



## Определение абсолютного количества клеток-мишеней с использованием COULTER® EPICS™ XL™/XL-MCL™, Cytomics FC 500 и эквивалентных систем проточной цитометрии



### НАЗНАЧЕНИЕ

Флуоросферы Flow-Count являются флуоресцирующими микросферами, реагентом для прямого определения лимфоцитов, подгрупп лимфоцитов и процента популяции клеток CD34+ и абсолютного количества клеток-мишеней в биологических образцах с использованием EPICS XL/XL-MCL, Cytomics FC 500 или эквивалентной системы проточной цитометрии.

За полной информацией о реагенте, включающей назначение, клиническую значимость и инструкции по сбору, метке и лизису образцов для анализа проточной цитометрией обратитесь к вкладышу в упаковке конкретного продукта.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Общее количество белых клеток крови и процент лимфоцитов обычно получают, используя число лимфоцитов, вычисленное на автоматическом гематологическом приборе, умноженное на процент положительного-окрашенных клеток, вычисленный на проточном цитометре. Однако предполагается, что этот стандартный (непрямой) метод даёт значимую вариабельность между различными лабораториями.<sup>1-4</sup> Флуоросферы являются эффективной альтернативой стандартному (непрямому) методу вычисления абсолютного количества клеток-мишеней и сразу даёт это значение, используя только проточный цитометрический иммунофенотипический анализ. При смешении идентичных объёмов биологического образца и флуоросфер Flow-Count можно установить отношение числа клеток в образце к числу флуоросфер. Затем клетки-мишени и флуоросферы подсчитываются на EPICS XL/XL-MCL, Cytomics FC 500 или эквивалентной системе проточной цитометрии. Так как концентрация флуоросфер известна, абсолютное количество клеток-мишеней можно определить по следующей формуле:

$$\frac{\text{Абсолютное количество (клетки/}\mu\text{L)} = \frac{\text{Общее число подсчитанных клеток}}{\text{Общее число подсчитанных флуоросфер}} \times \text{Аналитическая концентрация флуоросфер Flow-Count}}$$

### ПРИНЦИПЫ ТЕСТИРОВАНИЯ

В основе прямого метода Flow-Count лежит смешивание пробы флуоросфер Flow-Count известного объёма (100  $\mu\text{L}$ ) и концентрации с равным объёмом биологического образца. Образец подготавливается в соответствии с указаниями на соответствующем вкладыше в упаковке. Затем к подготовленной пробе добавляются флуоросферы Flow-Count. После анализа на проточном цитометре можно самостоятельно или автоматизировано с помощью программного обеспечения прибора вычислить абсолютное количество клеток-мишеней, используя аналитическую концентрацию.

### СОСТАВ РЕАКТИВОВ

Флуоросферы Flow-Count состоят из 10  $\mu\text{m}$  (номинальный диаметр) پلیстироловых флуоросфер в среде для водной суспензии, содержащей сурфактант и 1% формальдегид. Каждая флуоросфера содержит краситель, который светит излучает на длине от 525 нм до 700 нм при возбуждении волной длины 488 нм. Аналитическая концентрация флуоросфер получена по результатам многочисленных повторных анализов на анализаторе размеров частиц COULTER.

### ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовки не требуется. Флуоросферы Flow-Count не разводят и используют прямо из флакона. Следует удалить весь алюминий от термосваренного покрытия с верха флакона. Перед пипетированием из флакона необходимо перемешать его содержимое (от 10 до 12 секунд на вихревом смесителе).

### ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

1. Этот реагент содержит 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.
2. Флуоросферы Flow-Count используются прямо из флакона. Не разводите на аликвоты и не замораживайте флуоросферы Flow-Count так как это может привести к ошибочным результатам.
3. Следует удалить весь алюминий от термосваренного покрытия с верха флакона. Остатки алюминия могут прореагировать с формальдегидом и вызвать изменение в проявлении Flow-Count флуоросфер.
4. Открытые флаконы с флуоросферами Flow-Count следует хранить в вертикальном положении во избежание утечки.
5. С образцами, пробами и всеми материалами, с ними соприкасающимися, следует работать как с потенциально передающими инфекцию и утилизировать их с соответствующими мерами предосторожности.
6. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта образцов с кожей и слизистыми оболочками.
7. Не используйте флуоросферы Flow-Count после даты истечения срока годности, указанной на этикетке флакона.
8. Чтобы избежать получения ошибочных результатов, используйте откалиброванную пипетку с позитивным вытеснением или пипетку повтора для подачи биологических образцов и Flow-Count флуоросфер.
9. Чтобы избежать получения ошибочных результатов, для точного и аккуратного пипетирования образца и флуоросфер Flow-Count пользуйтесь техниками пипетирования, рекомендованными производителем пипетки.
10. Флуоросферы Flow-Count 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.

11. Инкубация или перемешивание в течение времени и при температурах, отличных от указанных, могут привести к искажению результатов.
12. Подготовленные пробы следует анализировать на проточном цитометре в пределах 2 или менее часов (см. вкладыши в упаковке соответствующих продуктов) после добавления флуоросфер Flow-Count.
13. Каждая партия флуоросфер Flow-Count имеет определённую концентрацию флуоросфер. При определении абсолютного количества клеток-мишеней убедитесь, что используете правильную аналитическую концентрацию.
14. Чтобы избежать получения ошибочных результатов, убедитесь в том, что сосчитаны по крайней мере 1000 флуоросфер Flow-Count.
15. При хранении или использовании не оставляйте флуоросферы Flow-Count под ярким светом.
16. Избегайте бактериального заражения флуоросфер Flow-Count, так как оно может привести к ошибочным результатам.
17. Избегайте испарения и утечек флуоросфер Flow-Count и проб, так как это может привести к ошибочным результатам.
18. Не следует использовать включающие в себя промывку методы подготовки, так как это приводит к неопределимым потерям клеток.
19. При попадании на кожу может вызывать сенсибилизацию.
20. При попадании в глаза немедленно промойте их большим количеством воды и обратитесь к врачу.
21. Используйте соответствующую защитную одежду, перчатки и средства защиты глаз и лица.
22. При несчастном случае или плохом самочувствии обратитесь к врачу (по мере возможности, с предоставлением соответствующей этикетки).
23. Используйте только в хорошо вентилируемых зонах.
24. Существуют отдельные свидетельства наличия канцерогенного эффекта.

### УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

**ВАЖНО: Открытые флаконы с флуоросферами Flow-Count следует хранить в вертикальном положении во избежание утечки.**

Флуоросферы Flow-Count сохраняют стабильность до истечения срока годности, указанного на этикетке флакона, при хранении при температуре 2-8°C. Открытые флаконы с флуоросферами Flow-Count сохраняют стабильность в течение 30 дней при хранении в темноте при температуре 2-8°C. Избегайте замораживания и воздействия света. Перед использованием доведите флуоросферы Flow-Count до 20-25°C.

Подготовленные пробы после добавления флуоросфер Flow-Count сохраняют стабильность до 2 или менее часов, в соответствии с указаниями на вкладыше в упаковке выбранного вами приложения.

### ПРИЗНАКИ РАЗРУШЕНИЯ

Любое внешнее изменение флуоросфер Flow-Count во взвеси (в норме это мутная бесцветная жидкость) или появление вторичных флуоресцирующих популяций, составляющих более 20% всей популяции могут указывать на разрушение реагента, и в таком случае его не следует использовать.

### ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

За конкретными указаниями по обращению с каждым тестируемым приложением обратитесь к вкладышу в упаковке конкретного продукта.

## ПРОЦЕДУРА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АБСОЛЮТНОГО КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

### ПРЕДОСТАВЛЕННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Флуоросферы Flow-Count

REF 7547053 – 200 тестов (1 x 20 mL)

REF A91346 – 200 тестов (1 x 21 mL)

### ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Биологическая проба, помеченная нужным антителом и лизированная с помощью системы реагентов COULTER® IMMUNOPREP™, или

Биологическая проба, меченная реагентами Stem-Kit™ и лизированная в приготовленном 10X NH<sub>4</sub>Cl лизирующем растворе.

Пипетка повтора (100 µL) и наконечники, или

Пипетка с позитивным вытеснением (100 µL) и наконечники

Таймер

Вихревой смеситель

EPICS XL/XL-MCL, Cytoomics FC 500 или эквивалентная система проточной цитометрии

### ПРОЦЕДУРА Флуоросфер Flow-Count

1. Приготовьте тест-пробирку с подготовленной пробой.

**ВАЖНО:** Для получения оптимальных результатов при добавлении 100 µL биологического образца или 100 µL флуоросфер в тест-пробирку, необходимо соблюдать точную и аккуратную технику пипетирования. Обратитесь к инструкциям по пипетированию от производителя и нижеприведённой ПРОЦЕДУРЕ ПРОВЕРКИ ТЕХНИКИ ПИПЕТИРОВАНИЯ.

2. Смешивайте флуоросферы Flow-Count на вихревом смесителе от 10 до 12 секунд. Избегайте избыточного смешивания для минимизации возможности появления пузырей воздуха.
3. Добавьте 100 µL флуоросфер Flow-Count в тест-пробирку. Не пипетируйте пузыри воздуха.
4. Смешивайте содержимое тест-пробирки на вихревом смесителе на 50% от высоты пробирки в течение 5 секунд. Повторите смешивание на вихревом смесителе прямо перед анализом проточной цитометрией.
5. Повторите шаги с 1 по 4 для каждого образца, в котором определяете абсолютное количество клеток-мишеней.

**ВАЖНО:** Подготовленные пробы следует анализировать на проточном цитометре в пределах 2 или менее часов после добавления флуоросфер Flow-Count. Для некоторых приложений максимальное время простоя пробы перед анализом после добавления флуоросфер Flow-Count может быть меньше. За этой информацией обратитесь к вкладышам в упаковке соответствующих продуктов.

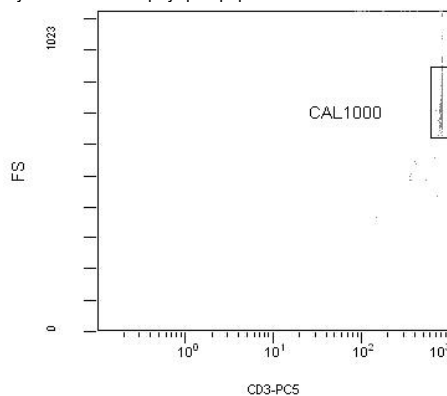
### АНАЛИЗ ПРОБ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИЕЙ

За информацией о соответствующих инструкциях по анализу проб для каждого приложения обращайтесь к вкладышам в упаковке соответствующих продуктов.

1. Убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизован для светорассеяния и интенсивности флуоресценции, и что выставлена компенсация цвета. За инструкцией обратитесь к руководствам по соответствующим приборам.

2. Создайте гистограммы, следуя указаниям на вкладыше в упаковке соответствующего продукта.
3. Создайте дополнительную двухпараметрическую гистограмму FL4 LOG (или FL3 LOG или FL2 LOG или FL1 LOG) к FS или ВРЕМЕНИ (см. Рисунок 1). Нарисуйте прямолинейный (или эквивалентный) селектор вокруг флуоросфер Flow-Count (правый верхний угол) и обозначьте его как CAL.
4. Введите аналитическую концентрацию флуоросфер Flow-Count, которая указана на листе данных анализа, приложенном к этому вкладышу в упаковке. За информацией о введении аналитической концентрации или фактора CAL обратитесь к соответствующим руководствам по приборам.

**Рисунок 1:** Изображён образец гистограммы проанализированных на проточном цитометре Cytoomics FC 500 флуоросфер Flow-Count.



**ВАЖНО:** Убедитесь, что область CAL полностью охватывает основную популяцию флуоросфер (синглет), но исключает дуплеты (точки с очень высоким рассеянием вперёд) и что использована правильная аналитическая концентрация.

5. Смешивайте содержимое тест-пробирки на вихревом смесителе на 50% от высоты пробирки в течение 5 секунд.
6. Анализируйте тест-пробирку в проточном цитометре.

**ВАЖНО:** Убедитесь в том, что сосчитаны по крайней мере 1000 флуоросфер Flow-Count.

### ПРОЦЕДУРА ПРОВЕРКИ ТЕХНИКИ ПИПЕТИРОВАНИЯ

Оптимальные результаты получаются при точном и аккуратном пипетировании и образца, и флуоросфер Flow-Count. Чтобы проверить, является ли техника пипетирования, использованная для подачи образца и флуоросфер Flow-Count, 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 µL образца или флуоросфер Flow-Count в тест-пробирку.
4. Запишите вес тест-пробирки, сосуда для уравнивания и перенесённого образца или Flow-Count Проба флуоросфер.
5. Настройте значение весов на нуль.
6. Повторяйте шаги с 3 по 5, пока не взвесите по крайней мере 10 образцов или проб флуоросфер Flow-Count.
7. Вычислите среднее, стандартное отклонение ( $\pm 1$  CO) и коэффициент вариации (% CV) взвешиваний.

8. % CV должен быть  $\leq 2,0\%$ .

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АБСОЛЮТНОГО КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

Чтобы определить абсолютное количество клеток-мишеней на проточных цитометрах Beckman Coulter, введите аналитическую концентрацию флуоросфер Flow-Count при обозначении области CAL в соответствии с инструкцией в шаге 3 под заголовком АНАЛИЗ ПРОБ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИЕЙ После того, как сосчитаны по крайней мере 1000 флуоросфер, абсолютное количество клеток-мишеней автоматически вычисляется по следующей формуле:

$$\text{Абсолютное количество (клетки/µL)} = \frac{\text{Общее число подсчитанных клеток}}{\text{Общее число подсчитанных флуоросфер}} \times \frac{\text{Аналитическая концентрация флуоросфер Flow-Count}}$$

Если образец был разведён, результат приведённого выше уравнения следует скорректировать в соответствии с коэффициентом разбавления.

### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для достижения оптимальных результатов, убедитесь в том, что пипетки откалиброваны в соответствии с частотой, рекомендованной производителем. Для получения оптимальных результатов убедитесь, что проточный цитометр правильно выровнен и стандартизован для светорассеяния и интенсивности флуоресценции, и что выставлена компенсация цвета.

За инструкцией обратитесь к руководству по изделию соответствующего прибора.

За процедурой контроля качества реагентов обратитесь к вкладышу в упаковке конкретного продукта.

### ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Эта лизирующая система может применяться только с системой реагентов IMMUNOPREP или 10X NH<sub>4</sub>Cl лизирующим раствором (только в наборе реагентов Stem-Kit) при использовании флуоросфер Flow-Count. Флуоросферы нельзя использовать в сочетании с другими методами лизиса.
2. Добавление органических растворителей или растворов с высокой ионной силой может вызвать необратимые разбухание или агрегацию флуоросфер Flow-Count.
3. Подготовленные пробы нужно анализировать на проточном цитометре в пределах 2 часов после добавления флуоросфер Flow-Count.
4. За информацией о других приборных ограничениях обратитесь к руководствам по изделию проточного цитометра.
5. За информацией о прочих ограничениях реагента обратитесь к вкладышу в упаковке конкретного продукта.

### ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

#### НАДЕЖНОСТЬ МЕТОДА

За информацией о надёжности метода обратитесь к вкладышу в упаковке конкретного продукта.

#### ЛИНЕЙНОСТЬ

За информацией о линейности метода обратитесь к вкладышу в упаковке конкретного продукта.

#### ТОЧНОСТЬ


За информацией о точности метода обратитесь к вкладышу в упаковке конкретного продукта.


## ИЗБРАННЫЕ ИСТОЧНИКИ

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. Коепке 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.

## ФОРМА ПОСТАВКИ ПРОДУКТА

Флуоросферы Flow-Count

 7547053 – 200 тестов (1 x 20 mL)

 A91346 – 200 тестов (1 x 21 mL)

## ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ

Beckman Coulter, COULTER, EPICS, Flow-Count, IMMUNOPREP, Stem-Kit, XL и XL-MCL являются товарными знаками Beckman Coulter, Inc.

Патент США 5.451.525.

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 вашим местным представителем компании Beckman Coulter.



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

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