICS XL/XL-MCL и Cytomics FC 500. Полученные значения приведены в виде абсолютного количества (клетки/ μ L).

Угловой коэффициент линий регрессии, связанных с графиком абсолютного количества лейкоцитов показывает математическую меру линейности. Это подтверждается минимальным потенциальным аналитическим отклонением, подтверждённым у-пересечениями для анализов. Ожидаемые абсолютные количества показывают высокую корреляцию с полученными. См. Рисунки с 3 по 6, показывающие динамический диапазон (3, 5) и чувствительность нижнего края (4, 6) проб тромбоцитов и эритроцитов с добавкой лейкоцитов на проточных цитометрах XL/XL-MCL (a) и FC 500 (b).

Рисунок 3: Линейность, динамический диапазон и эритроциты на проточных цитометрах EPICS XL/XL-MCL (a) и Cytomics FC 500 (b).

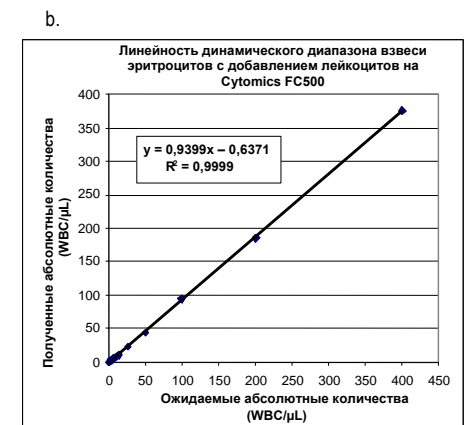
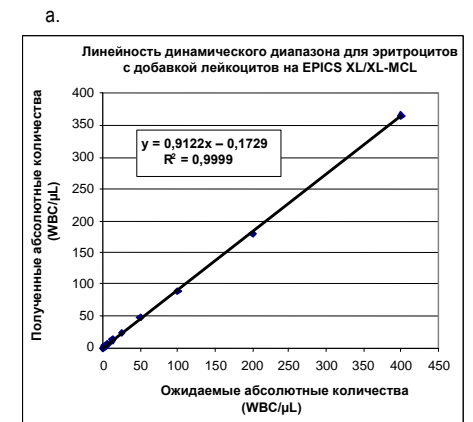


Рисунок 4: Линейность, чувствительность нижнего края и эритроциты на проточных цитометрах EPICS XL/XL-MCL (a) и Cytomics FC 500 (b).

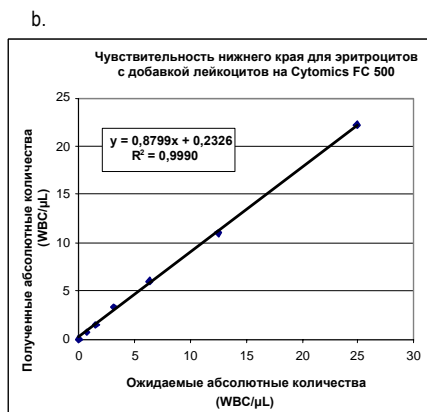
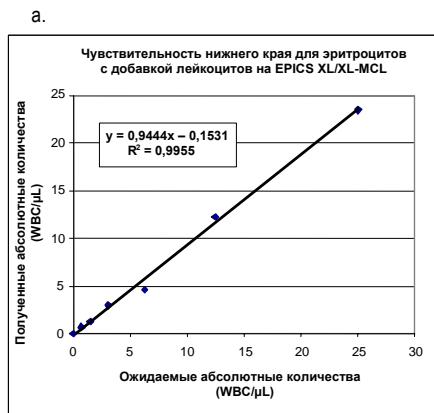


Рисунок 5: Линейность, динамический диапазон и тромбоциты на проточных цитометрах EPICS XL/XL-MCL (a) и Cytomics FC 500 (b).

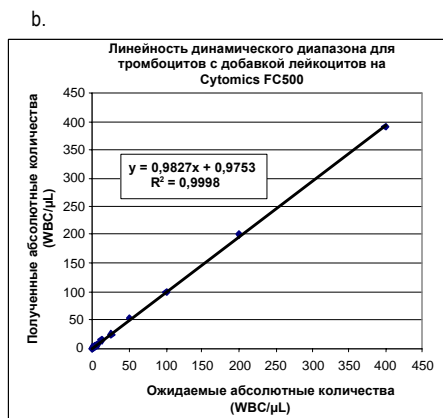
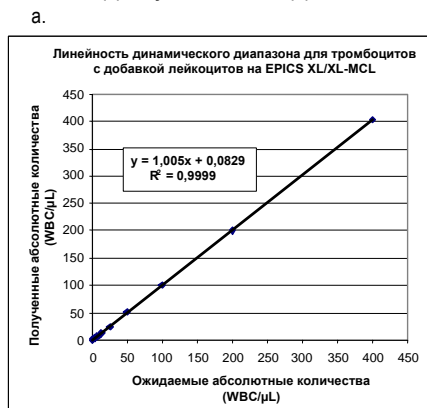
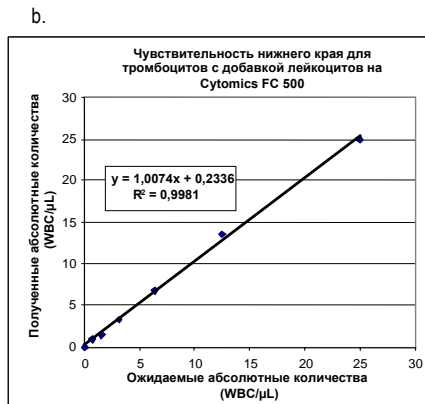
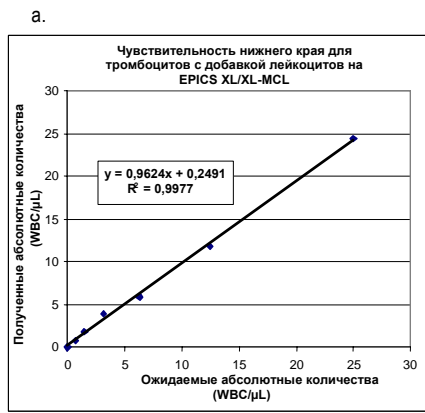


Рисунок 6: Линейность, чувствительность нижнего края и тромбоциты на проточных цитометрах EPICS XL/XL-MCL (a) и Cytomics FC 500 (b).



НАДЕЖНОСТЬ МЕТОДА

Степень надёжности получения абсолютного количества белых клеток крови в пробах эритроцитов и тромбоцитов со сниженным числом лейкоцитов была оценена посредством сравнения комплекта для подсчёта LeukoSure с комплектом LeucoCount (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) в Beckman Coulter, Inc. и двух независимых местах оценки.

Продукты крови со сниженным числом лейкоцитов с эритроцитами и с тромбоцитами были подготовлены в соответствии с инструкциями изготовителей и проанализированы на EPICS XL/XL-MCL и Cytomics FC 500 с использованием комплекта для подсчёта LeukoSure и на проточном цитометре BD FACS Brand с использованием комплекта LeucoCount. Графики этих данных содержатся в рисунках 7 и 8.

Рисунок 7: Надёжность комплекта для подсчёта LeukoSure (EPICS XL/XL-MCL) к комплекту LeucoCount (BD FACS) для проб эритроцитов (a) и тромбоцитов (b).

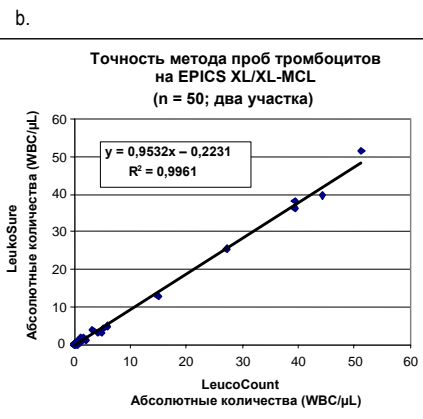
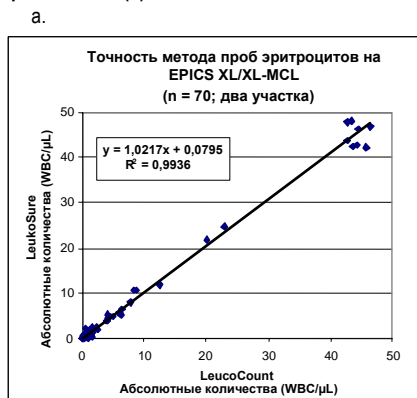
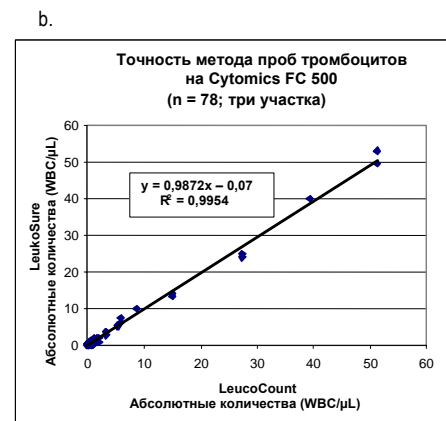
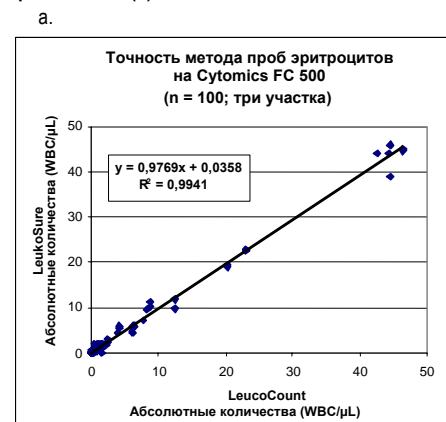


Рисунок 8: Надёжность комплекта для подсчёта LeukoSure (Cytomics FC 500) к комплекту LeucoCount (BD FACS) для проб эритроцитов (a) и тромбоцитов (b).



СХОДИМОСТЬ

Межлабораторная и внутрилабораторная сходимость

Исследования были проведены в один день на трёх разных проточных цитометрах – EPICS XL/XL-MCL, а Cytomics FC 500 и BD FACSCalibur. Для проб эритроцитов и тромбоцитов были подготовлены по четыре образца, перекрывающих динамический диапазон (от 0 до 400 WBC/ μ L). Эти образцы разбивались на три аликвоты, по аликвоте каждой концентрации на каждый проточный цитометр для приготовления проб (n = 10). Полученные значения приведены в виде абсолютного количества (WBC/ μ L).

Результаты изучения межлабораторной и внутрилабораторной сходимости, данные по типу пробы, концентрации и прибору, приведены в таблице 1. Полученные значения показали низкую вариабельность при сравнении приборов и в рамках

типа и концентрации пробы, как можно видеть по средним значениям, а также низкий уровень отклонений значений для повторных измерений. Эти данные показывают сходимость и воспроизводимость результатов комплекта для подсчёта LeukoSure.

Таблица 1: Межлабораторная и внутрилабораторная сходимость

Проба Концентрация	Внутрилабораторная сходимость			Межлабора- торная сходимость
	EPICS XL/XL-MCL	Cytomics FC 500	BD FACSCalibur	Совмещённые

Эритроциты / Низкая

n:	10	10	10	30
Среднее: (WBC/ μ L)	1,1	0,9	1,2	1,1
SD:	0,34	0,30	0,56	0,42

Эритроциты / Низкая-Средняя

n:	10	10	10	30
Среднее: (WBC/ μ L)	4,7	4,7	4,4	4,6
SD:	1,01	0,78	0,67	0,81

Эритроциты / Средняя

n:	10	10	10	30
Среднее: (WBC/ μ L)	48,2	42,9	41,0	44,0
SD:	3,16	1,35	1,91	3,79

Проба Концентрация	Внутрилабораторная сходимость			Межлабора- торная сходимость
	EPICS XL/XL-MCL	Cytomics FC 500	BD FACSCalibur	Совмещённые

Эритроциты / Высокая

n:	10	10	10	30
Среднее: (WBC/ μ L)	437,2	432,8	425,1	431,7
SD:	11,85	9,4	6,7	10,54

Тромбоциты / Низкая

n:	10	10	10	30
Среднее: (WBC/ μ L)	0,4	0,4	0,3	0,4
SD:	0,20	0,27	0,18	0,22

Тромбоциты / Низкая-Средняя

n:	10	10	10	30
Среднее: (WBC/ μ L)	3,6	4,2	4,3	4,0
SD:	0,51	0,78	0,78	0,74

Тромбоциты / Средняя

n:	10	10	10	30
Среднее: (WBC/ μ L)	38,2	37,8	39,6	38,5
SD:	1,73	1,71	2,3	1,0

Тромбоциты / Высокая

n:	10	10	10	30
Среднее: (WBC/ μ L)	383,6	386,7	377,1	382,5
SD:	5,30	7,74	6,46	7,53

Стабильность

- Стабильность проб проверялась путём сравнения проб, помеченных и обработанных в пределах 6 часов после снижения числа лейкоцитов, с пробами, помеченными и обработанными по прошествии от 24 до 48 часов после снижения числа лейкоцитов, и анализированных в пределах 2 часов.
- Стабильность окрашенных проб определялась путём сравнения проб, окрашенных и обработанных в пределах 6 часов после снижения числа лейкоцитов, с пробами, окрашенными через 24 часа и проанализированными после дополнительных 24 часов хранения.
- Перед окрашиванием продукты с следует охлаждать (2-8°C), а концентраты тромбоцитов держать при комнатной температуре (20-25°C).

Как можно увидеть по таблице 2, пробы с эритроцитами и с тромбоцитами можно пометить в пределах 48 часов после снижения числа лейкоцитов.

Пробы, помеченные в пределах 24 часов после снижения числа лейкоцитов, можно анализировать в течение последующих 24 часов после мечения. Стабильность окрашенных проб, хранящихся 24 часа, показана в таблице 3.

Таблица 2: Стабильность проб, помеченных в пределах 48 часов после снижения числа лейкоцитов

Тип пробы	n	Время 0 (WBC/ μ L)	Среднее различие через 24 часа (WBC/ μ L)	Среднее различие через 48 часов (WBC/ μ L)
Эритро- циты	3	0,9	+0,1	-0,1
	3	4,7	+0,3	+0,2
	3	46,7	-2,8	-2,0
	3	436	+13,9	-27,2
Тромбо- циты	3	0,3	0	+0,1
	3	3,3	+1,1	+0,7
	3	38,1	+1,8	-1,8
	3	372,5	+22,7	-11,7

Таблица 3: Стабильность проб, помеченных в течение 24 часов, и обработанных после 24 часов хранения

Тип пробы	n	Время 0 (WBC/ μ L)	Среднее различие через 24 часа (WBC/ μ L)
Эритроциты	6	0,9	+0,3
	6	4,7	+0,3
	6	46,7	+2,6
	6	436	+21,9
Тромбоциты	6	0,3	+0,1
	6	3,3	+0,4
	6	28,1	+0,2
	6	372,5	+0,3

СРАВНЕНИЕ ПРОТОЧНЫХ ЦИТОМЕТРОВ

Работа комплекта для подсчёта LeukoSure была проверена на проточных цитометрах EPICS XL/XL-MCL, FC 500 и BD FACS Brand. Результаты анализа регрессии 30 проб эритроцитов и тромбоцитов показаны в таблице 4.

Таблица 4: Сравнение работы комплекта для подсчёта LeukoSure на проточных цитометрах EPICS XL/XL-MCL или Cytomics FC 500 vs. BD FACS Brand

Прибор и тип пробы	n	Угловой коэффициент	Пересечение	Корреляция
EPICS XL/XL-MCL				
Эритроциты	30	0,9856	-0,2008	0,9924
Тромбоциты	30	1,0281	0,2681	0,9906
Cytomics FC 500				
Эритроциты	30	1,0485	-0,0963	0,9900
Тромбоциты	30	0,9967	0,0187	0,9833

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Специфичность реагентов

Йодид пропидия образует комплексы с двухцепочечной РНК и ДНК. В присутствии РНКазы, используемой для удаления двухцепочечной РНК, йодид пропидия стехиометрически связывается с двухцепочечной ДНК таким образом, что ядродержащие клетки в пробе флуоресцируют с интенсивностью, пропорциональной содержанию в них ДНК.^{7,8}

Контроль качества

Для достижения оптимальных результатов, убедитесь в том, что пипетки откалиброваны в соответствии с частотой, рекомендованной производителем. Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизован для светорассеяния и интенсивности флуоресценции. За инструкцией обратитесь к руководству по изданию соответствующего прибора.

Проверяйте пробы эритроцитов на лизис эритроцитов, рассматривая пробирки с пробами после обработки и оценивая гистограммы светорассеяния. Нелизировавшиеся пробы выглядят в пробирке мутными. Частично лизировавшиеся пробы будут содержать тяжелые или аномальные лейкоцитарные популяции светорассеяния.

Ежедневно обрабатывайте и анализируйте соответствующие клетки контроля Leuko-Trol, используя протокол анализа проб. Получаемые значения абсолютных количеств должны попадать в диапазон ожидаемых значений, указанный на соответствующем листе данных анализа.

ОГРАНИЧЕНИЯ


1. Для получения оптимальных результатов перемешайте прогоны проб прогоном контрольной пробирки с изотоническим раствором IsoFlow.
2. Реагенты следует использовать до истечения срока годности, указанного на этикетке комплекта.
3. Если проба эритроцитов кажется мутной, лизис не прошёл до конца.
4. NRBC (ядросодержащие эритроциты) могут не до конца лизироваться и оказаться включёнными в лейкоцитарные популяции светорассеяния.
5. Пробы следует проанализировать в течение 2 часов после добавления флуоросфер LeukoSure.
6. За информацией о прочих ограничениях в использовании реагента обратитесь к вкладышу в упаковке конкретного продукта.
7. За информацией об ограничениях клеток контроля Leuko-Trol, обратитесь к вкладышу в упаковке соответствующего продукта.

ССЫЛКИ


1. Lane TA, Anderson KC, Goodnough LT, Kutz S, Moroff G, Pisciotto PT, Sayers M and Silberstein LE. 1992. Leukocyte reduction in blood component therapy. *Ann Intern Med* 117:151-162.
2. Zoon KC. 1996. Recommendations and licensure requirements for WBC-reduced blood products. Bethesda, M: FDA.
www.fda.gov/cber/bldmem/mem52996.txt.
3. Draft Guidance for Industry: Pre-Storage Leukocyte Reduction of Whole Blood and Blood Components Intended for Transfusion.
www.fda.gov/cber/gdlms/preleuk.pdf.
4. Sirchia G and Rebutta P. 1995. Enumeration of low white cells in Clinical Benefits of Leukodepleted Blood Products, Sweeney J and Heaton A, eds. RG Landes Company. Chapter 3:17-27.
5. Dzik S, Moroff G and Dumont L. 2000. A multicenter study evaluating three methods for counting residual WBCs in WBC-reduced blood components: Nageotte hemocytometry, flow cytometry, and microfluorometry. *Transfusion* 40:513-520.
6. Van De Meer PF, Gratama JW, Van Delden CJ, Laport RF, Levering WHBM, Schrijver JG, Tiekstra MJ, Keeney M and de Wildt-Eggen J. 2001. Comparison of five platforms for enumeration of residual leucocytes in leukoreduced blood components. *Brit J Haem* 115:953-962.
7. Crissman HA and Steinkamp JA. 1973. Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J Cell Biology* 59:766-771.
8. Shapiro HM: 1995. *Practical Flow Cytometry. Extrinsic Parameters. Third Edition*, New York: Wiley-Liss, p. 251-262.

ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

Комплект для подсчёта LeukoSure

 175621 - 200 тестов

Флуоросферы LeukoSure

 6607124 - 200 тестов

ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Логотип Beckman Coulter, COULTER и COULTER CLENZ являются товарными знаками Beckman Coulter, Inc.; Beckman Coulter, COULTER и COULTER CLENZ зарегистрированы в USPTO и SIPO.

За дополнительной информацией или при получении повреждённой продукции обращайтесь в сервисный центр компании Beckman Coulter по телефону 800-526-7694 (в США или Канаде) или свяжитесь с местным представителем компании Beckman Coulter.



Beckman Coulter, Inc.
250 S. Kraemer Blvd.
Brea, CA 92821

www.beckmancoulter.com



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

Printed in USA
Made in USA

© 2010 Beckman Coulter, Inc.
Все права защищены.